

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERİ
DOKULARINDA *PIK3CA* MUTASYONLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Sadiye EKİNCİ

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ**

**ANKARA
2014**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERİ
DOKULARINDA *PIK3CA* MUTASYONLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Sadiye EKİNCİ

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hatice ILGIN RUHİ

**Bu tez, TÜBİTAK tarafından 112S386 proje numarası ile 1002 hızlı
destek projesi kapsamında desteklenmiştir.**

ANKARA

2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı : Dr.Sadiye Ekinci	Tarih: 15 / 10 / 2014
Anabilim/Bilim Dalı : Tıbbi Genetik AD	
Tez Danışmanı : Prof.Dr.Hatice I.Ruhi	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dokularında <i>PIK3CA</i> mutasyonlarının araştırılması	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

Jüri Başkanı

Unvanı, Adı, Soyadı
Prof.Dr.Hatice I.Ruhi

A.Ü.T.F. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Unvanı, Adı, Soyadı
Prof.Dr.Ajlan Tükün

A.Ü.T.F. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Unvanı, Adı, Soyadı
Prof.Dr.Feride Şahin

Başkent Ü.T.F. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

Akciğer (AC) kanseri dünyadaki en yaygın ve mortalitesi en yüksek kanserlerden biridir. AC kanseri patogenezini etkileyen moleküler mekanizmaların anlaşılma başlanmasıyla birlikte geliştirilen hedef tedavi yöntemleri sayesinde bu hastaların prognozunda önemli iyileşmeler sağlanmasına rağmen halen tedavi başarısı istenilen düzeyde değildir. Yeni tedavi hedeflerinin tanımlanması gerekmektedir. Yeni bir tedavi hedefi olarak son yıllarda *PIK3CA* geni oldukça dikkat çekmektedir. Bu çalışmanın hem ülkemizde yapılmış ilk çalışma olması hem de elde edilen bulgular nedeniyle literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Tıbbi genetik uzmanlık eğitimimi Türkiye'nin en önde gelen kuruluşlarından biri olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında tamamlamış olmaktan mutluluk duyuyorum. Uzmanlık eğitimim süresince eğitimime yaptıkları her türlü kıymetli katkıdan dolayı saygı değer hocalarım başta Prof.Dr. Ajan Tükün ve Prof.Dr. Hatice İlgin Ruhi olmak üzere Yrd.Doç.Dr. Nüket Yürür Kutlay, Yrd.Doç.Dr. Halil Gürhan Karabulut ve Yrd.Doç.Dr. Timur Tuncalı'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

AC kanseri gibi mortalitesi son derece yüksek olan bir kanser türünde tedavi geliştirilmesine katkı sağlayacak ciddi bir çalışma yapma imkanı sağlayan ve tez süresince engin bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, her türlü sorunu pratik bir şekilde çözmemi sağlayan Prof.Dr. Ajan Tükün hocama;

Bu tez çalışmasında yapmış oldukları katkılardan dolayı Prof.Dr. Hatice İlgin Ruhi, Prof.Dr. Ahmet Demirkazık, Prof.Dr. Serpil Dizbay Sak hocalarıma;

Çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen Moleküler Genetik Laboratuvarımız ekibine,

Uzmanlık eğitimim süresince arkadaşlığı ve desteğiyle hep yanımda olan Uzm. Dr. Arzu Vicdan'a, birlikte çalışmaktan keyif aldığım asistan arkadaşlarım Dr. Şule Biçer, Dr. Burak Mutlu ve Dr. Özlem Türedi'ye,

Burada geçirdiğim yıllar boyunca sağladıkları her türlü destek için tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına,

Bu tez, 1002 hızlı destek projesi kapsamında 112S386 proje numarasıyla TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir, emeği geçen tüm TÜBİTAK çalışanlarına,

Bana her zaman destek olan eşim Reşit'e ve kızımız Zeynep'e,

Bu günlere gelmemdeki emeklerinden dolayı sevgili anneme ve babama, İçten teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Sadiye EKİNCİ

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
Önsöz	ii
İçindekiler	iii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller Dizini	viii
Tablolar Dizini	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Akciğer Kanseri	2
2.1.1. Sınıflama	3
2.1.2. Etyoloji	3
2.2. Moleküler Patogenez	6
2.2.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	7
2.2.2. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri	9
2.2.2.1. <i>EGFR</i> Mutasyonları	9
2.2.2.2. <i>HER2</i> Mutasyonları	12
2.2.2.3. <i>KRAS</i> Mutasyonları	13
2.2.2.4. <i>ALK</i> Füzyon Genleri	14
2.2.2.5. <i>MET</i> Amplifikasyon ve Nokta Mutasyonları	15
2.2.2.6. <i>BRAF</i> Mutasyonları	16
2.2.2.7. <i>AKT1</i> Mutasyonları	17
2.2.2.8. <i>MEK1</i> Mutasyonları	18
2.2.2.9. <i>ROS1</i> Mutasyonları	19
2.2.2.10. <i>RET</i> Mutasyonları	19
2.2.2.11. <i>PIK3CA</i> Mutasyonları	20
2.3. <i>PIK3CA</i> ve Mutasyonları	20
2.3.1. Fosfatidil İnoзитol 3 Kinaz Yapı ve Sınıflaması	20
2.3.1.1. Sınıf IA PI3K'lar	21
2.3.1.2. Sınıf IB PI3K'lar	23
2.3.1.3. Sınıf II PI3K'lar	23

2.3.1.4. Sınıf III PI3K'lar	23
2.3.2. PI3K Sinyal Yolağı	24
2.3.3. PI3K Sinyal Yolağı ve Kanser	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Gereç	31
3.2. Yöntem	32
3.2.1. DNA İzolasyonu	32
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	32
3.2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kimyasal Karışımları	34
3.2.3. Jel Elektroforezi	35
3.2.4. PCR Sonrası Temizleme	35
3.2.5. Sekans Reaksiyonu	35
3.2.6. Sekans Reaksiyonu Sonrası PCR Ürünü Temizleme	36
3.2.7. Dizi Analizi	37
4. BULGULAR	38
4.1. NSCLC'de Daha Önce Tanımlanmış Mutasyonlar	39
4.2. Diğer Kanser Türlerinde Tanımlı Mutasyonlar	41
4.3. Tanımlanmamış Mutasyonlar	43
4.4. Polimorfizmler	49
4.5. Mutasyon Saptanan Olgular	51
4.5.1. <i>PIK3CA</i> Geninde Tek Mutasyon Saptanan Olgular	51
4.5.2. <i>PIK3CA</i> Geninde Çoklu Mutasyon Saptanan Olgular	51
4.5.3. <i>PIK3CA</i> tek/çoklu Mutasyon Yanısıra <i>EGFR</i> , <i>KRAS</i> ya da <i>BRAF</i> Mutasyonu Saptanan Olgular	54
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇLAR	63
ÖZET	64
SUMMARY	65
KAYNAKLAR	66

SİMGELER ve KISALTMALAR

AC	Akciğer
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALK	Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase
ARAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog
ASV16	Avian sarcoma virus 16
BAD	BCL2 associated agonist of cell death
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCL-XL	BCL2-like 1
BH	Bcr homolog
BIM	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CDK	Cyclin dependent kinase
EF4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EML4	Echinoderm microtubule associated protein like 4
FAS	Fas cell surface death receptor
FHIT	Fragile histidin triad gene
FKHR	Forkhead related transcription factor complex
FOXO	Forkhead box O transcription factors
FUS1	Fused in sarcoma
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GSK3	Glikojen sentaz kinaz-3
HER2 (ERBB2)	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
HGF	Hepatocyte growth factor
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IKK	I kappa B kinase
IRS	İnsülin reseptör substrat
JM	Jukstamembran
KIF5B	Kinesin family member 5B
KLC1	Kinesin light chain 1

KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDM2	Murine double minute 2
MEK1(MAP2K1)	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
MEN	Multipl endotelyal neoplazi
MET	Hepatocyte growth factor receptor
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTORC	Mammalian target of rapamycin complex
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NCCN	National comprehensive cancer network
NFkB	Nuclear Factor kappa B
NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
p110α	PI3K katalitik subüniti
P70S6K	Ribosomal protein S6 kinase
p85	PI3K regülatör subüniti
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDK1	Phosphoinositide dependent kinase1
PH	Plecstrin homology
PI	Fosfatidilinozitol
PI3K	Fosfatidilinozitol-3-kinaz
PI-3-P	Fosfatidil inozitol 3 fosfat
PI-4-P	Fosfatidil inozitol 4 fosfat
PIK	Fosfatidil inozitol kinaz homoloji domain
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PIK3R	Fosfatidilinozitol-3-kinaz regülatör subünit
PIP2	Fosfatidil inozitol 4,5 bifosfat
PIP3	İnozitol 3,4,5 trifosfat
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
RARβ	Retinoic acid receptor β

RASSF1	Ras association domain family member 1
RB1	Retinoblastoma 1
RET	Rearranged during transfection
RHEB	RAS homolog enriched in brain
ROS1	c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase
RTK	Reseptör tirozin kinaz
SCLC	Küçük hücreli akciğer kanseri
SH2	Src homolog 2
SHIP	SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase
SOS	Son of sevenless
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TD	Touchdown
TFG	TRK-fused gene
TK	Tirozin kinaz
TKİ	Tirozin kinaz inhibitörü
TP53	Tümör protein P53
TSC1	Tuberin
TSC2	Hamartin
Vps34	Vacuolar protein sorting defective 34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Erkeklerde kanser insidans ve kanserden ölüm oranları	2
Şekil 2.2.	Kadınlarda kanser insidans ve kanserden ölüm oranları	2
Şekil 2.3.	Yaygın EGFR kinaz domain mutasyonları	10
Şekil 2.4.	PI3K'ların yapısı	22
Şekil 2.5.	PI3K/AKT sinyal yolağı	25
Şekil 2.6.	p110 α mutasyonları	30
Şekil 4.1.	E545A mutasyonu saptanan olguların sekans görüntüleri	40
Şekil 4.2.	R524K mutasyonu saptanan olgu	42
Şekil 4.3.	D549N mutasyonu saptanan olgunun sekans görüntüsü	42
Şekil 4.4.	L719V mutasyonu saptanan olguların sekans görüntüleri	43
Şekil 4.5.	C147Y mutasyonu saptanan olgunun sekans görüntüsü	45
Şekil 4.6.	S292N mutasyonu saptanan olgunun sekans görüntüsü	46
Şekil 4.7.	V376I mutasyonu saptanan olgunun sekans görüntüsü	46
Şekil 4.8.	D527N mutasyonu saptanan olgunun sekans görüntüsü	47
Şekil 4.9.	V680L mutasyonu saptanan olguların sekans görüntüleri	48
Şekil 4.10.	Y644H mutasyonu saptanan olguların sekans görüntüleri	50
Şekil 5.1.	a) p85 α ve p110 α domain organizasyon şeması, b) p85 α /p110 α protein diyagramı	57
Şekil 5.2.	a) Saptanan mutasyonların protein şemasındaki lokalizasyonları, b, c) Saptanan mutasyonların protein diyagramındaki lokalizasyonları	58

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1.	Akciğer kanseri için riski bilinen mesleksel karsinojenler	5
Tablo 3.1.	PIK3CA mutasyonu araştırılan olguların demografik, klinik özellikleri ile <i>EGFR</i> , <i>KRAS</i> ve <i>BRAF</i> mutasyon durumları	31
Tablo 3.2.	PCR’de kullanılan primer dizileri ve ürün uzunlukları	33
Tablo 3.3.	PCR’da kullanılan kimyasalların miktarları	34
Tablo 3.4.	TD PCR’da uygulanan sıcaklık ve süreler	34
Tablo 3.5.	Sekans reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları	36
Tablo 3.6.	Sekans reaksiyonunda uygulanan sıcaklık ve süreler	36
Tablo 3.7.	Değerlendirilen ekzonlar	37
Tablo 4.1.	Hastalarda saptanan <i>PIK3CA</i> mutasyonları	38
Tablo 4.2.	E545A mutasyonu saptanan olgular	40
Tablo 4.3.	S553Tfs*7 mutasyonu saptanan olgular	41
Tablo 4.4.	R524K mutasyonu saptanan olgu	41
Tablo 4.5.	D549N saptanan olgu	42
Tablo 4.6.	L719V mutasyonu saptanan olgular	43
Tablo 4.7.	C147Y mutasyonu saptanan olgu	45
Tablo 4.8.	S292N mutasyonu saptanan olgu	45
Tablo 4.9.	V376I mutasyonu saptanan olgu	46
Tablo 4.10.	D527N mutasyonu saptanan olgu	47
Tablo 4.11.	V680L mutasyonu saptanan olgular	47
Tablo 4.12.	Y644H mutasyonu saptanan olgular	50
Tablo 4.13.	<i>PIK3CA</i> mutasyonlarının patojenik değerleri	55

1. GİRİŞ

PIK3CA geni bir onkogen olduğu düşünölen ve kodladığı protein kinaz fonksiyonu gören bir gendir. Kanseri patogeneğinde rol oynayan önemli sinyal yolaklarından biri olan fosfatidil inozitol 3 kinaz (PI3K) sinyal yolağında görev almaktadır. Kanseri moleküler etyopatogeneğinde rol oynayan onkogenlerde olduğu gibi, *PIK3CA* genindeki mutasyonlar sonucunda kodladığı proteinin konstitösyonel aktivite kazanması ilişkili olduğu sinyal yolağının sürekli aktivasyonuna yol açar. Böylece bu yolak üzerinden hücre proliferasyonu, apoptoz, protein sentezi, hücre migrasyonu gibi pek çok hücreşel işlevde rol alan proteinlerin aktivasyonuna neden olur.

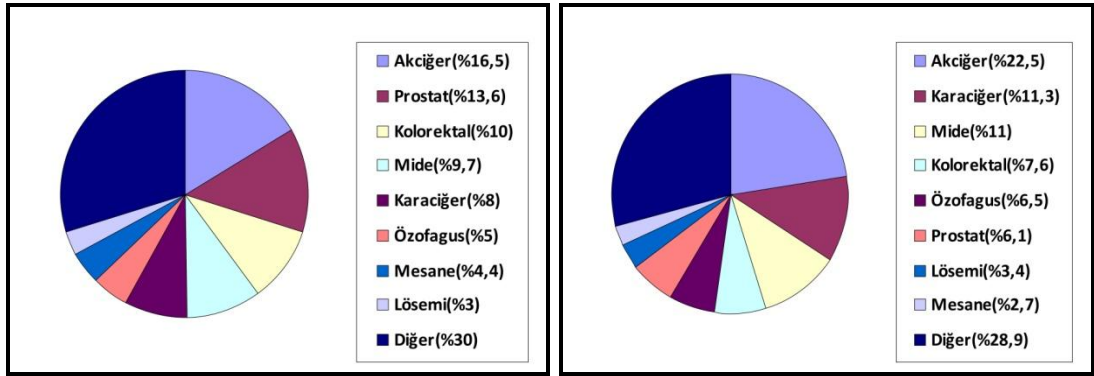
PIK3CA geninin kodladığı kinaz, kanseri gelişiminde önemli rol oynadığı bilinen PI3K/AKT yolağının aktivasyonuna yol açtığı için tedavi hedefi konumunda olan bir enzimdir. Henüz kanserde kullanımıyla ilgili FDA tarafından onaylanmış bir tedavi ajanı olmasa da bu konuyla ilgili yoğun faz çalışmaları yürütölmektedir. *PIK3CA*'nın kanserde tedavi hedefi olarak etkinliğinin tam ortaya konabilmesi için NSCLC gibi prognozu son derece kötü olan kanseri türlerinde mutasyon profillerinin belirlenmesi ve mutasyonların patogeneğdeki rollerinin daha iyi aydınlatılması gerekmektedir.

Ölkemizde NSCLC'de *PIK3CA* mutasyon sıklığını göstermesi bakımından literatürdeki ilk çalışma olan bu araştırmada, NSCLC'de *PIK3CA* geninin tüm kodlayan dizisinin incelenmesi ve böylece bilinen mutasyonların sıklığının ortaya koyulmasının yanı sıra olası farklı mutasyonların tanımlanması amaçlanmıştır.

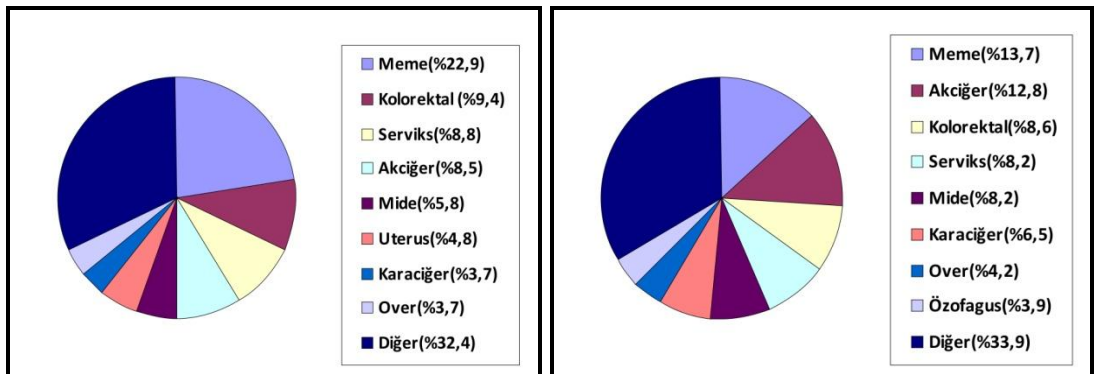
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer (AC) kanseri dünyadaki en yaygın ve mortalitesi en yüksek kanserlerden biridir. Dünya sağlık örgütünün 2008 verilerine göre erkeklerdeki yaklaşık 6,5 milyon yeni kanser tanısının %16,5'i, 4.2 milyon kanserden ölümün de %22,5'i AC kanseri nedenlidir (Şekil 2.1). Kadınlardaki yaklaşık 6 milyon yeni kanser tanısının %8,5'i, 3.3 milyon kanserden ölümün de %12,8'i AC kanserinden kaynaklanmaktadır (Ferlay ve ark., 2010). (Şekil 2.2).



Şekil 2.1. Erkeklerde kanser insidans ve kanserden ölüm oranları (Ferlay ve ark., 2010).



Şekil 2.2. Kadınlarda kanser insidans ve kanserden ölüm oranları (Ferlay ve ark., 2010).

Olguların çoğu gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir (%55). Erkeklerde görülen en yaygın kanserdir. En yüksek sıklıkta Orta-Doğu, Güney Avrupa, Kuzey Amerika ve Doğu Asya'da, en az sıklıkta ise Orta ve Batı Afrika'da görülmektedir. Kadınlardaki insidansı biraz daha düşüktür. Dünya çapında kadınlarda en yaygın görülen 4. kanser türüdür ve kanserden ölümün de en yaygın 2. nedenidir. Kadınlarda en yüksek sıklıkta Kuzey Amerika'da, en az sıklıkta da Orta Afrika'da görülmektedir (Ferlay ve ark., 2010).

2.1.1. Sınıflama

KÜÇÜK HÜCRELİ OLMAYAN AKCİĞER KANSERİ (NSCLC)	Adenokarsinom	%40
	Skuamoz hücreli karsinom	%30
	Büyük hücreli karsinom	%15
KÜÇÜK HÜCRELİ AKCİĞER KANSERİ (SCLC)		%15

2.1.2. Etyoloji

AC kanseri etyolojisinde bilinen en önemli etken sigaradır. AC kanserlerinin neden olduğu ölümlerin %71'inden sigara sorumludur (WHO, 2009). Sigaranın daha çok SCLC ve skuamoz hücreli karsinomla ilişkili olduğu bilinmektedir.

Gelişmiş ülkelerde sigara içme oranlarının azalmasıyla birlikte belli bir süre sigara içip bırakanlarda halen içmekte olanlara kıyasla daha sık AC kanseri gözlenmektedir (Molina ve ark., 2008). 1997-2002 yılları arasında AC kanseri tanısı alan 5000'den fazla hastanın katıldığı bir çalışmada hastaların %25 'nin halen sigara içmekte olduğu (current içici), %60'dan fazlasının da yaşam boyu 100 taneden fazla sigara içip kanser tanısından en az bir yıl önce sigarayı bırakmış olduğu (former içici) bildirilmiştir (Molina ve ark., 2008). AC kanserlerinin %1,6'sı pasif sigara içiciliğine bağlıdır (Molina ve ark., 2008).

AC kanserlerinin yaklaşık %10-25'i hiç sigara içmemiş (yaşam boyu 100 taneden az sigara içmiş) kişilerde görülmektedir (Couraud ve ark., 2012).

Geniş coğrafik varyasyonlar bulunmakla birlikte sigara içmeyen grupta kadınlarda daha sık görülmektedir ve daha çok adenokarsinom tipindedir. Sigara içmeyenlerde sorumlu tutulan en önemli etkenler çevresel sigara maruziyeti (daha çok kadınlarda) ve mesleksi karsinojenler (daha çok erkeklerde) olmakla birlikte olguların 1/3'ünden fazlasında bu risk faktörleri bulunmamaktadır.

AC kanserinden ölümlerin %8'inden hava kirliliği, %3'ünden ev içinde kullanılan katı yakıtlardan kaynaklanan duman maruziyeti sorumlu tutulmaktadır (WHO, 2009).

Geçirilmiş tüberküloz hastalığı ve inflamasyonun eşlik ettiği diğer akciğer hastalıkları AC kanseri riskini artırmaktadır. Yapılmış bir çalışmada önceden varolan tüberkülozun AC kanseri riskini 1,72 rölatif riskle önemli oranda artırdığı gösterilmiştir (Wu ve ark., 2011; Brenner ve ark., 2011).

AC kanseri mesleksi kanserin en sık görülen formudur. AC kanserlerinin %8'inden mesleksi karsinojenler sorumludur (WHO, 2009) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Akciğer kanseri için riski bilinen mesleksel karsinojenler

RİSK FAKTÖRÜ	GÖRECE RİSK	ODDS ORANI	İLGİLİ MESLEK
Asbestos Sigara içen Sigara içmeyen	50-100 5		Madenciler, çimento, yapı malzemeleri, tekstil, izolasyon, tersane
Uranyum Sigara içen Sigara içmeyen	38 7		Uranyum madencileri, nükleer santral işçileri
Radon	1,06		Madenciler
Egzoz gazı		1,4-2,8	
Boya incelticileri		2,8	
Kaynak malzemeleri		3,4	
Arsenik	3-8	1,1-2,6	
Krom	3-40		Cam-seramik, basın endüstrisi, batarya işçileri
Kömür kurumu, katran	2,6		Madenciler, asfalt, katran işçileri, baca temizleyicileri
Vinil klorid	4		Plastik sanayi işçileri
Polisiklik aromatik hidrokarbonlar			Kömür fırını işçileri
Pestisidler		1,6	

AC kanseri dünyadaki öldürücü kanserler arasında birinci sıradadır. Sigara prevalansının azalmasına bağlı olarak Amerika, İngiltere gibi gelişmiş ülkelerde insidansının azaldığı ve (Molina ve ark., 2008) bu ülkelerde AC kanserli hastalar içinde hiç sigara içmeyenlerin oranının arttığı bildirilmektedir (Wakelee ve ark., 2007). Özellikle Asya ülkelerinde bu artış daha belirgindir (Yano ve ark., 2011). Bölgesel varyasyonların risk faktörleriyle ilişkili olduğu bildirilmektedir.

Türkiye’de Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesinin 2006-2008 verilerine göre erkeklerde AC kanseri insidansı yüz binde 68,9, kadınlarda ise yüz binde 8’dir. Sigara içme oranlarına bağlı olarak kadın cinsiyette AC kanseri insidansı artış göstermektedir.

AC kanseri insidansı yaşla birlikte artmaktadır. Özellikle sigara içmeyenlerde 40 yaş altında çok nadir görülür (Jonathan ve ark., 2009).

Aktif sigara içiciliği olsun ya da olmasın erkeklerde AC kanserinden ölüm oranları kadınlardan daha yüksektir (Thun ve ark, 2006).

Skuamoz hücreli karsinom oranı 1960'lardan itibaren azalırken adenokarsinom sıklığı artmaya başlamıştır. Sigara içmeyen erkeklerde adenokarsinom, sigara içenlerde ise skuamoz hücreli karsinom daha sıktır. Kadınlarda sigara içme durumuna bakılmaksızın adenokarsinom daha sık görülmektedir.

Hastaların %70'i tanı anında lokal metastatik ya da ileri evredir (Molina ve ark., 2008). AC kanseri tanısı alanların sadece %15'i 5 yıldan uzun süre hayatta kalabilmektedir (Molina ve ark., 2008). Ancak bunlarda da komorbidite oranları diğer kanser türlerine göre daha yüksektir. Primer tümör küçük boyuttayken metastaz gelişmesi, erken tanı metodlarının ve mikrometastatik hastalıkla baş edebilecek etkinlikte sistemik tedavilerin yetersizliği AC kanseri hastalarının prognozunun kötü olmasının nedenleridir.

2.2. Moleküler Patogenez

Kanser patogenezinde rol oynayan hücresel yolakların ortaya konmasıyla birlikte bu yolaklarda görev alan proteinleri kodlayan genler üzerinde çok sayıda araştırma yapılmaya başlanmıştır. Günümüzde AC kanseri de dahil pek çok kanser türünde moleküler genetik çalışmalar hem tanıda hem de bireyselleştirilmiş tedavi olarak isimlendirilen hastaya uygun tedavinin belirlenmesinde oldukça önem kazanmıştır. AC kanseri onkogen aktivasyonu ve tümör süpresör inaktivasyonu dahil çok sayıda genetik ve/veya epigenetik değişimlerin birikimiyle karakterizedir. AC kanser patogenezinin etkileyen moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması, daha etkin erken tanı ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

2.2.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Küçük hücreli AC kanseri (SCLC) tüm AC kanserlerinin %15'ini oluşturur. Erken metastaz yapması ve başlangıçta kemoterapiye cevap verip ardından relaps gelişmesi tipik klinik özellikleridir. İki yıllık sağ kalım oranı %15'in altındadır (Sher ve ark, 2008).

SCLC'de 3p, 4p, 5q, 16q, 13q ve 17p kayıpları ile 3q, 5p, 8q, 19q ve Xq kazançları tümör dokusunda sık görülen kromozomal anomalilerdir. Özellikle 3. kromozomun kısa kolundaki allellerin kaybı SCLC'nin %90'ından fazlasında bulunmaktadır (Mitsuuchi ve Testa, 2002).

SCLC'de olası tümör süpresör etkinliklerinden dolayı 4 gen özellikle ilgi çekmektedir. Bunlardan birisi olan *FHIT* (fragile histidin triad geni) diadenozin trifosfat hidrolaz enzimini kodlar ve apoptoz, hücre siklus kontrolünde indirekt rol oynadığı düşünülmektedir (Pekarsky ve ark., 2002). *FHIT* gen kaybı sigara içenlerde daha yüksek oranda görülür ve bu durum bu genin sigara dumanında bulunan karsinojenler için moleküler hedef olduğunu düşündürmektedir (Mitsuuchi ve Testa, 2002).

Bir diğer gen *RASSF1* mikrotübül bağlayıcı protein kodlar. *RASSF1* mikrotübüllerle etkileşerek G2/M arrestine yol açar (Rong ve ark., 2000). *RASSF1* fonksiyon kaybı tümör hücrelerinin daha hızlı büyümesine neden olur.

Üçüncü potansiyel tümör süpresör gen olan *RARB* (retinoic acid receptor beta), aktivatör protein 1 aktivitesini bloke ederek ve apoptozu indükleyerek fonksiyon görür (Virmani ve ark., 2002; Mitsuuchi ve Testa, 2002). SCLC'lerin %70'inde metile haldedir ve ekspresyon kaybı vardır. Epitelyal hücrelerin büyümesinin regülasyonunda ve tümörigenezin baskılanmasında önemli rol oynar.

FUS1 (fused in sarcoma) ise dördüncü potansiyel tümör süpresör gendir (Kondo ve ark., 2001). Kodladığı proteinin miristilasyonunun tümör süpresyonu için gerekli olduğu bilinmektedir, overekspresyonunun hücre siklusunda G1 fazında arreste yol açtığı gösterilmiştir (Kondo ve ark., 2001; Uno ve ark., 2004).

Bu dört gen 3p'de lokalizedir ve SCLC hücrelerinde çoğunlukla inaktive ya da delesyona uğramış haldedirler (Mitsuuchi, 2001).

TP53 geni DNA hasarına cevap olarak hücre siklus progresyonunu sınırlandıran bir protein kodlar. *TP53* mutasyonları insan kanserlerinde görülen en yaygın mutasyonlardır. SCLC'lerin %90'ında inaktive edici *TP53* mutasyonu bulunmaktadır (Sato ve ark., 2007). Bu mutasyonlar delesyon ve nokta mutasyonu şeklindedir. Mutant *P53* proteinleri onkojenik özellik kazanarak hücre büyümesinin regülasyonunun bozulmasına, invazyon ve metastaza yol açar (Muller ve Vousden, 2013). SCLC'lerin %40-70'inde anormal p53 protein ekspresyonu bulunmaktadır (D'Angelo ve Pietanza, 2010).

RB1 geni hücre siklus progresyonunu regüle eden nükleer bir fosfoprotein kodlar. Bu proteinin defosforilasyonu hücre siklusunun G fazından S fazına geçişini sağlar. *RB1* genindeki mutasyonlar delesyon, nonsense mutasyon ve splicing anormallikleri şeklindedir. İnaktivasyonu küçük hücreli AC kanserinde oldukça yaygındır, SCLC hücrelerinin %90'ından fazlasında *RB1* geninde komple kayıp ya da mutant *RB1* geni bulunmaktadır (D'Angelo ve Pietanza, 2010). *RB1* ve *TP53* 'ün birlikte kaybı SCLC'nin karakteristik özelliklerinden biridir.

PTEN tümör süpresör geni tirozin ve lipid fosfataz aktivitesi bulunan bir protein kodlamaktadır. Lipid fosfataz aktivitesi aracılığıyla PI3K/AKT yolağını inhibe etmektedir. *PTEN* inaktivasyonu bu yolağın aktivasyonunun artmasına, sonuçta hücre proliferasyonunda artışa, apoptozda ise azalmaya yol açar. *PTEN* mutasyonlarının SCLC olgularının %13'ünde saptandığı bildirilmiştir (Yokomizo ve ark., 1998).

Daha nadir olarak *PIK3CA*, *EGFR* ve *KRAS* (%10 ya da daha az) mutasyonları ve vakaların %20'sinde de *MYC* amplifikasyonu olduğu bildirilmiştir (Pleasant ve ark., 2010).

2.2.2. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri

Hücre proliferasyonu ve hücrenin sağ kalımında kritik rol oynayan proteinleri kodlayan genlerde oluşan mutasyonlar yürütücü (driver) mutasyonlar olarak isimlendirilmektedir. AC adenokarsinomlarının yaklaşık %50'sinde *EGFR*, *HER2*, *KRAS*, *PIK3CA*, *BRAF*, *MEK1*, *ROS1* ve *ALK*'da böyle bir somatik mutasyon bulunmaktadır (Sequist ve ark., 2011).

EGFR, *HER2*, *PIK3CA*, *BRAF*, *MEK1*, *ALK* ve *ROS1* mutasyonları spesifik kinaz inhibitörlerine sensitivite artışıyla ilişkilidir ve bu nedenle kodladıkları proteinler tedavi hedefi konumundadır. *AKT1* ve *PTEN* mutasyonları gibi diğer mutasyonlar *EGFR/PI3K/AKT* yolak inhibitörlerine cevabı etkileyebilen mutasyonlardır (Carpten ve ark., 2007; Sos ve ark., 2009).

2.2.2.1. *EGFR* Mutasyonları

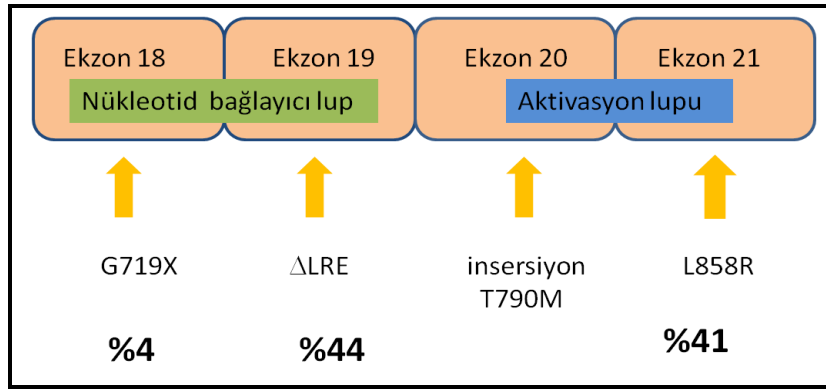
Reseptör tirozin kinazların (RTK) ErbB ailesi 4 farklı reseptörden oluşur. Bunlar; *EGFR* (*HER1* veya *ERBB1*), *HER2* (*EGFR2* veya *ERBB2/NEU*), *HER3* (*EGFR* veya *ERBB3*) ve *HER4* (*EGFR4* veya *ERBB4*)'dür.

Bu reseptörlerin TK (tirozin kinaz) domainleri homolog olsa da her birinin kendine özgü bir özelliği vardır. *HER2*'de fonksiyonel ligand bağlayıcı domain bulunmaz, *HER3*'de kinaz aktivitesi bulunmaz (Rowinsky, 2006; Normanno ve ark., 2006).

EGFR sinyali solid tümörlerde 2 majör yolağı aktive eder; *RAS/RAF/MEK/MAPK* yolağı ve *PI3K/AKT/mTOR* yolağı. Bu yolakların hepsi de hücre proliferasyonu, hücre büyümesi, invazyon, metastaz, apoptoz ve tümör anjiogenezinde rol oynar (Normanno, 2006). *EGFR* NSCLC'nin %50-80'inde overekspresedir (Forde ve Ettinger, 2013).

EGFR TK domainindeki mutasyonlar ilk olarak 2004'te bildirilmiştir (Lynch ve ark., 2004). Bu mutasyonlar TK domaininin ilk 4 ekzonuna sınırlıdır (ekzon 18-21), 3 sınıfa ayrılır: insersiyonlar, delesyonlar ve nokta mutasyonları. Ekzon 19'daki delesyonlar (tüm mutasyonların %44'ü), ekzon

21'deki nokta mutasyonları (tüm mutasyonların %41'i) en sık görülen mutasyonlardır ve birlikte tüm mutasyonların %80'den fazlasını oluşturur (Shigematsu ve Gazdar, 2006; Zhang ve ark., 2006) (Şekil 2.3). Aktive edici mutasyonlar reseptörün katalitik domaininin konformasyonunu değiştirerek sürekli kinaz aktivitesine yol açar (Nie ve ark., 2012). Bu konformasyonel değişiklik EGFR TK inhibitörleri (TKİ) için bağlanma bölgesi oluşturur. Dolayısıyla bu mutasyonlar TKİ'ne sensivite ile koreledir (Paez ve ark., 2004; Lynch, 2004; Kumar ve ark., 2008).



Şekil 2.3. Yaygın EGFR kinaz domain mutasyonları (Reungwetwattana ve ark., 2012).

EGFR mutasyonları adenokarsinom histolojik tipinde, sigara içmeyenlerde, kadınlarda ve Doğu Asya kökenli hastalarda daha sık görülmektedir. *EGFR* lokus anormallikleri amplifikasyonlara da bağlı olabilir. Yapılan çalışmalarda *EGFR* amplifikasyonunun yüksek tümör derecesi ile ilişkili olduğu ve AC adenokarsinomunun prekürsör lezyonlarında nadiren bulunduğu saptanmıştır. Prekürsör lezyonlarda *EGFR* mutasyonları daha sıktır (Yatabe ve ark., 2008). Buna göre *EGFR* mutasyonları erken dönemde, amplifikasyonları ise progresyon sırasında oluşmaktadır. İleri evre NSCLC hastalarının %30-60'ında FISH yöntemiyle *EGFR* gen kopya sayısında artış saptanmıştır, ancak, bunun prediktif değeri net olarak ortaya konulmamıştır (Hirsch ve ark., 2008).

NSCLC hastalarının %40-80'inde tümör dokusunda EGFR overekpresyonu bulunmaktadır (Lynch, 2004; Tsao ve ark., 2005).

EGFR mutasyonlarının *EGFR* mutasyonu olan tümörlere bitişik histolojik olarak normal bronş epitelinde de olduğu gösterilmiştir (Tang ve ark., 2005). Bu bulgu *EGFR* mutasyon durumunun AC adenokarsinomlarının patogenezinde erken bir belirteç ve önleme de kimyasal hedef olarak yararlı olabileceğini göstermektedir.

EGFR TK domaininde nokta mutasyonu ya da delesyon barındıran transgenik farelerin kullanıldığı 2 ayrı çalışmada, bu mutasyonların *in vivo* şartlarda onkojenik etki oluşturduğu gösterilmiştir. Farelerde AC dokusunda gelişen tümörlerin *EGFR* mutasyonlu hastalarda görülen AC adenokarsinomlarına benzer histolojide olduğu bildirilmiştir (Ji ve ark., 2006; Politi ve ark., 2006). Bu farelerde, EGFR terapotik hedef olarak kullanıldığında tümör dokusunun regrese olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar mutant *EGFR*'nin tümör gelişiminin hem başlaması hem de devam etmesi için gerekli olduğunu göstermektedir.

Küçük molekülü TKİ'leri gefitinib, erlotinib ve afatinib EGFR'yi hedef alan terapotik ajanlardır. EGFR TKİ'leri, TK'ların otofosforilasyonunu ve ATP bağlanmasını reversibl olarak engellerler. Böylece sinyal akışını bloke ederler. Gefitinib ve erlotinib selektif olarak EGFR'yi hedef alan birinci kuşak EGFR TKİ'leridir. Afatinib hem EGFR hem de HER2 inhibisyonu yapan bir TKİ'dir. *EGFR* mutasyonu olan metastatik NSCLC'de 1. sıra tedavi ajanı olarak 2013'de FDA onay almıştır. EGFR'yi hedef alan monoklonal antikor cetuximab ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

Başlangıçta EGFR TKİ'ne cevap veren NSCLC hastalarının hemen hepsinde direnç gelişir. Bu durum ikinci bir nokta mutasyonuna bağlı olabilir. Örneğin; T790M mutasyonu EGFR TKİ tedavisi sırasında tümör progresyonu görülen hastaların yaklaşık yarısında tanımlanmıştır. Tedavi edilmeyen hastaların tümörlerinde nadiren saptanmıştır. Ayrıca ekzon 20'deki duplikasyon ve/veya insersiyonların EGFR TKİ'ne sensitivitede azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (Sharma ve ark., 2007).

EGFR kazanılmış rezistansının %50'sinden T790M mutasyonları, %15-20'sinden MET overekspresyonu (Bean ve ark., 2007), %5'inden ekzon 20'deki duplikasyonlar ve/veya insersiyonlar ve %25-30'undan bilinmeyen mekanizmalar da sorumludur (Reungwetwattana ve ark., 2012; Cappuzzo ve ark., 2009).

2.2.2.2. HER2 Mutasyonları

HER2 (ERBB2, NEU) onkogeni *EGFR* ailesinin bir üyesidir. Bir TK reseptörü kodlar ve hücre proliferasyonunu regüle eder. HER2 reseptörü güçlü kinaz aktivitesi göstermesine karşın bir ligandı yoktur, diğer HER2 reseptörleriyle homodimerizasyonla veya EGFR ya da HER3 ile heterodimerizasyonla aktive olur (Govindan, 2010). HER2, PI3K/mTOR ve RAS/RAF/MEK yollarını aktive eder. Bir protoonkogen olarak tanımlanmış 20 yıldan fazla süre geçmiştir. İlk olarak meme kanserlerinin yaklaşık %30'unda amplifikasyonu gösterilmiştir (Oxnard ve ark., 2013). *HER2* mutasyonları NSCLC'nin %1.2-4'ünde bildirilmiştir (Shigematsu ve ark., 2005; Stephens ve ark., 2004).

Bildirilen tüm *HER2* mutasyonları ekzon 20'deki insersiyonlardır ve TK domain bölgesine karşılık gelir. Çoğunlukla kodon 774-781 arasındaki 8 kodonu hedef alır (Shigematsu ve ark., 2005). Bu mutasyonlar HER2 kinazın sürekli aktivasyonuna ve AKT, MEK gibi efektörlerin de fosforilasyonuna yol açar. NSCLC'nin %13-20'sinde HER2 ekspresyonu artmıştır. (Oxnard ve ark., 2013). FISH yöntemiyle NSCLC'lerin %2-4'ünde *HER2* amplifikasyonu saptandığı bildirilmiştir (Oxnard ve ark., 2013).

HER2 mutasyon sıklığı sigara içmeyenlerde, kadınlarda, Asya kökenlilerde, adenokarsinom tipi NSCLC'de daha yüksektir. NSCLC'de *HER2*, *KRAS* ve *EGFR* mutasyonlarıyla birlikte görülmediği bildirilmiştir (Stephens ve ark., 2004).

HER2 reseptörü, aktive edici mutasyonu olan hastalarda kanser tedavisinde dikkat çekici bir hedef durumundadır. Anti-HER2 antikorları

(trastuzumab) ve HER2 inhibitörleri (afatinib, neratinib, lapatinib, dacomitinib) ile ilgili klinik çalışmalar halen devam etmektedir.

2.2.2.3. *KRAS* Mutasyonları

Protoonkogenlerin RAS ailesi (HRAS, NRAS ve KRAS) iç plazma membranına lokalize 21 kd'luk proteinlerdir. RAS genlerindeki onkojenik aktive edici mutasyonlar AC kanseri dahil çeşitli kanserlerde yaygındır (Downward, 2003).

KRAS mutasyonları NSCLC'nin %15-25'inde bulunmaktadır (Sequist ve ark., 2011; Reungwetwattana ve ark., 2012).

HRAS, KRAS ve NRAS'ın fonksiyonlarındaki farklılıklar henüz anlaşılamamış olsa da AC kanserinde RAS mutasyonlarının yaklaşık %90'ı *KRAS* mutasyonlarıdır ve mutasyonların yaklaşık %85'i kodon12'yi etkiler (Reungwetwattana ve ark., 2012).

Mutasyonlar kodon 12, 13 ve 61'i etkileyen çeşitli hot spot noktalarda olur ve mutasyonların hepsi de intrinsik GTPaz aktivitesini etkiler (Downward, 2003). *EGFR* mutasyonlarının aksine *KRAS* mutasyonları beyaz ırktan AC adenokarsinomlu hastaların %30'unda, Doğu Asya kökenlilerin de sadece %5'inde saptanmaktadır. (Reungwetwattana ve ark., 2012).

KRAS mutasyonlarının AC kanser patogeneğinde geç dönemde ortaya çıktığı ve (Sugio ve ark., 1994) histolojik tipler içinde adenokarsinomda daha sık görüldüğü, sigara içen ya da tanıdan en az bir yıl önce sigarayı bırakanlarda hiç sigara içmeyenlere göre daha sık saptandığı bildirilmiştir (Mao ve ark., 2010).

KRAS mutasyonlarının negatif prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (Aviel-Ronen ve ark., 2006). AC adenokarsinomlarında moleküler algoritmik yaklaşım olarak önce *KRAS* mutasyonuna bakılması önerilmektedir. *KRAS* mutasyonu saptandığı takdirde başka bir moleküler test yapılmasına gerek olmayacağı, saptanmadığı takdirde *EGFR* mutasyonu ve ALK füzyonu araştırılmasının terapotik yaklaşım açısından faydalı olacağı bildirilmektedir (Horn ve Pao, 2009).

2.2.2.4. ALK Füzyon Genleri

ALK insulin reseptör ailesine ait bir RTK'dır, esas olarak santral sinir sisteminde eksprese olur (Iwahara ve ark., 1997). Bu enzim ilk olarak 1994 yılında (2;5)(p23;q25) yeniden düzenlenmesinin kodladığı bir kimerik protein olarak anaplastik hücreli lenfomada tanımlanmıştır (Morris ve ark., 1995). 2007 yılında akciğer adenokarsinomlu bir hastada tümör dokusunda inv(2)(p21p23) ile oluşan *EML4* ekzon 1-13 ile *ALK*'nın intraselüler kinaz domainine karşılık gelen ekzon 20-29'unun füzyona uğradığı saptanmıştır (Soda ve ark., 2007).

EML4-ALK translokasyonları tüm NSCLC'lerin %3-6'sında bulunur. Adenokarsinomlarda, genç hastalarda ve sigara içmeyenlerde daha yaygındır (Shaw ve ark., 2009; Horn ve Pao, 2009).

NSCLC'de *EML4*'ün farklı trunkasyonlarına sahip nadir *EM4-ALK* varyantları ile *ALK*'nın *TFG*, *KIF5B* ve *KLC1* gibi farklı füzyon partnerleri de tanımlanmıştır (Kruczynski ve ark., 2012).

Bütün bu translokasyonlar *ALK*'nın liganddan bağımsız dimerizasyonuna ve sürekli kinaz aktivitesine yol açar. MAP kinaz, PI3K gibi onkogeneze rol oynayan sinyal yollarında anormal aktivasyona ve hücre proliferasyonu, invazyon ve apoptozun inhibisyonuna neden olur.

EML4-ALK translokasyonları genellikle yaban tip *EGFR* ve *KRAS* bulunan tümörlerde saptanır (Horn ve Pao, 2009).

ALK gen amplifikasyonları da NSCLC tümör örneklerinde bildirilmiştir, ancak bu olgularda anormalliğin saptandığı hücre sayısı çok az olduğu için, onkogenik potansiyeli ve klinik önemi tam olarak bilinmemektedir (Kruczynski ve ark., 2012).

EML4-ALK füzyonlarını bulunduran tümörler *ALK*'nın farmakolojik inhibisyonuna cevap verirler. Bir TKİ olan crizotinib başlangıçta MET inhibitörü olarak geliştirilmiş ve çalışmalar sırasında *ALK*'ya karşı aktivite gösterdiği saptanmıştır. ROS1 inhibisyonu da yapan crizotinib 2011 yılında *ALK* ekspresyonu olan lokal ileri evre yada metastatik NSCLC hastalarında FDA onayı almıştır. Crizotinib ile tedavi edilen olgularda klinik yarar oranı

%85-90, ortalama progresyonsuz geçen süre 9-10 ay olarak bildirilmektedir (Kruczynski ve ark., 2012).

Yeni geliştirilmiş bir ALK inhibitörü olan ceritinib, IGF-1 inhibisyonu yapar, MET'i inhibe etmez. ALK yeniden düzenlenmesi olan ileri evre NSCLC'de etkin olduğu gösterilmiştir. ALK pozitifliği olan ve progresyon gösteren metastatik NSCLC hastalarında ve crizotinibi tolere edemeyen hastalarda kullanımı 2014'te FDA onayı almıştır.

ALK füzyonu pozitif akciğer tümörleri EGFR TKİ gefitinib ve erlotinibe dirençlidir (Horn ve Pao, 2009). NCCN 2012 ve 2013 kılavuzunda metastatik akciğer adenokarsinom tanısı konulan hastalarda *EGFR* mutasyonları ve ALK yeniden düzenlemesine bakılarak tedavinin bu sonuçlara göre sürdürülmesi önerilmektedir.

EML4-ALK translokasyonları FISH (break apart prob kullanılarak), real time PCR, dizi analizi, ALK proteinini hedef alan spesifik antikolar kullanılarak immünohistokimyasal değerlendirme ile analiz edilebilir (Hirsch ve ark., 2010; Mino-Kenudson ve ark., 2010). İmmünohistokimyasal yöntemlerle FISH analizinin birlikte yürütülmesinin daha etkin sonuç verdiği bildirilmektedir (Yi ve ark., 2011).

2.2.2.5. *MET* Amplifikasyon ve Nokta Mutasyonları

Hepatosit büyüme faktörü reseptörü (HGFR) *MET* tarafından kodlanan bir TK reseptörüdür. MET; RAS/RAF/MEK, STAT ve PI3K/AKT/mTOR yolları üzerinden hücre survivali, motilite ve proliferasyonda rol oynar (Birchmeier ve ark., 2003).

HGF/MET sinyal yolağındaki disregülasyon HGF veya MET overekspresyonu, *MET* amplifikasyonu ve mutasyonları aracılığıyla olabilir (Cecchi ve ark., 2012).

MET geni NSCLC'de sıklıkla overekspresedir. MET amplifikasyonu NSCLC'de %4-7 oranında gözlenmektedir ve kötü prognozla ilişkilidir (Alamgeer ve ark., 2013; Cappuzzo ve ark., 2009).

Ayrıca bu genin amplifikasyonu EGFR TKİ'ne sekonder direnç gelişimine yol açmaktadır (Engelman ve ark., 2007). Bean ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada EGFR TKİ'ne kazanılmış direnç gösteren hastaların %21'inde *MET* amplifikasyonu saptanırken EGFR TKİ almayan hastalarda bu oran %3 olarak saptanmıştır (Bean ve ark., 2007).

NSCLC hastalarının %8'inde *MET* ekstraselüler semaforin domainini kodlayan bölgede (E168D, L229F, S323G ve N375S) ve intraselüler jukstamembran domainine karşılık gelen bölgede (R988C, T1010I, S1058P ve ekzon 14 delesyonları) mutasyonları bildirilmiştir. Bu mutasyonlardan bazılarının hücre düzeyinde proliferasyon, motilite ve invazyonu arttırdığı gösterilmiştir. Ancak JM domainindeki R988C ve T1010I mutasyonlarının onkogenezdaki etkileri net olarak ortaya konamamıştır (Cecchi ve ark., 2012; Kong-Beltran ve ark., 2006).

MET yolağı hepatosit büyüme faktörü monoklonal antikoları, *MET* reseptörü monoklonal antikoları veya *MET* TKİ aracılığıyla inhibe edilebilir.

HGF'nin *MET* RTK'na bağlanmasını önlemek amacıyla monoklonal antikolar (onartuzumab, rilotuzumab) ve reseptör inhibitörleriyle (crizotinib, tivantinib) ilgili faz çalışmaları da devam etmektedir (Landi ve ark., 2013).

MET amplifikasyonu EGFR mutant hastaların %10-20'sinde EGFR TKİ'ne direnç gelişiminden sorumlu olduğu için EGFR ve *MET*'in herikisini de hedef alan dual inhibitörlerin geliştirilmesine yönelik prelinik çalışmalar yürütülmektedir.

2.2.2.6. *BRAF* Mutasyonları

B-RAF, hücre proliferasyonunu kontrol eden RAS GTPazlarıyla ve MAPK ailesiyle ilişkisi olan bir serin/treonin kinazdır (Leicht ve ark., 2007).

BRAF RAF kinaz ailesinin 3 üyesinden biridir: ARAF, *BRAF* ve RAF-1 (c-RAF olarak da bilinir) (Maurer ve ark., 2011). Esas olarak melanomlarda tanımlanan *BRAF* mutasyonlarının yaklaşık %80'ini ekzon 15'de T1799A (V600E) oluşturur. Bu mutasyon enzimin inaktif formunu destabilize ederek sürekli kinaz aktivitesine yol açar (Minuti ve ark., 2013). Somatik *BRAF*

mutasyonları NSCLC'lerin %1-3'ünde bulunmaktadır. Melanomlardan farklı olarak NSCLC hastalarında non-Val600Glu mutasyonları içinde kinaz domainindeki Leu596Val mutasyonu ve aktivasyon domaininin G lupundaki Gly468Ala mutasyonu (vakaların %88'i) en sık görülen *BRAF* mutasyonlarıdır (Pao ve Girard, 2011). Marchetti ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 1046 NSCLC hastasının %56,8'inde V600E mutasyonu saptanırken %43,2'sinde non-V600E mutasyonu saptanmıştır (Marchetti ve ark., 2011). Mutant *BRAF*'ın AC adenokarsinom gelişimi için yeterli olduğu ve bu tümörlerin büyümesinin mutant *BRAF* ekspresyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (Paik ve ark., 2011). *BRAF* mutasyonları *EGFR* ve *KRAS* mutasyonlarıyla birlikte bulunmaz. Biyolojik olarak *BRAF* mutasyonları artmış kinaz aktivitesiyle ilişkilidir ve MAPK2 ve MAPK3'ün sürekli aktivasyonuna yol açar.

Çeşitli *BRAF* inhibitörleri halen geliştirilme aşamasındadır. Bir B-*RAF* inhibitörü olarak tasarlanan sorafenib TK reseptörünü de inhibe eden bir multikinaz inhibitörüdür. NSCLC'de monoterapi ve kombinasyon tedavisiyle kullanımında faz çalışmaları devam etmektedir.

2.2.2.7. *AKT1* Mutasyonları

PI3K tarafından aktive edilen protein kinaz B bir serin/treonin kinazdır ve PI3K sinyaline aracılık eder (Testa ve Bellacosa, 2001).

AKT1 genindeki en sık mutasyon Glu17Lys meme, kolon, over kanserleri gibi çeşitli solid tümörlerde tanımlanmıştır (Pao ve Girard, 2011). NSCLC hastalarında *AKT1* mutasyon sıklığı yaklaşık %1 olarak bildirilmektedir. Malanga D ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 105 NSCLC örneğinin %1,9'unda mutasyon saptandığı ve mutasyonların hepsinin skuamoz hücreli karsinomda olduğu bildirilmiştir (Malanga ve ark., 2008).

Glu17Lys mutasyonu *AKT1* plekstrin homoloji domaininde oluşmaktadır. Bu mutasyon ligand bağlayıcı bölgede yapısal değişikliğe ve sürekli kinaz aktivitesine yol açar. Bu mutasyonun protein kinaz B'nin ATP kompetitif inhibitörlerine duyarlılığını değiştirmedığı gösterilmiştir (Carpten ve ark.,

2007). MK2206, protein kinaz B'nin allosterik inhibitörü klinik çalışmalarda test edilmektedir (Yap ve ark., 2011).

2.2.2.8. MEK1 Mutasyonları

MAPKK1 (MAP2K1) bir serin/treonin kinazdır. B-RAF'ın MAPK2 ve MAPK3 efektörlerini aktive eder. Kanserlerde *MAP2K1*'de en sık saptanan mutasyonlar Glu56Pro, Lys57Asn ve Asp67Asn. Bu mutasyonlar proteinin nonkinaz bölümünde bulunmaktadır. Lys57Asn ve Gln56Pro mutasyonları *in vitro* fonksiyon kazancına yol açmaktadır.

MAP2K1 somatik mutasyonları NSCLC hastalarının %0,4-1'inde tanımlanmıştır, çoğu adenokarsinomdur (Marks ve ark., 2008; Sasaki ve ark., 2010).

MAP2K1 mutasyonlarının *EGFR*, *KRAS*, *HER2*, *PIK3CA* ve *BRAF* mutasyonlarıyla birlikte bulunmadığı bildirilmiştir. MEK1/MEK2 inhibitörü olarak geliştirilen selumetinib ve trametinibin NSCLC hastalarında kullanımıyla ilgili faz I ve faz II çalışmaları devam etmektedir (Goldman ve Garon, 2012).

2.2.2.9. ROS1 Mutasyonları

ROS1; 58 TK reseptöründen birisini kodlar ve ligandı bilinmemektedir (El-Deeb ve ark., 2010). İlk olarak 1986'da tanımlanmıştır (Birchmeier ve ark., 1986).

İlk yeniden düzenlenmesi 1987'de glioblastomalarda gösterilmiştir. (Birchmeier ve ark., 1987).

2007'de NSCLC'de, 2011'de kolanjiyokarsinomlarda saptanmıştır. Evrimsel olarak ALK ile ilişkilidir. AC kanserlerinin %2'sinde *ROS1* füzyonları bulunmaktadır (Bergethon ve ark., 2012).

ROS1, *ALK* tirozin kinaz domaini ile %49 sekans homolojisi gösterir. *ALK* füzyonlarında olduğu gibi *ROS1* füzyonları da yıllık 10 paketten az sigara içen hafif sigara içicilerinde ve/veya hiç sigara içmeyenlerde daha

yaygındır. *ROS1* füzyonları ayrıca daha genç yaş ve adenokarsinom histolojik tipiyle de ilişkilidir (Bergethon ve ark., 2012). *In vitro* şartlarda bazı ALK inhibitörlerinin *ROS1*'e karşı aktivite gösterdiği saptanmıştır. ALK yeniden düzenlenmesi olan NSCLC hastalarında ALK/MET kinaz inhibitörü crizotinibin FDA onayı almasıyla birlikte dikkatler *ROS1* yeniden düzenlenmesi olan NSCLC hastalarına yönelmiştir. NCCN 2013 kılavuzunda *ROS1* mutasyonu saptanan NSCLC hastalarının crizotinib ile tedavi edilebileceği bildirilmektedir.

NSCLC'de çeşitli *ROS1* yeniden düzenlenmeleri tanımlanmıştır. Bunlar içinde *SLC34A2-ROS1*, *SDC4-ROS1*, *CD74-ROS1* bulunmaktadır (Davies ve ark., 2012).

ROS1 yeniden düzenlenmesi NSCLC hastalarında diğer onkojenik mutasyonlarla (*EGFR*, *KRAS*, *ALK* gibi) birlikte bulunmamaktadır.

2.2.2.10. RET Mutasyonları

RET protoonkogeninin kodladığı RTK MAPK ve PI3K/AKT dahil çeşitli yollar üzerinden hücre proliferasyonu, diferansiyasyon ve migrasyonda rol oynar. RET (Rearranged during Transfection) proteini dört kaderin benzeri domain ve bir sisteinden zengin bölge, bir hidrofobik transmembran domaini, bir jukstamembran domaini ve bir de katalitik domaininden oluşur. RET enterik sinir sisteminin gelişimi ve böbrek embriyogenezi için gereklidir, normal AC dokusundaki ekspresyon seviyesi düşüktür.

RET gen mutasyonları MENIIA, MENIIB, Hirschsprung hastalığı ve tiroid kanserleriyle ilişkilidir. *RET* onkogeninin çeşitli partner genleriyle olan kimerik formları papiller tiroid kanserinde yürütücü mutasyonlar olarak bilinmektedir (Phay ve Shah, 2010). NSCLC hastalarında da RET füzyon genleri tanımlanmıştır. *CCDC6*, *KIF5B*, *NCOA4* ve *TRIM33* gibi çeşitli füzyon partnerleri bulunmaktadır.

Wang R ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 936 NSCLC hastasının %1,4'ünde RET füzyon geni saptandığı bildirilmiştir (Wang ve ark., 2012).

RET kinaza karşı aktivite gösteren çeşitli TKİ'leri bulunmaktadır ve KIF5B-RET füzyonu taşıyan hücre serilerinde etkinlikleri gösterilmiştir. Vandetanib RET'i de hedef alan bir multikinaz inhibitörüdür ve medullar tiroid kanserinde kullanımı için FDA onay vermiştir. İn vitro ortamda sorafenib, sunitinib ve cabozantinibin RET yeniden düzenlenmelerine karşı aktivitesi gösterilmiştir. RET füzyonlu NSCLC hastalarında cabozantinib ile faz II çalışmaları devam etmektedir (Minuti ve ark., 2013).

2.2.2.11. PIK3CA Mutasyonları

Fosfatidil inozitol 3 kinaz'ın PIP, PI4P, PI4,5P'yi fosforilemek için ATP kullanan 110 kDa katalitik altbirimini kodlar. Somatik mutasyonlarının saptandığı hastalıklar; meme kanseri, kolorektal kanser, mide kanseri, hepatoselüler karsinom, seboreik keratoz, epidermal nevüs, over kanseri, glioblastom, baş ve boyun tümörleri ve lenfomadır. NSCLC'de nokta mutasyonları ve amplifikasyonlarının etkili olduğu bilinmektedir.

2.3. PIK3CA ve Mutasyonları

2.3.1. Fosfatidil İnozitol 3 Kinaz Yapı ve Sınıflaması

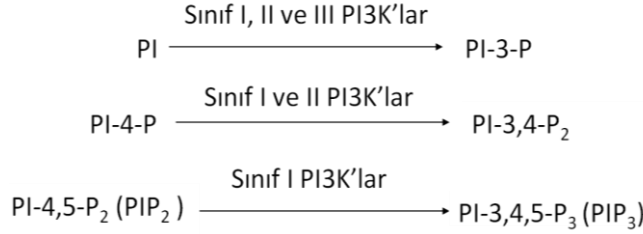
Fosfatidil inozitol 3 kinazlar (PI3K) fosfatidil inozitolü ve fosfoinozitidleri 3'hidroksil grubundan fosforilleyen intrasellüler bir lipid kinaz ailesidir. Birçok intrasellüler sinyal proteini PI3K'ların lipid ürünlerine bağlanma özelliğine sahiptir ve böylece PI3K sinyal yolağında aktif hale gelirler.

PI3K'lar yapısal özellikleri substrat tercihi, doku dağılımı, aktivasyon mekanizması ve fonksiyon açısından farklılık gösteren 3 sınıfa ayrılırlar (Zhao ve Vogt, 2008).

Hücre proliferasyonu ve tümörögenезis açısından en önemli PI3K proteinleri sınıf IA içinde yer alır.

Sınıf I PI3K'lar primer olarak fosfatidil inozitol 4,5 bifosfattan (PIP₂) inozitol 3,4,5 trifosfatı (PIP₃) katalizlerler. Oysa sınıf III PI3K'lar

fosfatidilinozitolinden (PI) fosfatidil inozitol 3 fosfat (PI-3-P) oluştururlar. Sınıf II PI3K'lar ise tercihen *in vitro* şartlarda PI-3-P ve fosfatidil inozitol 3,4 bifosfat oluştururlar.

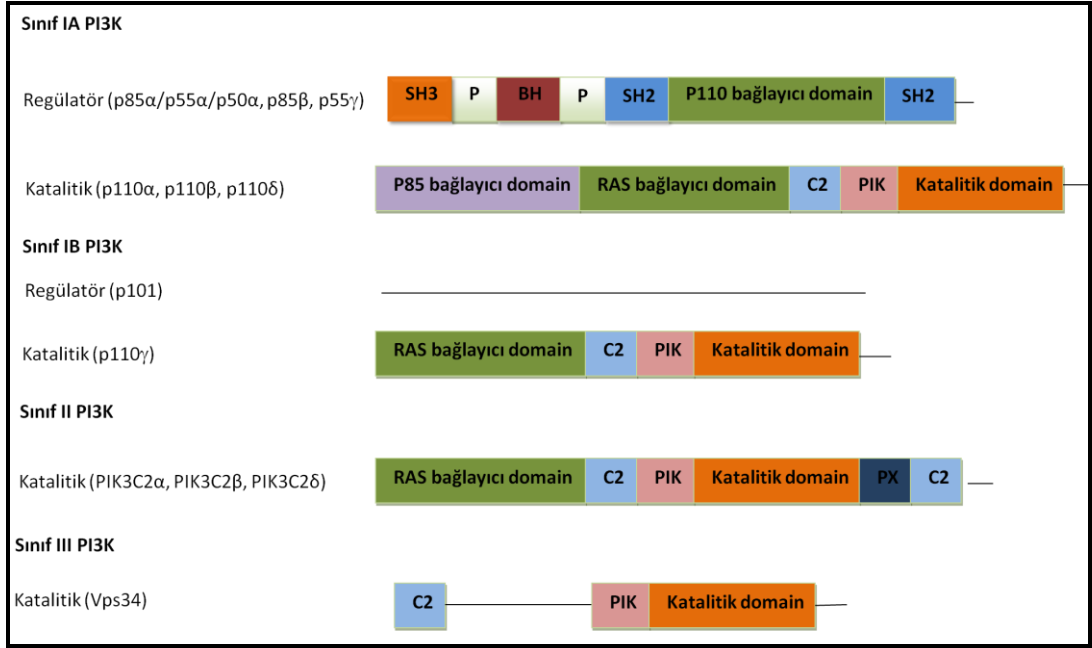


PI3K'ların farklı sınıfları hücre sinyal üretiminde farklı rollere sahiptir, her bir sınıfta farklı izoformlar bulunmaktadır.

Sınıf I PI3K'lar eşleştikleri reseptöre bağlı olarak 2 alt gruba ayrılırlar. Sınıf IA RTK'larla aktive edilir. Sınıf IB ise G proteini ile eşleşen reseptörlerle aktive edilir.

2.3.1.1. Sınıf IA PI3K'lar

Sınıf IA PI3K'lar bir heterodimerdir. Bir p85 regülatör subünit ile bir p110 katalitik subünitten oluşur. Memelilerde her subünitin çok sayıda izoformu bulunmaktadır. *PIK3R1*, *PIK3R2*, *PIK3R3* genleri sırasıyla p85 regülatör subünitin p85 α , p85 β ve p55 γ izoformlarını kodlar. *PIK3R1* geni ayrıca alternatif transkripsiyon başlama bölgeleri aracılığıyla daha kısa izoformlar olan p55 α ve p50 α 'yı kodlamaktadır. Sınıf IA p85 regülatör izoformlarının bir p110 bağlayıcı domainden (inter SH2 domain de denir) oluşan ortak bir çekirdek yapıları vardır, yanında iki Src homolog 2 domain (SH2 domain) bulunur. Daha uzun 2 izoform olan p85 α ve p85 β 'nın SH3 domain ve yanlarında prolinden zengin bölgeler bulunan bir Bcr homolog (BH) domain içeren daha geniş N-terminal bölgeleri vardır (Engelman ve ark., 2006) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. PI3K'ların yapısı

Sınıf IA PI3K'ların RTK aracılığıyla aktivasyonunda p85 regülatör subünit çok önemli rol oynar. P85'in SH2 domaini RTK üzerindeki fosfotirozin rezidülerine bağlanır ya da IRS1 ve IRS2 (insülin reseptör substrat 1 ve 2) gibi aracı fosfoproteinler aracılığıyla p85- RTK etkileşimi gerçekleşir (Fruman ve ark., 1998). Bu bağlanma p85'in p110 üzerindeki bazal inhibitör etkisini ortadan kaldırır.

PIK3CA, *PIK3CB* ve *PIK3CD* genleri sırasıyla p110α, p110β ve p110δ katalitik subünit izoformlarını kodlar. Bu izoformların hepsi de aynı temel yapıya sahiptir. P85 regülatör subünitiyle etkileşimi olan N-terminal p85 bağlayıcı domain, RAS bağlayıcı domain, C2 domain, fosfatidil inozitol kinaz homoloji domain (PIK) ve bir C-terminal katalitik domainleri vardır (Engelman ve ark., 2006).

P110α'nın kristal yapısı henüz saptanmamıştır ancak p110γ izoformunun bilinen yapısı baz alınarak bir model geliştirilmiştir (Walker ve ark., 1999). Bu modele göre p110α; p85'e bağlanan bir N-terminal domain, bir RAS bağlayıcı domain, bir C2 domain, bir helikal domain ve bir C-terminal kinaz domaininden oluşur.

2.3.1.2. Sınıf IB PI3K'lar

Sınıf IB PI3K'lar da sınıf IA'lar gibi bir heterodimerdir, p101 regülatör subünit ve p110 γ katalitik subünitinden oluşur. Sınıf IB PI3K'ların p85 regülatör subünitleri bulunmadığı için RTK'lar tarafından aktive edilmezler. Yalnızca G proteini ile eşleşmiş reseptörlerin G $\beta\gamma$ subünitleriyle direkt etkileşimle uyarılırlar (Engelman ve ark., 2006).

P101 regülatör subünit p101-p110 γ heterodimerlerin G $\beta\gamma$ tarafından aktivasyonunu kolaylaştırır. p110 γ sınıf IA P110 proteinleriyle benzer yapı gösterir ancak p101 p85 proteinlerinden oldukça farklıdır (Katso ve ark., 2001).

2.3.1.3. Sınıf II PI3K'lar

Bu sınıfın üyeleri sadece p110 benzeri katalitik subünitten oluşur (Katso ve ark., 2001).

Sınıf II'lerin memelilerde bilinen 3 üyesi vardır. Bunların sinyal iletimindeki ve diğer fizyolojik mekanizmalardaki rolleri tam olarak bilinmemektedir. PIK3C2 α ve PIK3C2 β daha geniş bir doku dağılımı gösterirken PIK3C2 γ 'nın dağılımı daha sınırlıdır. *In vitro* şartlarda bu enzimler daha çok fosfatidil inozitolü, daha az oranda da fosfatidil inozitol 4 fosfatı katalizler (PI-4-P). PI-4,5-P₂ bu enzim için zayıf bir substrattır.

2.3.1.4. Sınıf III PI3K'lar

Sınıf III PI3K'ların tek üyesi vardır: Vps34 (vacuolar protein sorting defective 34) Vps34 ilk olarak mayada golgiden vakuole vezikül trafiği için gerekli gen ürünü olarak tanımlanmıştır (Odorizzi ve ark., 2000).

Vps34'ün mTOR aktivitesini regüle ettiği bildirilmektedir. Vps34 otofajiyle de ilişkilidir (Wurmser ve Emr, 2002).

Sınıf I PI3K'lar insan kanseriyle en çok ilişkisi olan en iyi tanımlanmış sınıftır. Sınıf I PI3K'lar memelilerde bütün hücrelerde bulunur, p110 δ ve

p110 γ özellikle lökositlerde fazladır. Sınıf II ve sınıf III PI3K'ların spesifik fonksiyonlarıyla ilgili bilinenler daha azdır.

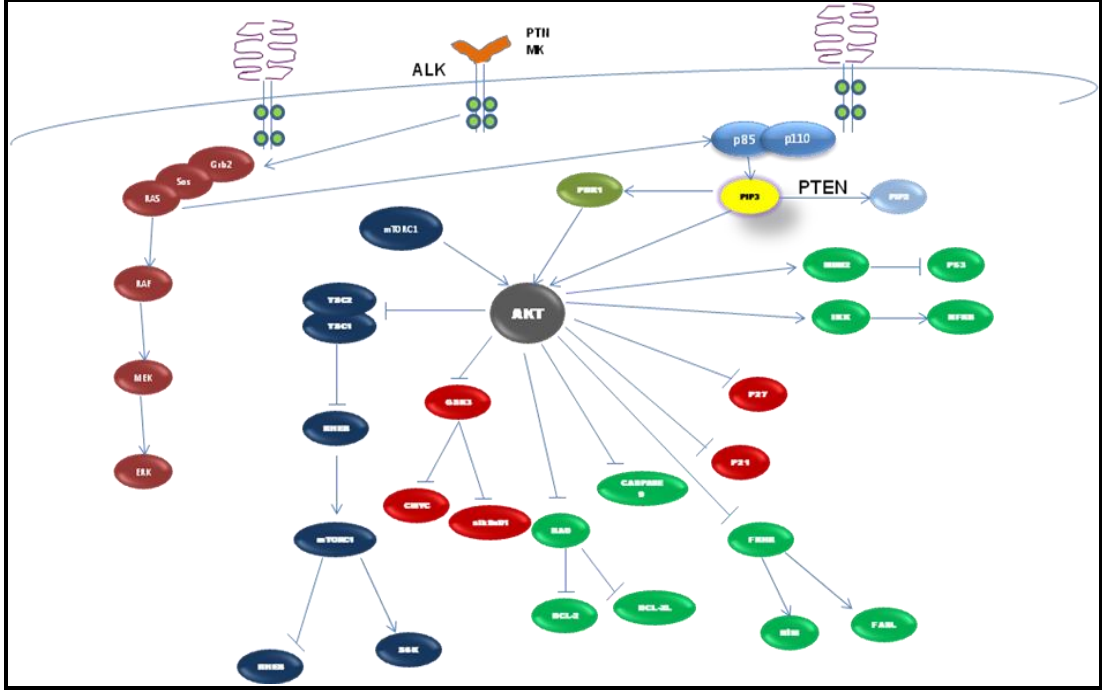
2.3.2. PI3K Sinyal Yolağı

Spesifik büyüme faktörleri reseptörlerine bağlandığı zaman çeşitli mediyatörler aracılığıyla bazı sinyal yolakları aktive olur. Bunlar içinde en önemlileri PI3K/AKT/mTOR ve RAS/RAF/MEK/ERK yolaklarıdır. Bu sinyal yolaklarının aktivasyonu sayesinde hücre proliferasyonu uyarılır, apoptoz engellenir ve hücre migrasyonu artar. RTK'lardan başlayan PI3K yolağında farklı molekülleri hedef alan farmakolojik inhibitörlerin geliştirilmesi ve bu alanda yapılan yoğun çalışmalar kanser tedavisinde ümit vadeden sonuçlar doğurmaktadır (Engelman, 2009; Liu ve ark., 2009).

PI3K aktivasyonu en az 3 bağımsız yolla olabilir. Bunların hepsi de RTK'a ligand bağlanmasıyla başlar. Bu bağlanma RTK üzerindeki tirozin rezidülerinin otofosforilasyonuna yol açar. Bunlar da RTK'nın SH2 domaini içeren moleküllerle etkileşmesini sağlar. PI3K aktivasyonunun birinci yolu p85'in SH2 domaini aracılığıyla RTK üzerindeki fosfo-YXXM motiflerine bağlanmasıdır. Diğer bir yol da adaptör proteinleri aracılığıyla olur. Bunlar RTK üzerindeki fosfo-YXN motiflerine bağlanırlar daha sonra da p85'e bağlanarak PI3K'ı aktive ederler. 3. yol da RAS aracılığıyla olmaktadır. GRB2 adaptör proteini RTK'a bağlanır ve ardından SOS'a (son of sevenless) bağlanarak aktive eder. SOS bir GEF'tir (guanine nucleotide exchange factor) ve RAS'ı aktive eder, o da p85'den bağımsız olarak p110'u aktifler. Farklı fizyolojik durumlarda bu yolaklardan hangisinin baskın olduğu bilinmemektedir.

PI3K aktive olunca fosfatidilinozitol 4,5 bifosfatın (PIP2) fosforilasyonu ile fosfatidilinozitol 3,4,5 trifosfat (PIP3) oluşur (Şekil 2.5). PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) PI3K'nın direkt antagonistidir. PTEN; 3' fosfataz olarak fonksiyon görür ve tümör supresör etkisinden bu fonksiyonunun sorumlu olduğu bilinmektedir. PIP3'ü PIP2'ye defosforile ederek PI3K aktivitesini tersine çevirir. Böylece

PI3K sinyalinin negatif regülatörü olarak rol oynar. PIP3 proteinlerin PH (plecstrin homology) domainlerine bağlanarak onları hücre membranına getirir.



Şekil 2.5. PI3K/AKT sinyal yolağı

PI3K yolağının en önemli mediyatörlerinden birisi AKT'tır. AKT bir serin/treonin kinazdır, protein kinaz B olarak da bilinir. AKT1, AKT2 ve AKT3 şeklinde 3 izoformu bulunur ve tüm vücutta yaygın şekilde eksprese olurlar. AKT1 hücre yaşamı ve büyümeyle ilişkiliyken AKT2 daha çok invazyonda rol oynar. AKT2 ve AKT3 insüline hücresel cevapta önemli rol oynarlar özellikle AKT2'deki fonksiyon kayıplarının diyabet fenotipine yol açtığı gösterilmiştir (George ve ark., 2004).

AKT, PH domainine bağlanan PIP3 tarafından plazma membranına getirilir ve burada PDK1 (3 phosphoinositide dependent kinase1) tarafından treonin 308 ve mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) tarafından da serin 473'ten fosforillenerek aktive edilir. AKT'ın tam aktivasyonu için bu ikili fosforilasyon gereklidir. Aktive olduktan sonra

hücrenin büyümesi, hayatta kalması ve proapoptotik sinyallerin baskılanmasına aracılık eder.

AKT, FOXO (forkhead box O transcription factors), BAD (BCL2 associated agonist of cell death) ve GSK3 (glycogen synthase kinase 3) gibi çeşitli intrasellüler proteinleri fosforilleyerek hücre siklusunun ilerlemesini ve hücrenin yaşam süresinin uzamasını sağlar. BCL2 ailesinin proapoptotik üyesi olan BAD, antiapoptotik BCL-XL ile nonfonksiyonel bir heterodimer oluşturur ve BCL-XL'nin antiapoptotik etkisini engeller. BAD AKT tarafından fosforillenince BCL-XL ile heterodimer oluşturamaz. AKT fosforilasyonla kaspaz 9'un katalitik aktivitesini inhibe eder. Kaspaz 9 apoptozun başlatıcı kaspazlarından biridir. Kaspaz 9 inhibisyonu apoptozla sonuçlanacak proteolitik kaskadın aktifleşmesini engeller. AKT ayrıca FKHR'yi (forkhead related transcription factor complex) fosforile ederek nükleusa geçişini önler ve BIM, FAS ligand gibi proapoptotik proteinlerin genlerinin aktivasyonu önlenir.

AKT hücre ölümünün 2 santral regülatörü olan NFkB ve p53'ü indirekt etkileyerek hücre survivalını etkilemektedir. NFkB bir transkripsiyon faktör kompleksidir, çeşitli apoptotik stimuluslara cevap olarak hücrenin hayatta kalmasını sağlar. AKT IKK'ları (I λ B kinaz) aktive ederek NFkB fonksiyonu üzerinde pozitif etki yapar. IKK NFkB inhibitörünü degrade eder. NFkB sitoplazmada serbestleşir, nükleusa transloke olur ve hedef genleri aktive eder.

AKT ayrıca proapoptotik tümör supresör p53'ün aktivitesini de etkiler. Bunu p53 bağlayıcı protein MDM2'nin (murine double minute 2) fosforilasyonu aracılığıyla yapar. MDM2 E3 ubiquitin ligaz aktivitesi aracılığıyla p53'ü proteozomlar aracılığıyla degrade eder. Fosforillenmiş MDM2 P53'ü bağladığı yer olan nükleusa daha etkin transloke olur ve sonuçta p53'ün degradasyonu artar.

AKT siklin bağımlı kinaz inhibitörleri p27 ve p21'i fosforilleyerek inhibe eder (Liang ve ark., 2002).

P27Kip1 bir hücre siklus regülatör proteinidir. Siklin D'ye (siklin-cdk4 kompleksi) bağlanarak hücre siklusunun G1'e ilerlemesini önler. P21 bir siklin

bağımlı kinaz inhibitörüdür. Siklin-cdk2 ve cdk4 komplekslerine bağlanarak bunları inhibe eder. Bu nedenle G1 fazında hücre siklus progresyonunun regülatörü olarak fonksiyon görür. AKT p27 ve p21'in sitozolik sekestrasyonuna yol açarak nükleusa geçmesini önler. AKT p27 ekspresyonunu FOXO transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonu aracılığıyla da inhibe eder (Medema ve ark., 2000).

GSK3 tarafından G1 siklinleri siklin D ve siklin E ile C-MYC transkripsiyon faktörünün fosforilasyonu bu proteinlerin degradasyonuna yol açar. Bu proteinler hücrenin G1-S fazına geçişinde önemli rol oynar (Welcker ve ark., 2003). GSK3 inhibisyonu bu proteinlerin stabilizasyonuna yol açar.

TOR (target of rapamycin) hücrelerde iki farklı multiprotein kompleksi içinde bulunur. Memeli hücrelerinde mTOR kompleks 1 (MTORC1) raptor proteini içerir, bu kompleks rapamisine duyarlıdır. Ribozom üretimi ve protein sentezini uyarmak, protein degradasyonunu azaltmak suretiyle hücre büyümesini uyarır. Kompleks 1 hem hücre büyümesini hem de besin alımı ve metabolizmayı uyararak hücrenin yaşam süresini uzatır.

mTOR kompleks 2 (MTORC2) rictor proteini içerir ve rapamisine duyarsızdır. AKT'ın aktivasyonuna yardımcı olur, Hücre iskelet organizasyonundan sorumludur. mTOR kompleks 1 büyüme faktörleri ve aminoasitler gibi çeşitli ekstrasellüler sinyalleri entegre eder. Bunlar hem mTOR'un aktivasyonuna hem de hücre büyümesine katkıda bulunur.

TSC1 (hamartin) ve TSC2 (tuberin)'nin oluşturduğu bir kompleks RHEB (RAS homolog enriched in brain)'in aktivitesini inhibe eder. Bu protein mTORC1 aktivasyonu için gereklidir. AKT'ın TSC2'yi fosforillemesi RHEB'i inhibe halden kurtarır. RHEB GTP bağlı aktif formdayken direkt olarak mTORC1'i aktive eder. Bu aktivasyon normal dokularda RTK'ların uyarılmasıyla akut ve geçici olarak meydana gelir. Fakat *PTEN* ya da *PIK3CA* mutasyona uğradığında (kanserlerde) ya da tuberin ya da hamartin yapısı bozuk olduğunda (tuberoskleroz hastalarında) aktivasyon kronik hale gelir. MTORC1 de S6K (P70S6K) ve 4EBP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1)'i fosforilleyerek protein sentezini artırır.

PI3K sinyalinin sonlandırılması en az 2 farklı fosfataz aracılığıyla gerçekleşir. SH2(Src-homolgy-2) içeren fosfatazlar (SHIP1 ve SHIP2) inozitol halkasını 5. pozisyonundan defosforile ederek PI(3,4)P2 oluştururlar (Cantley, 2002). Diğer bir fosfataz olan PTEN ise inozitol halkasını 3. pozisyonundan defosforile ederek PI(4,5)P2 oluşturur. PTEN fonksiyon kaybı insanlardaki ileri evre kanserlerin büyük bir kısmında görülmektedir. Bu durum kontrolsüz PI3K sinyalinin metastatik kanserlere olan katkısını ortaya koymaktadır.

2.3.3. PI3K Sinyal Yolağı ve Kanser

PI3K sinyal yolağı insan kanserlerinde sıklıkla aktive haldedir (Fresno Vara ve ark., 2004; Courtney ve ark., 2010; Samuels ve Ericson, 2006). Bu PI3K'in kendisindeki değişikliklerden, aşağı yolaktaki hedefi AKT'tan veya onun antagonisti PTEN'den kaynaklanıyor olabilir. Çeşitli tümörlerde AKT amplifikasyona uğramıştır veya ifadesi artmıştır. Bazı tümörlerde ise yüksek seviyede fosforilasyon gösterir (Hennessy ve ark., 2005).

PI3K'in kanserle ilişkisi uzun zamandır bilinmektedir. Bu ilişkiyle ilgili ilk kanıt fosfatidil inozitol kinaz aktivitesinin, viral onkoproteinler olan Rous sarcoma virusun Src proteini ve polyoma virusun middle T proteini ile ilişkisinden elde edilmiştir (Kaplan ve ark., 1986; Sugimoto ve ark., 1984). Bu etkileşim PI3K'in p85 regülatör subüniti aracılığıyla sağlanır. Buradaki SH2 domainleri viral onkoproteinlerin üzerindeki fosfotirozinlere bağlanır ve p110 α katalitik subunitini bu komplekslere getirir (Klippel ve ark., 1992; Hu ve ark., 1992). Aynı protein-protein etkileşim domainleri p85 ve ona yapışık p110 α 'yı aktif tirozin kinaz reseptörlerine bağlar.

PI3K'ların onkojenitesiyle ilgili en kesin kanıt avian retrovirus ASV16 ile yapılan çalışmalarda elde edilmiştir (Chang ve ark., 1997). İnsan meme epitelyum hücre kültüründeki çalışmalarda onkojenik potansiyeli gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2003).

Sınıf I PI3K katalitik subünitleri 4 izoformdan oluşur: α , β , δ , γ (Engelman ve ark., 2006).

Alfa izoformu kanserle sıkı ilişkili olsa da diğer izoformların kanserle ilişkisine dair çok fazla kanıt elde edilememiştir. PI3K ailesinin hücre proliferasyonunda asıl rol oynayan katalitik subünitin p110 α izoformudur ve *PIK3CA* (3q26) tarafından kodlanır. Çok sayıda kanser çeşidinde mutasyonu bildirilmiştir (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>; Ligresti ve ark., 2009).

PIK3CA fonksiyon kazancı mutasyonları *in vitro* enzimatik fonksiyon kazancına yol açar ve büyüme faktörü yokluğunda protein kinaz B sinyal yolağını aktive ederek onkojenik hücresel transformasyonu indükler. Dolayısıyla da bir terapötik hedef potansiyeli taşımaktadır.

PIK3CA fonksiyon kazancı mutasyonlarının çoğu iki hot spot bölgede kümelenmiştir. Bunlar ekzon 9 ve 20'dir. Bunlar farklı mekanizmalarla enzimatik aktiviteyi artırır (Zhao ve Vogt, 2010).

P110 α mutasyonlarının %80'i tek aminoasit değişikliği ile karakterize hot spot mutasyonlardan biridir. Bunlar dışında çok sayıda nadir mutasyonlar da bildirilmiştir. *PIK3CA*'da 80'den fazla kanser spesifik mutasyon tanımlanmıştır. Lokalizasyonları RAS bağlayıcı domain hariç genin bütün kodlayan sekansına yayılmış olsa da en sık helikal (ekzon 9) ve kinaz (ekzon 20) domainleri ile p85 bağlayıcı bölgede (ekzon 1 ve 2) bulunurlar. Ekzon 20'deki mutasyonlar (H1047R) enzimatik aktivitenin sürekliliğine yol açar. Ekzon 9'daki mutasyonlar (E542K ve E545K) ise p85'in N-terminal SH2 domaini ile p110 katalitik subüniti arasındaki inhibitör etkileşimin bozulmasına neden olur (Şekil 2.6) (Miled ve ark., 2007; Zhao ve Vogt, 2010).

Bu gendeki mutasyonlar NSCLC'de %2-4 oranında saptanmaktadır (Samuels ve ark., 2004; Lee ve ark., 2010; Sequist ve ark., 2011).

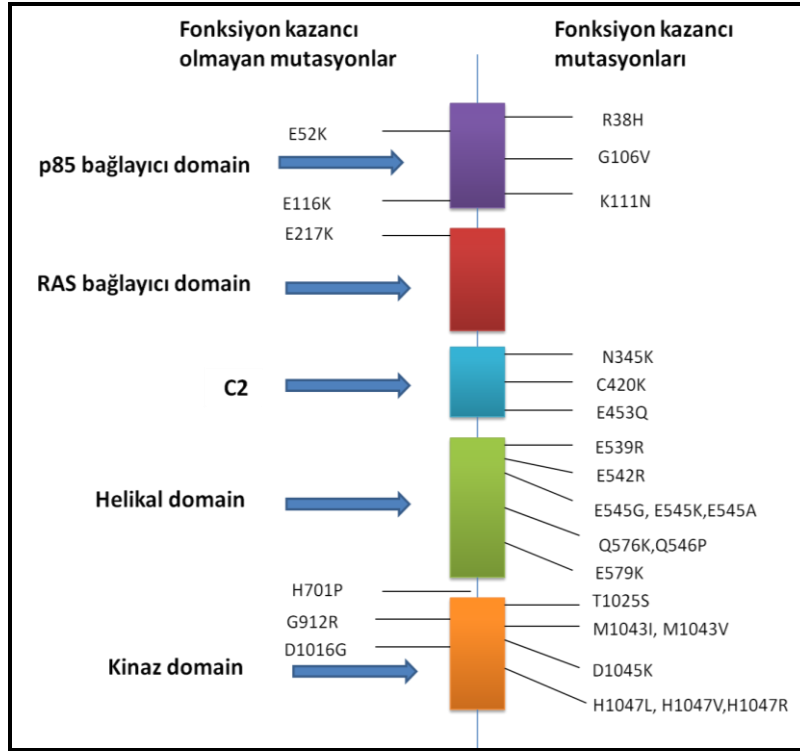
PIK3CA mutasyonlarına ilave olarak *PIK3CA* amplifikasyonları da NSCLC'de sık gözlenir ve PI3K/AKT sinyal yolağı aracılığıyla tümörogeneze yol açar (Ji ve ark., 2011).

Daha çok skuamoz hücreli karsinomda olmak üzere AC kanserlerinin %20-30'unda *PIK3CA* amplifikasyonu saptandığı bildirilmiştir (Ji ve ark., 2011; Okudela ve ark., 2007).

PIK3CA amplifikasyonu NSCLC hastalarında özellikle erkek, sigara içenlerde ve skuamoz hücreli karsinomda daha siktir (Okudela ve ark., 2007).

P110 α mutasyonlarının varlığı PI3K sinyal yolağında artışa yol açacak diğer genetik değişiklikleri dışlamaz. *PIK3CA*'nın sigarayla ilişkili kanser patogeneğinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Lee ve ark., 2010).

EGFR, *KRAS* mutasyonlarından farklı olarak *PIK3CA* mutasyonlarının sıklığında etnik gruplar arasında farklılık bildirilmemiştir (Lee ve ark., 2010; Maruyama ve ark., 2007; Kawano ve ark., 2006).



Şekil 2.6. p110 α mutasyonları (Vogt ve ark., 2007).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışma 40 adet NSCLC tümör dokusundan elde edilmiş DNA örneği üzerinde gerçekleştirilmiştir. DNA örnekleri, hastaların aydınlatılmış onamları alındıktan sonra “NSCLC’de *EGFR*, *KRAS* ve *BRAF* mutasyonları” başlıklı retrospektif araştırma kapsamında incelenen dokulardan elde edilerek saklanan örneklerdir. Hastaların demografik, klinik özellikleri ile *EGFR*, *KRAS* ve *BRAF* mutasyon durumları Tablo 3.1’de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. *PIK3CA* mutasyonu araştırılan olguların demografik, klinik özellikleri ile *EGFR*, *KRAS* ve *BRAF* mutasyon durumları.

Hasta No	Yaş/Cinsiyet	Evre	Sağ Kalım Süresi	Daha önce saptanmış mutasyonlar		
				<i>EGFR</i>	<i>BRAF</i>	<i>KRAS</i>
1	62E	IV	10 ay			
2	46K	Lokal ileri	26 ay			
4	49E	Lokal ileri	-			
5	70K	Lokal ileri	59 ay	Ekzon 19 delesyonu		
6	81K	Lokal ileri	16 ay			
7	59E	IV	15 ay			
11	37K	IV	8 ay			
12	55K	IV	7 ay			
13	59E	IV	2 ay			
14	49E	Lokal ileri	15 ay			
16	62E	Lokal ileri	-		V600E	
18	59E	Lokal ileri	-			
20	60E	Lokal ileri	10 ay			
22	59K	Lokal ileri	-			
23	44K	IV	-	Ekzon 19 delesyonu		
24	65E	Lokal ileri	-			
25	63E	IV	4 ay			
26	52K	Lokal ileri	-			
27	58E	Lokal ileri	26 ay			
28	49E	IV	9 ay			
30	70E	IV	3 ay			
31	70E	IV	-			
32	71E	IV	4 ay			
33	50E	IV	-			

Tablo 3.1. Devam.

34	67E	IV	10 ay			
35	58K	IV	-			
36	75E	IV	3 ay			
37	69E	Lokal ileri	16 ay			
39	41K	IV	27 ay			
40	67E	IV	32 ay			
41	53K	IV	28 ay			Kodon 61
42	57E	Lokal ileri	17 ay			Kodon 61
43	76E	Lokal ileri	13 ay			
44	42K	IV	46 ay			
45	51E	Lokal ileri	-			
47	59E	Lokal ileri	22 ay			
48	53K	IV	-			
51	64E	Lokal ileri	-			
52	44K	IV	-			
53	71E	IV	6 ay			

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA İzolasyonu

DNA miktarı yeterli olmayıp doku örneği mevcut olan örneklerden parafin dokudan DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, Katalog no: 56404, Lot no: 142357372) kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA örnekleri kantite edilmiştir.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PIK3CA genine ait 20 ekzon ekzon-intron birleşme bölgelerini kapsayacak şekilde 20 fragman halinde çoğaltılmıştır (Samuels Y ve ark., 2004). Primer dizileri ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonrası elde edilen ürün uzunlukları da Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. PCR’de kullanılan primer dizileri ve ürün uzunlukları.

Primer adı	Primer nükleotid dizisi	Ürün uzunluğu
Ekzon 1F	GTTTCTGCTTTGGGACAACCAT	526
Ekzon 1R	GATTACGAAGGTATTGGTTTAGACAG	
Ekzon 2F	TCATCAAAAATTTGTTTTAACCTAGC	485
Ekzon 2R	TATAAGCAGTCCCTGCCTTC	
Ekzon 3F	GCAGCCCGCTCAGATATAAAC	539
Ekzon 3R	CTGGGCGAGAGTGAGATTCC	
Ekzon 4F	TCTTGTGCTTCAACGTAAATCC	561
Ekzon 4R	CGGAGATTTGGATGTTCTCC	
Ekzon 5 F	TAGTGGATGAAGGCAGCAAC	399
Ekzon 5 R	TTTGTAGAAATGGGGTCTTGC	
Ekzon 6 F	TGCCTTTTCCAATCAATCTC	415
Ekzon 6 R	AATTCCTGAAGCTCTCCCAAG	
Ekzon 7 F	GGGGAAAAAGGAAAGAATGG	451
Ekzon 7 R	TGCTGAACCAGTCAAACCTCC	
Ekzon 8 F	TTTGCTGAACCCTATTGGTG	400
Ekzon 8 R	TTGCAATATTGGTCCTAGAGTTC	
Ekzon 9 F	GATTGGTTCTTTCCTGTCTCTG	487
Ekzon 9 R	CCACAAATATCAATTTACAACCATTG	
Ekzon 10 F	ACCTTTTGAACAGCATGCAA	282
Ekzon 10 R	TGGAAATAATGTAAAGGGTGTTTTT	
Ekzon 11 F	AAAACACCCTTAACATTATTTCCATAG	514
Ekzon 11 R	TCTGCATGGCCGATCTAAAG	
Ekzon 12 F	TTTATTCTAGATCCATACTTCCTTT	432
Ekzon 12 R	AAAGTTGAGAAGCTCATCACTGGTAC	
Ekzon 13 F	CTGAAACTCATGGTGGTTTTG	468
Ekzon 13 R	TGGTTCCAAATCCTAATCTGC	
Ekzon 14 F	GAGTGTTGCTGCTCTGTGTTG	415
Ekzon 14 R	TTGAGGGTAGGAGAATGAGAGAG	
Ekzon 15 F	GGATTCCTAAATAAAAATTGAGGTG	430
Ekzon 15 R	CATGCATATTTCAAAGGTCAAG	
Ekzon 16 F	TTGCTTTCCTGAAGTTTCTTTTG	376
Ekzon 16 R	TCAAGTAAGAGGAGGATATGTCAAAG	
Ekzon 17 F	GGGGAAAGGCAGTAAAGGTC	444
Ekzon 17 R	CATCAAATATTTCAAAGGTTGAGC	
Ekzon 18 F	TCCTTATTCGTTGTCAGTGATTG	431
Ekzon 18 R	GTCAAAACAAATGGCACACG	
Ekzon 19 F	CATGGTGAAAGACGATGGAC	401
Ekzon 19 R	TTACAGGCATGAACCACCAC	
Ekzon 20F	TGGGGTAAAGGGATCAAAAG	525
Ekzon 20R	CCTATGCAATCGGTCTTTGC	

3.2.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kimyasal Karışımları

Primerler ve kalıp dışındaki gerekli diğer kimyasallar için Amplitaq Gold® PCR master mix 2x (Applied Biosystems, katalog no: 4318739, lot no:P18315) kullanılmıştır. *PIK3CA* geninin tüm fragmanları için touchdown (TD) PCR yapılmıştır. PCR SuperCycler SC-200 (Kyratec) cihazında gerçekleştirilmiştir. PCR'da kullanılan kimyasalların miktarları Tablo 3.3'de verilmiştir. TD PCR'de kullanılan sıcaklık ve süreler Tablo 3.4'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. PCR'da kullanılan kimyasalların miktarları.

Kimyasal	Hacim
DNA (17ng/ µl)	1 µl
Forward primer (10pm/ µl)	1 µl
Reverse primer (10pm/ µl)	1 µl
H ₂ O	9,5 µl
Amplitaq Gold PCR master mix 2x	12,5 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.4. TD PCR'da uygulanan sıcaklık ve süreler.

	Sıcaklık	Süre	
1	94°C	4 dk	13 Siklus
2	94°C	1 dk	
3	66°C	1 dk	
	-1.0°C		
4	72°C	1 dk	30 Siklus
5	94°C	1 dk	
6	53°C	1 dk	
7	72°C	1 dk	
8	72°C	7 dk	
9	10°C	∞	

3.2.3. Jel Elektroforezi

Elde edilen PCR ürünleri jel elektroforezinde yürütülmüştür. Bu amaçla 54 gr *Tris base*, 27,5 gr Borik asit ve 20 mL 0,5 mM EDTA karıştırılarak dH₂O ile 1 litreye tamamlanarak hazırlanan 5XTBE, 1X TBE olacak şekilde 1:4 oranında dilüe edilmiştir. 60 cc 1XTBE ve 1,2 gr agarose D1-LE erlenmayerde karıştırılarak, oluşan çözelti mikrodalga fırında orta (medium) ayarda 2 dakika ısıtılmıştır. Eriyen jel içine 1 µl ethidium bromide eklenerek karıştırılmıştır. Jel, elektroforez aparatına dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Elektroforez tankı (Cleaver Scientific Ltd.) 1x TBE ile doldurularak jel yürütme işlemine hazır hale getirilmiştir. PCR sonrası 10 µl PCR ürünü, 2 µl 6x yükleme tamponu (0,025 gr bromfenol mavis, 0,025 gr ksilen siyanol ve 0,3 mL gliserol karıştırılıp dH₂O ile 1 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır) ile karıştırılıp, karışımın 10 µl'si agaroz jele yüklenmiştir. 90 volt (V)'da 40 dakika elektroforez uygulanmıştır. Jel, *Kodak Gel 200* cihazında görüntülenerek, Kodak 1D Image Analysis Software (Rochester, New York) kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen bantların boyları, GeneRuler 50bp DNA Ladder (ThermoScientific) kullanılarak kontrol edilmiştir.

3.2.4. PCR Sonrası Temizleme

PCR sonrası temizleme işlemi için, ExoSAP-IT (GML) enzimatik temizleme ürünü kullanılmıştır. Protokol doğrultusunda 5 µL PCR ürünü, 2 µl ExoSAP-IT reaktifiyle karıştırılmıştır. Karışım 37°C'de 15 dakika; 80°C'de 15 dakika inkübasyona tabi tutularak temizleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 Sekans Reaksiyonu

PCR ürünleri temizlendikten sonra sekans reaksiyonu uygulanmıştır. İşlem için hazırlanan kimyasal karışım ve sekans reaksiyonunda uygulanan sıcaklık ve süreler Tablo 3.5 ve 3.6'da gösterilmektedir.

Tablo 3.5. Sekans reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve miktarları.

Kimyasal	Hacim (µl)
ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100	1
ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer	2
Forward/Reverse Primer (1pm/ µl)	1
Kalıp	2
dH ₂ O	10 µl'ye tamamlanır.
Toplam hacim	10 µl

Sekans reaksiyonunda uygulanan sıcaklık ve süreler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 3.6. Sekans reaksiyonunda uygulanan sıcaklık ve süreler

Sıcaklık	Süre
96 °C	2 dk
96 °C	10 s
50 °C	5 s
60 °C	4 dk
4 °C	∞

30 siklus

3.2.6 Sekans Reaksiyonu Sonrası PCR Ürünü Temizleme

13 mL steril distile suya, 1 gr Sephadex® G-50 medium (Sigma-Aldrich) eklenerek karıştırılmıştır. Yeni hazırlanan sefadeks, ilk kullanımdan önce 30 dakika bekletilmiştir. +4°C'de saklanmıştır. Sekans PCR ürününü temizlemek amacıyla spin kolonlara 700 µL Sephadeks aktarılarak 5200 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolonlar temiz ve numaralandırılmış yeni tüplere yerleştirilip, sekans reaksiyonu sonrası elde edilen 10 µL'lik PCR ürünleri, spin kolonlardaki sephadeksin orta kısmını bırakılmıştır. Spin kolonlar, 5200 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek ürün temizleme işlemi tamamlanmıştır.

3.2.7 Dizi Analizi

Dizi analizi, Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer cihazı kullanılarak yapılmıştır. Temizlenen 10 µL'lik PCR ürünleri, 96-Well Plate üzerindeki kuyulara bırakılarak karıştırılmıştır. *Plate* bileşenleri doğru bir şekilde bir araya getirilerek *autosampler* üzerinde B pozisyonuna yerleştirilmiştir. 3130POP7_BDTv3-KB-Denovo-v5.2 analiz protokolü kullanılarak elektroforez gerçekleştirilmiştir. Mutasyon değerlendirmesi için SeqScape version 2.5 ve Sequencing Analysis version 5.1 yazılımları kullanılmıştır.

Projeye dahil edilen 40 örnekte değerlendirilen ekzonlar Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7. Değerlendirilen ekzonlar

Örnek No	Çalışılan Ekzonlar	Örnek No	Çalışılan Ekzonlar
T1	1-20	T30*	1, 12, 20
T2**	9	T31*	20
T4*	1, 2, 8-10, 16,17	T32**	9
T5	1-20	T33	1-20
T6	1-20	T34*	2, 12, 20
T7*	2 ve 9	T35	1-20
T11*	1 ve 2	T36*	2, 12, 20
T12	1-20	T37*	12 ve 20
T13**	9	T39*	2, 9, 20
T14	1-20	T40*	2, 5-12, 15-20
T16*	1-17, 19	T41*	2, 9, 12
T18	1-20	T42	1-20
T20*	1-3, 5-12, 14-20	T43*	1, 9, 11, 12, 20
T22*	1, 2, 9, 12	T44	1-20
T23	1-20	T45*	1-5, 7-12, 14-20
T24**	9	T47*	2
T25**	9	T48	1-20
T26*	1, 2, 12, 20	T51*	1, 2, 9, 20
T27	1-20	T52	1-20
T28*	2 ve 12	T53*	9

*DNA kalitatif ve kantitatif açıdan yeterli olmadığı için diğer ekzonlar çalışılamamıştır.

**Kanserde tanımlı *PIK3CA* mutasyonu saptandığı için diğer ekzonlar çalışılmamıştır.

4. BULGULAR

Çalışılan örneklerin %57,5'inde *PIK3CA* mutasyonu saptanmıştır. Bunların %13'ü daha önce NSCLC ile ilişkisi tanımlanmış olan değişimlerdir.

Tez kapsamında çalışılan NSCLC doku örneklerinde saptanan *PIK3CA* mutasyonları aşağıdaki Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hastalarda saptanan *PIK3CA* mutasyonları.

Doku No	Saptanan <i>PIK3CA</i> mutasyonu
T1	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot
T2	E9E545A 1634A>C heterozigot E9c.1658_1659delGTinsC heterozigot
T5*	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot
T6	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot
T12	E12Y644H 1930T>C klonal E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot
T13	E9E545A 1634A>C homozigot E9c.1658_1659delGTinsC homozigot
T14	E12Y644H 1930T>C heterozigot E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot
T16*	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G heterozigot
T18	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G heterozigot
T23*	E12Y644H 1930T>C heterozigot E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot
T24	E9D549N 1645G>A klonal E9D527N 1579G>A heterozigot
T25	E9R524K 1571G>A heterozigot
T27	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot

Tablo 4.1. Devam.

Doku No	Saptanan PIK3CA mutasyonu
T28	E12Y644H 1930T>C klonal
T32	E9E545A 1634A/C homozigot E9c.1658_1659delGTinsC homozigot
T33	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G heterozigot
T35	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot
T40	E12Y644H 1930T>C klonal E5V376I 1126G>A homozigot
T42*	E4S292N 875G>A homozigot E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G heterozigot
T44	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot
T47	E2C147Y 172G>A klonal
T48	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot
T52	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot

*T5 ve T23'de *EGFR* ekzon 19 delesyonu, T16'da *BRAF* V600E mutasyonu, T42'de *KRAS* kodon 61 mutasyonu saptanmış olduğu bilinmektedir.

En fazla mutasyon ekzon 13'te (%100, 15 olguda) saptanmıştır. Mutasyonların %18,5'i ekzon 12'de (27 olgunun 5'inde), %16,1'i ekzon 9'da (31 olgunun 5'inde), %6,2'si ekzon 4'de (16 olgunun birinde), %5,5'i ekzon 5'te (18 olgunun birinde), %3,2'si ekzon 2'de (31 olgunun birinde) saptanmıştır.

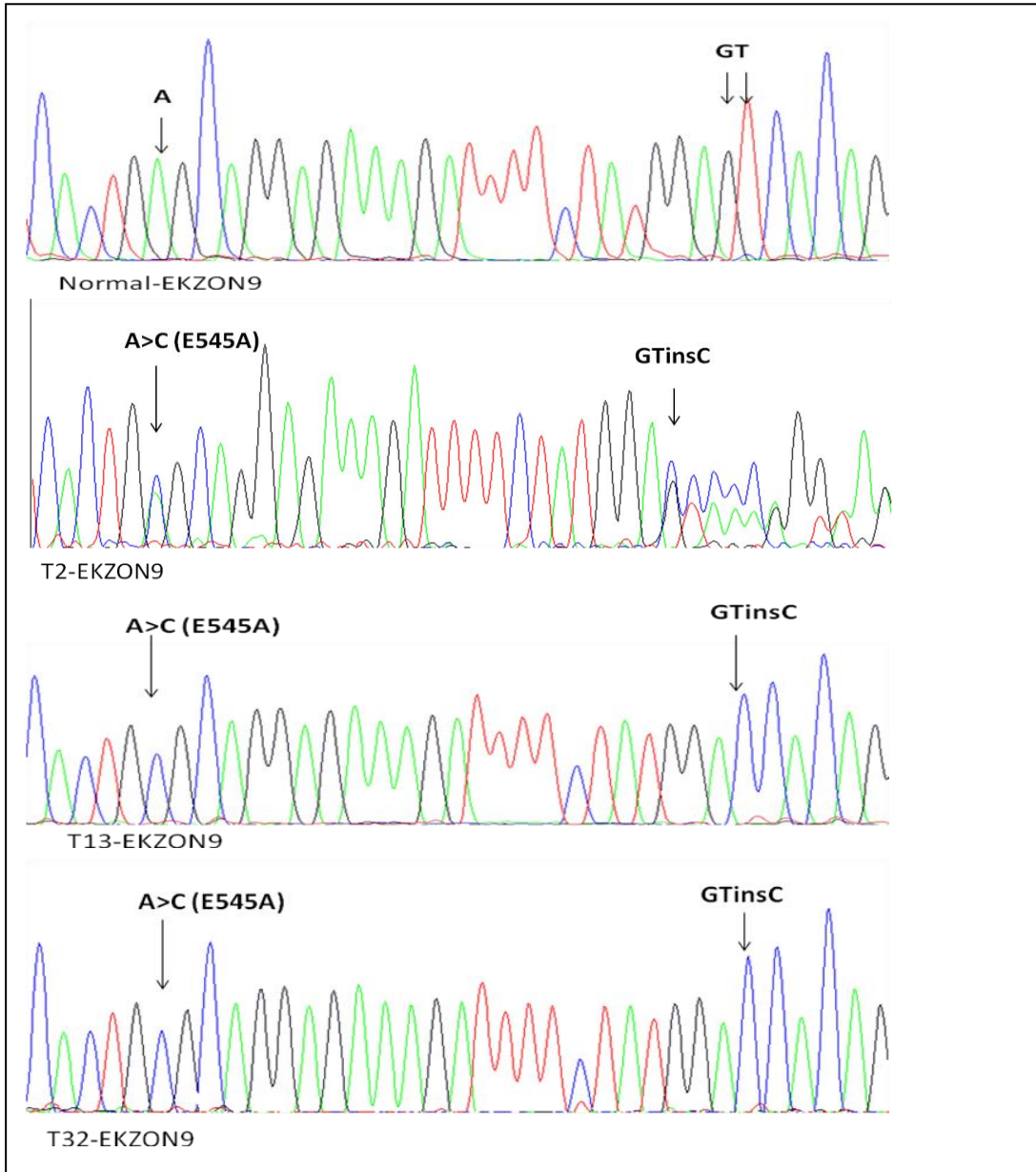
4.1. NSCLC'de Daha Önce Tanımlanmış Mutasyonlar

E545A; 9. ekzonda lokalize 1634. pozisyonundaki A nükleotidinin yerine C nükleotidinin gelmesiyle oluşan bu mutasyon proteinin helikal domaininde yer alan 545. pozisyonundaki glutamik asitin alanin ile değişimine yol açmıştır. (Şekil 4.1) 3 olguda saptanmış olan bu mutasyon NSCLC dahil çok sayıda

kanser türünde bildirilmiştir (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>).
(Tablo 4.1)

Tablo 4.2. E545A mutasyonu saptanan olgular.

Mutasyon	Nükleotid değişikliği	Saptanan olgular
E545A	1634A>C heterozigot	T2
E545A	1634A>C homozigot	T13
E545A	1634A>C homozigot	T32



Şekil 4.1. E545A mutasyonu ve S553Tfs*7 saptanan olguların sekans görüntüleri.

4.2. Diğer Kansere Türlerinde Tanımlı Mutasyonlar

S553Tfs*7; 9. ekzonda lokalize olan bu mutasyon DNA'da 1658. ve 1659. pozisyonundaki GT dinükleotidinin delesyonu ve bunların yerine C nükleotidinin insersiyonu sonucunda protein düzeyinde helikal domainde bulunan 553. pozisyonundaki serin aminoasiti treonin aminoasitine dönüşmüştür. Oluşan frameshift nedeniyle 7 kodon sonra stop kodonu gelmiştir. (Şekil 4.1) 3 olguda saptanan bu mutasyon daha önce endometrial adenokarsinomda ve hepatosellüler karsinomda tanımlanmış bir değişikliktir. (Tredan ve ark; 2012, Colombino ve ark; 2012) (Tablo 4.3)

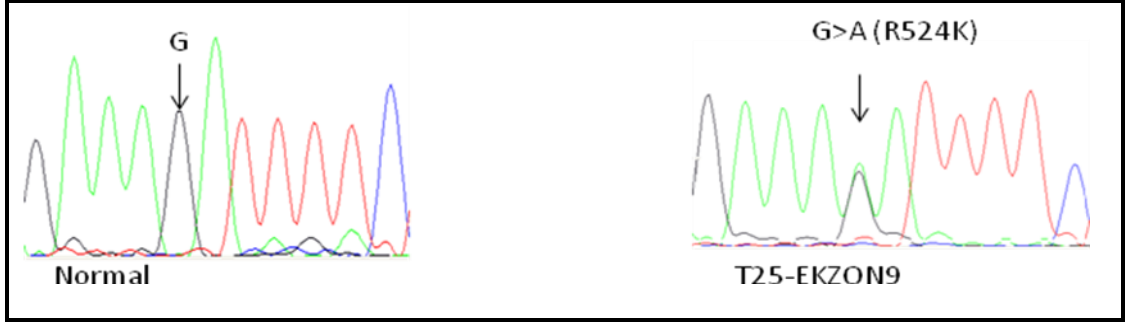
Tablo 4.3. S553Tfs*7 mutasyonu saptanan olgular.

Mutasyon	Nükleotid değişikliği	Saptanan olgular
S553Tfs*7	1658_1659delGTinsC heterozigot	T2
S553Tfs*7	1658_1659delGTinsC homozigot	T13
S553Tfs*7	1658_1659delGTinsC homozigot	T32

R524K; 9. ekzonda 1571. pozisyonundaki G nükleotidinin A nükleotidine dönüşmesiyle oluşan bu mutasyon proteinin helikal domaininde 524. pozisyonundaki arginin aminoasitinin lizine dönüşmesine yol açmıştır. Daha önce kolon kanseri ve orofaringeal skuamöz hücreli karsinom hastalarında tanımlanmış olan bu mutasyon olgu 25'te saptanmıştır (Berg ve ark.; 2010, Chiosea ve ark.; 2013). (Şekil 4.2)

Tablo 4.4. R524K mutasyonu saptanan olgu.

Mutasyon	Nükleotid değişikliği	Saptanan olgular
R524K	1571G>A heterozigot	T25

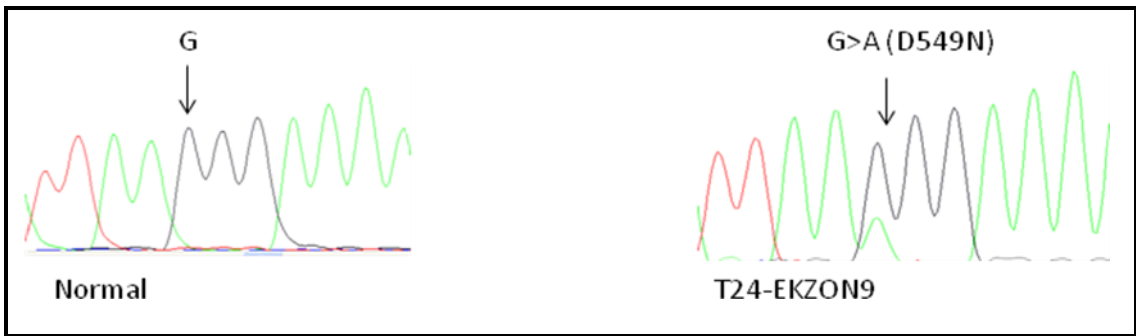


Şekil 4.2. R524K mutasyonu saptanan olgu.

D549N; 9. ekzonda 1645. pozisyondaki G nükleotidinin A nükleotidine dönüşmesiyle oluşan bu mutasyon proteinin helikal domaininde 549. pozisyondaki aspartik asitin asparajin aminoasitine dönüşümüne yol açmıştır. (Şekil 4.3) Daha önce endometrium ve kolon kanserinde tanımlanmış olan bu mutasyon olgu 24'te saptanmıştır (Muruyama-Hosokawa ve ark., 2010, Dan ve ark., 2010). (Tablo 4.5)

Tablo 4.5. D549N saptanan olgu.

Mutasyon	Nükleotid değişikliği	Saptanan olgular
D549N	1645G>A klonal	T24



Şekil 4.3. D549N mutasyonu saptanan olgunun sekans görüntüsü.

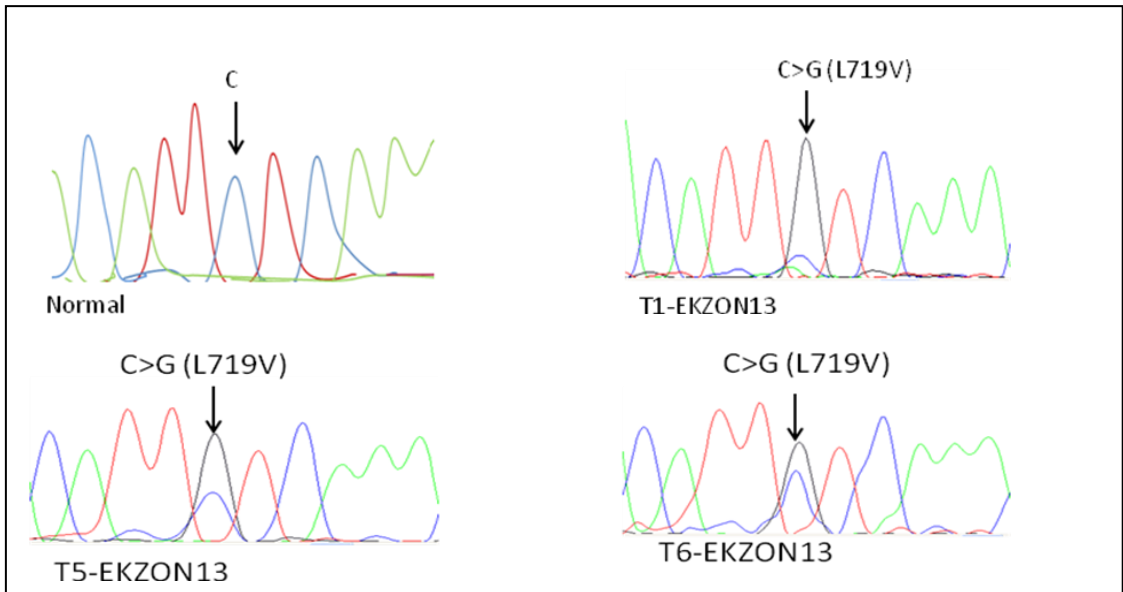
L719V; 13. ekzonda 2155. pozisyondaki C nükleotidinin G nükleotidine dönüşmesiyle oluşan bu mutasyon proteinin kinaz domaininde 719. pozisyondaki lösin aminoasitinin valin aminoasitiyle değişimine yol açmıştır.

(Şekil 4.4) Daha önce meme kanserinde tanımlanmıştır (Troxell ve ark., 2010).

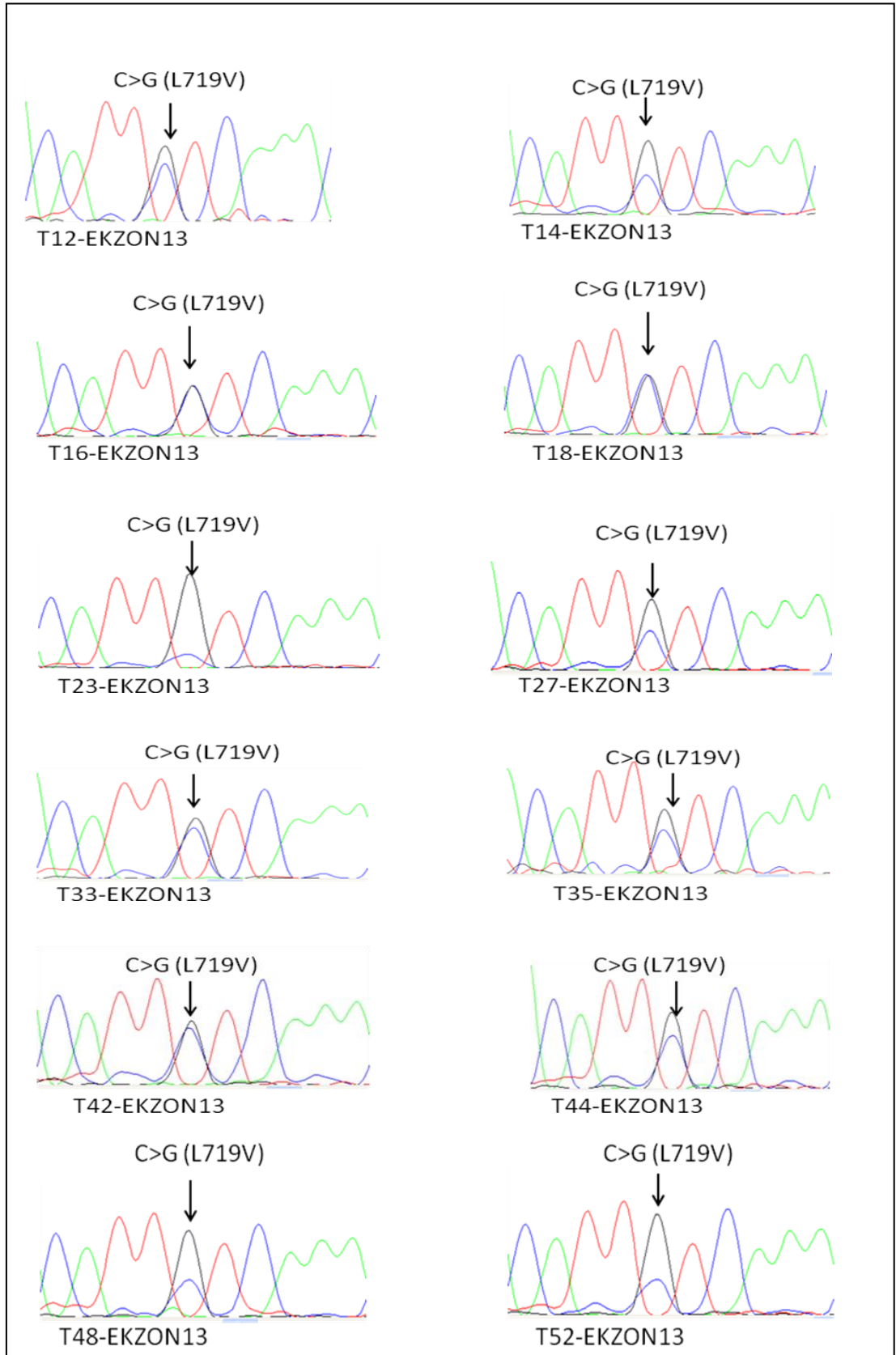
Bu mutasyon 15 olguda saptanmıştır. (Tablo 4.6)

Tablo 4.6. L719V mutasyonu saptanan olgular.

Mutasyon	Nükleotid değişikliği	Saptanan olgular
L719V	2155C>G homozigot	T1
L719V	2155C>G homozigot	T5
L719V	2155C>G homozigot	T6
L719V	2155C>G homozigot	T12
L719V	2155C>G homozigot	T14
L719V	2155C>G heterozigot	T16
L719V	2155C>G heterozigot	T18
L719V	2155C>G homozigot	T23
L719V	2155C>G homozigot	T27
L719V	2155C>G heterozigot	T33
L719V	2155C>G homozigot	T35
L719V	2155C>G heterozigot	T42
L719V	2155C>G homozigot	T44
L719V	2155C>G homozigot	T48
L719V	2155C>G homozigot	T52



Şekil 4.4 L719V mutasyonu saptanan olguların sekans görüntüleri



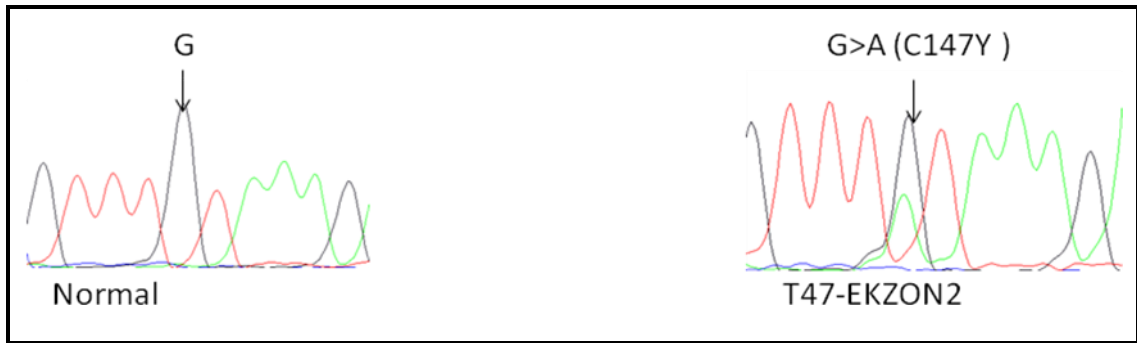
Şekil 4.4. Devam

4.3. Tanımlanmamış Mutasyonlar

C147Y; 2. ekzonda 172. pozisyonundaki G nükleotidinin A nükleotidine dönüşmesiyle oluşan bu mutasyon protein düzeyinde ABD ve RBD domainlerinin arasındaki bağlantı bölgesinde 147.pozisyonundaki sistein aminoasitinin tirozin aminoasitiyle değişimine yol açmıştır. Bu mutasyon olgu 47’de saptanmıştır (Tablo 4.7, Şekil 4.4)

Tablo 4.7. C147Y mutasyonu saptanan olgu.

Mutasyon	Nükleotid değişikliği	Saptanan olgular
C147Y	172G>A klonal	T47



Şekil 4.5. C147Y mutasyonu saptanan olgunun sekans görüntüsü.

S292N; 4. ekzonda 875. pozisyonunda G nükleotidinin A nükleotidine dönüşmesiyle oluşan bu mutasyon protein düzeyinde RBD ile C2 domaini arasındaki bağlantı bölgesinde 292. pozisyonundaki serin aminoasitinin asparajin aminoasitiyle değişimine yol açmıştır. Bu mutasyon olgu 42’de saptanmıştır. (Tablo 4.8, Şekil 4.5)

Tablo 4.8. S292N mutasyonu saptanan olgu.

Mutasyon	Nükleotid değişikliği	Saptanan olgular
S292N	875G>A homozigot	T42

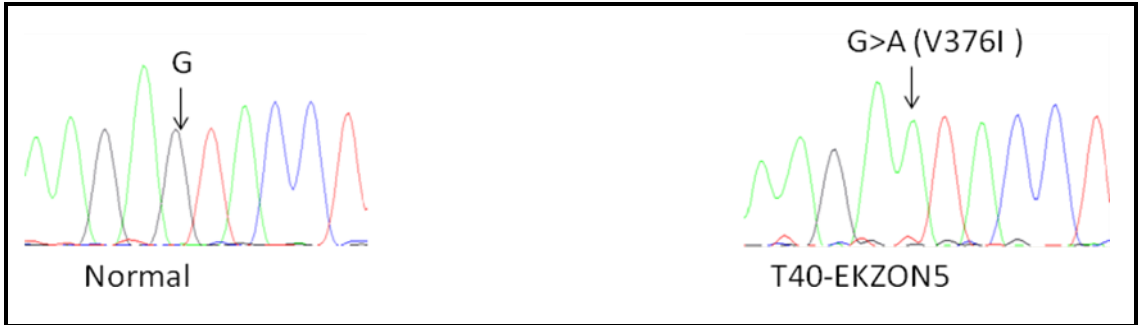


Şekil 4.6. S292N mutasyonu saptanan olgunun sekans görüntüsü.

V376I; 5. ekzonda 1126. pozisyonndaki G nükleotidinin A nükleotidine dönüşmesiyle oluşan bu mutasyon protein düzeyinde C2 domaininde 376. pozisyonndaki valin aminoasitinin izolösin aminoasitiyle değişimine yol açmıştır. Bu mutasyon olgu 40'ta saptanmıştır. (Tablo 4.9, Şekil 4.6)

Tablo 4.9. V376I mutasyonu saptanan olgu.

Mutasyon	Nükleotid değişikliği	Saptanan olgular
V376I	1126G>A homozigot	T40

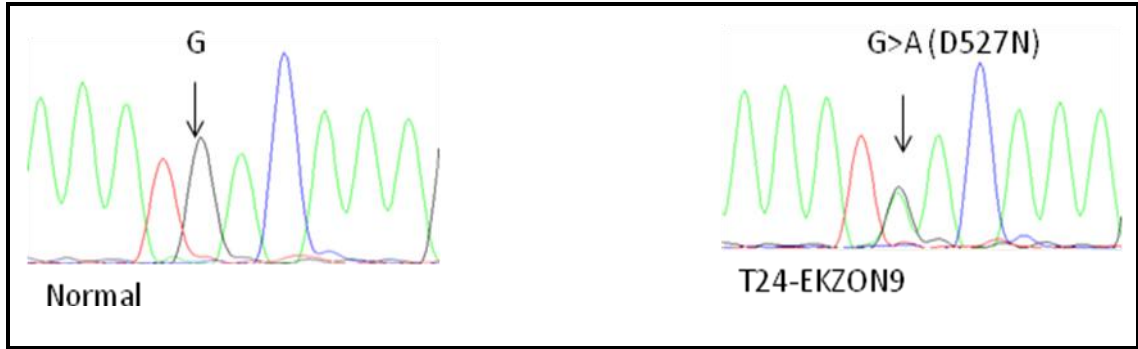


Şekil 4.7. V376I mutasyonu saptanan olgunun sekans görüntüsü.

D527N; 9. ekzonda lokalize 1579. pozisyonndaki G nükleotidinin A nükleotidine dönüşümüyle oluşan bu mutasyon protein düzeyinde helikal domainde 527. pozisyonndaki aspartik asit aminoasitinin asparajin aminoasitiyle değişimine yol açmıştır. Bu mutasyon olgu 24'te saptanmıştır. (Tablo 4.10, Şekil 4.7)

Tablo 4.10. D527N mutasyonu saptanan olgu.

Mutasyon	Nükleotid değişikliği	Saptanan olgular
D527N	1579G>A heterozigot	T24



Şekil 4.8. D527N mutasyonu saptanan olgunun sekans görüntüsü.

V680L; 13. ekzonda 2038.pozisyondaki G nükleotidinin C nükleotidine dönüşmesiyle oluşan bu mutasyon protein helikal domainde 680.pozisyondaki valin aminoasitinin lösin aminoasitiyle değişimine yol açmıştır. (Şekil 4.10)

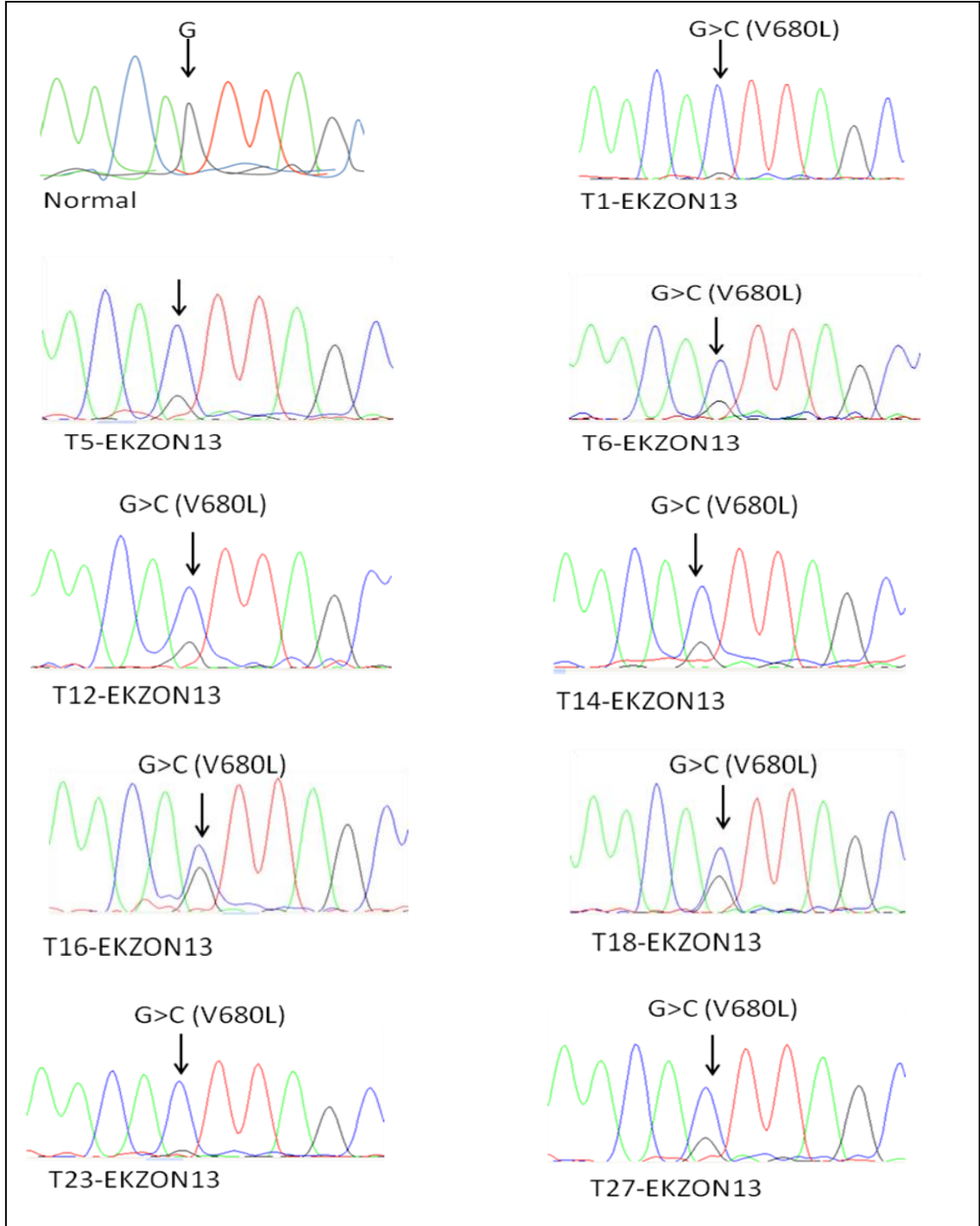
Bu mutasyon 15 olguda saptanmıştır. (Tablo 4.11)

Tablo 4.11. V680L mutasyonu saptanan olgular.

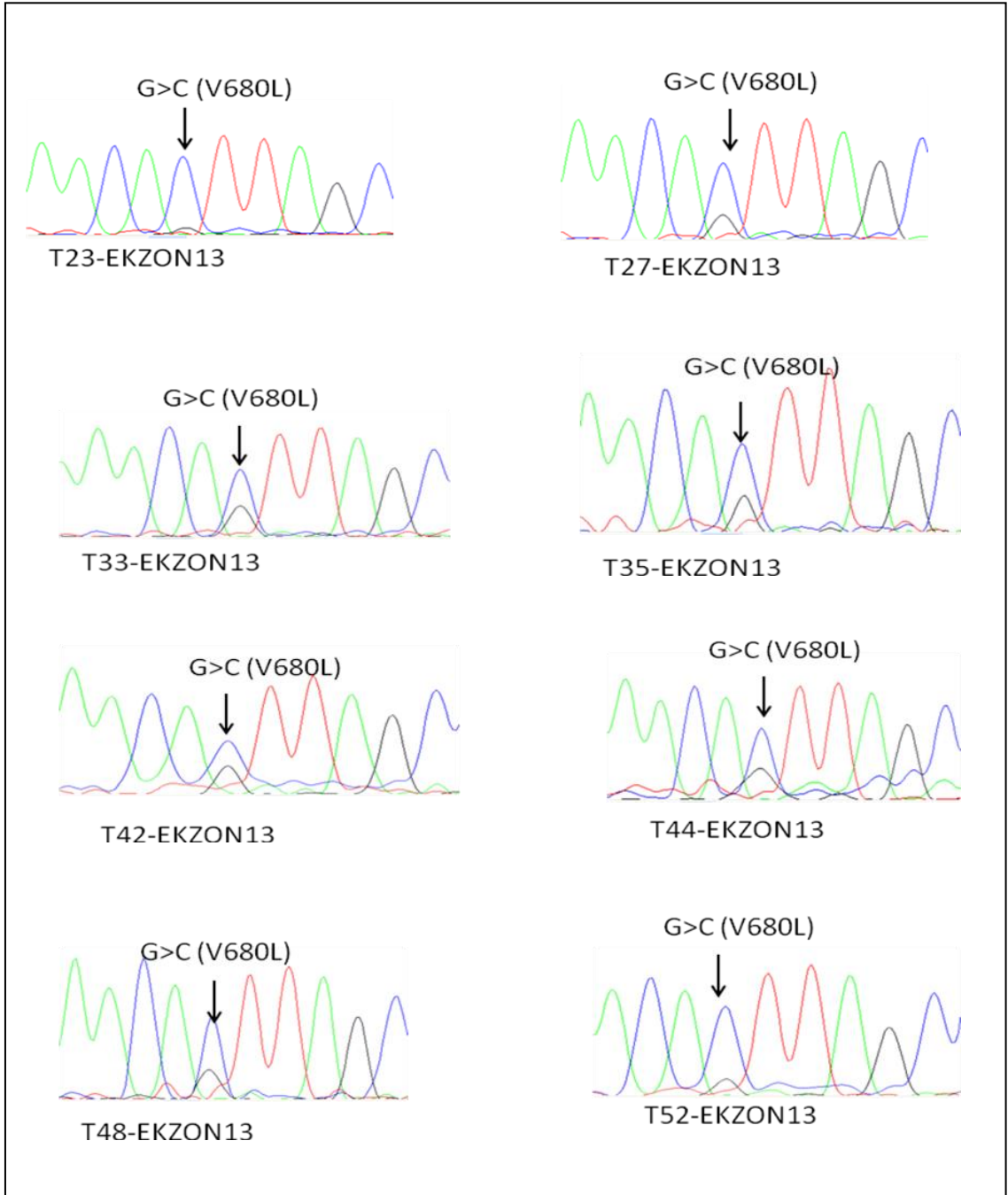
Mutasyon	Nükleotid değişikliği	Saptanan olgular
V680L	2038G>C homozigot	T1
V680L	2038G>C homozigot	T5
V680L	2038G>C homozigot	T6
V680L	2038G>C homozigot	T12
V680L	2038G>C homozigot	T14
V680L	2038G>C homozigot	T16
V680L	2038G>C homozigot	T18
V680L	2038G>C homozigot	T23
V680L	2038G>C homozigot	T27
V680L	2038G>C homozigot	T33

Tablo 4.11. Devam

V680L	2038G>C homozigot	T35
V680L	2038G>C homozigot	T42
V680L	2038G>C homozigot	T44
V680L	2038G>C homozigot	T48
V680L	2038G>C homozigot	T52



Şekil 4.9. V680L mutasyonu saptanan olguların sekans görüntüleri



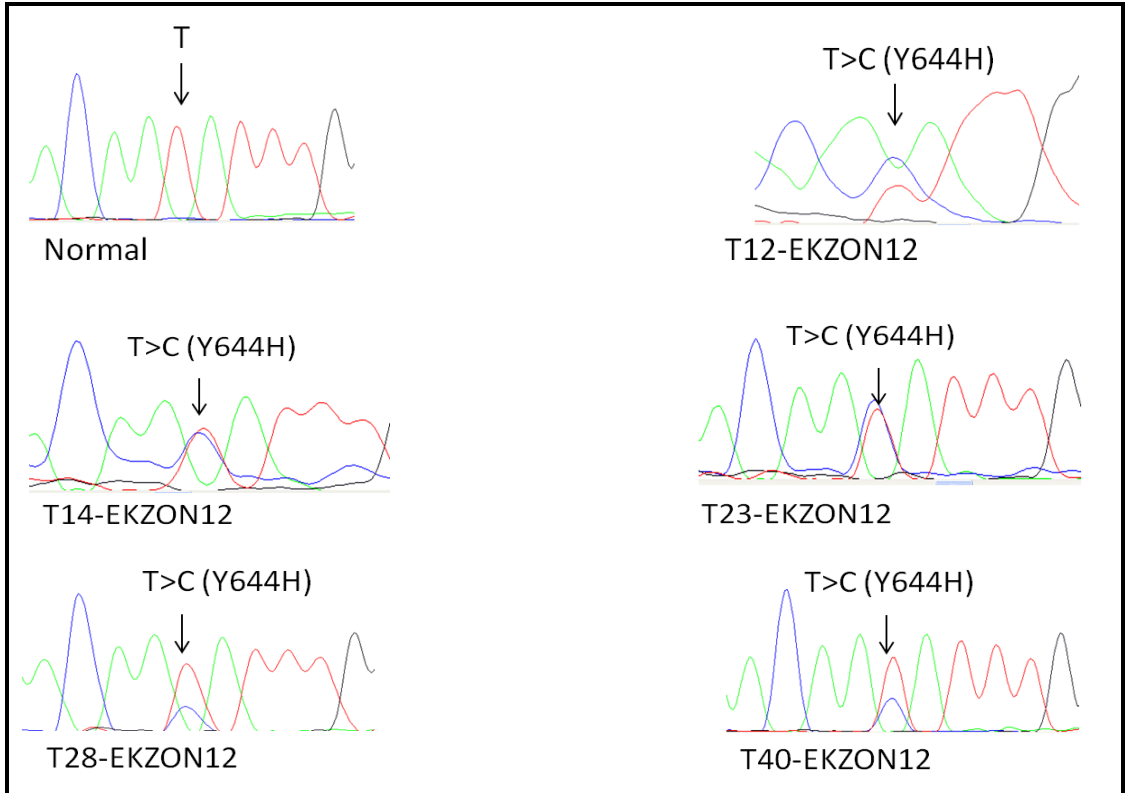
Şekil 4.9. Devam

4.4. Polimorfizmler

Y644H; 12. ekzonda lokalize 1930. pozisyondaki T nükleotidinin C nükleotidine dönüşmesiyle oluşan bu mutasyon protein düzeyinde helikal domainde 644. pozisyondaki tirozin aminoasitinin histidin aminoasitiyle değişimine yol açmıştır. Bu değişiklik daha önce SNP olarak tanımlanmıştır (rs17849072). Bu mutasyon 5 olguda saptanmıştır. (Tablo 4.12, Şekil 4.10)

Tablo 4.12. Y644H mutasyonu saptanan olgular.

Mutasyon	Nükleotid değişikliği	Saptanan olgular
Y644H	1930T>C klonal	T12
Y644H	1930T>C heterozigot	T14
Y644H	1930T>C heterozigot	T23
Y644H	1930T>C klonal	T28
Y644H	1930T>C klonal	T40



Şekil 4.10. Y644H mutasyonu saptanan olguların sekans görüntüleri.

15 olguda saptanan V680L ve L719V mutasyonlarının polimorfizm olabileceği düşünülerek ailesinde kanser öyküsü olmayan 15 erkek (ortalama yaş; 58,6) ve 15 kadından oluşan (ortalama yaş; 52,5) 30 sağlıklı bireyde *PIK3CA* ekzon 13 dizi analizi yapılmıştır. Bu olguların 27'sinde homozigot L719V ve

V680L mutasyonu saptanmıştır. Buna dayanarak her iki mutasyonunun polimorfizm olduğu sonucuna varılmıştır.

4.5. Mutasyon Saptanan Olgular

4.5.1. *PIK3CA* Geninde Tek Mutasyon Saptanan Olgular

Olgu 25; 63 yaşında erkek, evre IV NSCLC tanısı almıştır. Palyatif kemoterapi ardından 2. ayda progresyon göstermiş ve 4. ayda kaybedilmiştir. Ekzon 9'da R524K mutasyonu saptanmıştır.

Olgu 47; 59 yaşında erkek hasta, lokal ileri evre NSCLC tanısı almıştır. Tanı anında inoperabl olan hastaya 2 kür neoadjuvan tedavi verildikten sonra opere edilmiştir. 9 ay sonra nüks gelişmiştir. Beyin ve karaciğer metastazı gelişen hastanın toplam sağ kalım süresi 22 aydır. Ekzon 2'de C147Y mutasyonu saptanmıştır.

4.5.2. *PIK3CA* Geninde Çoklu Mutasyon Saptanan Olgular

Olgu 1; 62 yaşında erkek hasta, evre IV NSCLC tanısı almıştır. Palyatif kemoterapinin hemen ardından progresyon gelişmiştir. 2.basamak kemoterapi başlanmıştır. Toplam sağ kalım süresi 10 aydır. Ekzon 13'te V680L ve L719V mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 2; 46 yaşında kadın hasta, lokal ileri evre NSCLC tanısı almıştır. 4 kür neoadjuvan tedavi sonrası stabil hastalık yanıtı alınması üzerine inoperabl olarak değerlendirilen hastada neoadjuvan tedavi bitiminden 1 yıl sonra progresyon gelişmiştir. Bunun üzerine hastaya palyatif kemoterapi başlanmıştır. Palyatif kemoterapi bitiminden 3 ay sonra progresyon gelişen hastaya 4 ay süreyle erlotinib tedavisi verilmiştir. Ancak erlotinibe yanıt alınmamıştır. Toplam sağ kalım süresi 26 aydır. Ekzon 9'da E545A ve S553Tfs*7 mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 6; 81 yaşında kadın hasta, lokal ileri evre NSCLC tanısı almıştır. Tanıda operabl olan hastada operasyondan 11 ay sonra progresyon

gelişmiştir. Erlotinib tedavisi başlanmış olup stabil hastalık yanıtı alınmıştır. Toplam sağ kalım süresi 16 aydır. Ekzon 13'te V680L ve L719V mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 12; 55 yaşında kadın hasta, evre IV NSCLC tanısı almıştır. 8 ay süreyle palyatif kemoterapi alan hastada kemoterapi bitiminden 1 ay sonra progresyon gelişmiştir. Hastaya 2. basamak kemoterapi başlanmıştır. Toplam sağ kalım süresi 7 aydır. Ekzon 13'te V680L ve L719V mutasyonları ile ekzon 12'de Y644H mutasyonu saptanmıştır.

Olgu 13; 59 yaşında erkek hasta, evre IV NSCLC tanısı almıştır. 1 ay süreyle palyatif kemoterapi alan hasta tanıdan 2 ay sonra kaybedilmiştir. Ekzon 9'da E545A ve S553Tfs*7 mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 14; 49 yaşında erkek hasta, lokal ileri evre NSCLC tanısı almıştır. 3 kür neoadjuvan tedavi sonrası opere edilmiştir. Operasyondan 8 ay sonra nüks gelişmiştir. . Ekzon 13'te V680L ve L719V mutasyonları ile ekzon 12'de Y644H mutasyonu saptanmıştır.

Olgu 18; 59 yaşında erkek hasta, lokal ileri evre NSCLC tanısı almıştır. Tanıda inoperabl olan hastaya 2 ay palyatif kemoterapi verilmiştir. 8 ay sonra progresyon gelişen hastanın toplam sağ kalım süresi bilinmemektedir. Ekzon 13'te V680L ve L719V mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 24; 65 yaşında erkek hasta, lokal ileri evre NSCLC tanısı almıştır. 4 kür neoadjuvan tedavi sonrası opere olan hastada 11.ayda nüks gelişmiştir. 4 ay palyatif kemoterapi alan hastaya erlotinib tedavisi başlanmış, erlotinibe başlangıçta yanıt vermiş ancak 8 ay sonra progresyon gelişmiştir. Hastanın toplam sağ kalım süresi bilinmemektedir. Ekzon 9'da D527N ve D549N mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 27; 58 yaşında erkek hasta, lokal ileri evre NSCLC tanısı almıştır. Tanıda inoperabl olan hastaya 6 kür neoadjuvan tedavi verilmiştir. Tedavi bitiminde halen inoperabl olan hastaya kemoterapi ve radyoterapi başlanmıştır. 5 ay sonra progresyon gelişen hastanın toplam sağ kalım süresi 26 aydır. Ekzon 13'te V680L ve L719V mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 32; 71 yaşında erkek hasta, evre IV NSCLC tanısı almıştır. Tanıda kemik metastazı mevcut olan hastada kemoterapi planlanmış ancak

tedavi başlanamadan hasta kaybedilmiştir. Toplam sağ kalım süresi 4 aydır. Ekzon 9'da E545A ve S553Tfs*7 mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 33; 50 yaşında erkek hasta, evre IV NSCLC tanısı almıştır. Palyatif kemoterapi sonrası 3.ayda progresyon gelişen hastaya kemoterapi başlanmıştır. Kemoterapiye stabil hastalık cevabı veren hastanın toplam sağ kalım süresi bilinmemektedir. Ekzon 13'te V680L ve L719V mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 35; 58 yaşında kadın hasta, evre IV NSCLC tanısı almıştır. Palyatif kemoterapi sonrası stabil hastalık seyri sağlanmıştır. Sağ kalım süresi bilinmemektedir. Ekzon 13'te V680L ve L719V mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 40; 67 yaşında erkek hasta, evre IV NSCLC tanısı almıştır. Palyatif kemoterapi verilen hastada 1 yıl sonra progresyon gelişmiştir. 2. ve 3. basamak kemoterapiden sonra yine progresyon gelişen hastaya 4.basamak erlotinib tedavisi başlanmıştır. Erlotinibe yanıt vermeyen hastanın toplam sağ kalım süresi 32 aydır. Ekzon 5'te V376I mutasyonu ve ekzon 12'de Y644H mutasyonu saptanmıştır.

Olgu 44; 42 yaşında kadın hasta, evre IV NSCLC tanısı almıştır. Palyatif kemoterapi başlanmıştır. 14 ay sonra progresyon gelişmiştir. 2. basamak kemoterapi başladıktan 2 ay sonra yine progresyon gelişmiştir. 3. basamak erlotinib tedavisine 3 ay stabil hastalık yanıt alınmıştır. Toplam sağ kalım süresi 46 aydır. Ekzon 13'te V680L ve L719V mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 48; 53 yaşında kadın hasta, evre IV NSCLC tanısı almıştır. 4 ay süreyle palyatif kemoterapi verilmiştir. Palyatif kemoterapi bitiminden 7 ay sonra progresyon gelişmiştir. 2. basamak erlotinib tedavisi başlanmıştır. 3 ay süreyle parsiyel yanıt alınmıştır. Toplam sağ kalım süresi bilinmemektedir. Ekzon 13'te V680L ve L719V mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 52; 44 yaşında kadın hasta, evre IV NSCLC tanısı almıştır. 3 ay süreyle palyatif kemoterapi verilmiştir. 2. basamak kemoterapiden 1 ay sonra progresyon gelişmiştir. Sağ kalım süresi bilinmemektedir. Ekzon 13'te V680L ve L719V mutasyonları saptanmıştır.

4.5.3. *PIK3CA* tek/çoklu Mutasyon Yanısıra *EGFR*, *KRAS* ya da *BRAF* Mutasyonu Saptanan Olgular

Olgu 5; 70 yaşında kadın hasta, lokal ileri evre NSCLC tanısı almıştır. Tanıda operabl olan hastada operasyondan sonra 25. ayda nüks ve palyatif kemoterapi sonrasında da 1. ayda progresyon gelişmiştir. Daha önce *EGFR* ekzon 19 delesyonu saptanmış olan hastaya erlotinib tedavisi başlanmış ve parsiyel yanıt alınmıştır. Toplam sağ kalım süresi 59 aydır. Bu olguda *PIK3CA* geninde ekzon 13'te V680L ve L719V mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 16; 62 yaşında erkek hasta, lokal ileri evre NSCLC tanısı almıştır. 6 kür neoadjuvan tedavi sonrası opere edilmiştir. *BRAF* V600E mutasyonu saptanan hastanın toplam sağ kalım süresi bilinmemektedir. Bu olguda *PIK3CA* geninde ekzon 13'te V680L ve L719V mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 23; 44 yaşında kadın hasta, evre IV NSCLC tanısı almıştır. Palyatif kemoterapi başlanan hastada daha önce *EGFR* ekzon 19 delesyonu saptanmıştır. Hastanın klinik seyri ve sağ kalım süresi bilinmemektedir. Bu olguda *PIK3CA* geninde ekzon 12'de Y644H, ekzon 13'te V680L ve L719V mutasyonları saptanmıştır.

Olgu 42; 57 yaşında erkek hasta, lokal ileri evre NSCLC tanısı almıştır. Tanıda inoperabl olan hastaya 3 kür neoadjuvan tedavi verilmiştir. Tedavi bitiminde halen inoperabl olan hastaya kemoterapi başlanmıştır. 5 ay sonra progresyon gelişmiştir. Bu hastada *KRAS* kodon 61 mutasyonu ve *PIK3CA* ekzon 4'te S292N, ekzon 13'te V680L, L719V mutasyonları saptanmıştır.

Saptanan *PIK3CA* mutasyonlarının hastalık etyopatogenezendeki rollerine göre dağılımı Tablo 4.13'te verilmiştir.

Tablo 4.13. PIK3CA mutasyonlarının patojenik değeri

Doku No	Saptanan PIK3CA mutasyonu	NSCLC'de tanımlı	Diğer tanımlı	SNP	Yeni mutasyon
T1	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot			+	
T2	E9E545A 1634A>C heterozigot E9c.1658_1659delGTinsC heterozigot	+	+		
T5	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot			+	
T6	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot			+	
T12	E12Y644H 1930T>C klonal E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot			+	
T13	E9E545A 1634A>C homozigot E9c.1658_1659delGTinsC homozigot	+	+		
T14	E12Y644H 1930T>C heterozigot E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot			+	
T16	E13V680L 2038G>C homozigot E13 L719V 2155C>G heterozigot			+	
T18	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G heterozigot			+	
T23	E12Y644H 1930T>C heterozigot E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot			+	
T24	E9D549N 1645G>A klonal E9D527N 1579G>A heterozigot		+		+
T25	E9R524K 1571G>A heterozigot		+		
T27	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot			+	
T28	E12Y644H 1930T>C klonal			+	
T32	E9E545A 1634A/C homozigot E9c.1658_1659delGTinsC homozigot	+	+		
T33	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G heterozigot			+	
T35	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot			+	
T40	E12Y644H 1930T>C klonal E5V376I 1126G>A homozigot			+	+
T42	E4S292N 875G>A homozigot E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G heterozigot			+	+
T44	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot			+	
T47	E2C147Y 172G>A klonal				+
T48	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot			+	
T52	E13V680L 2038G>C homozigot E13L719V 2155C>G homozigot			+	

5. TARTIŞMA

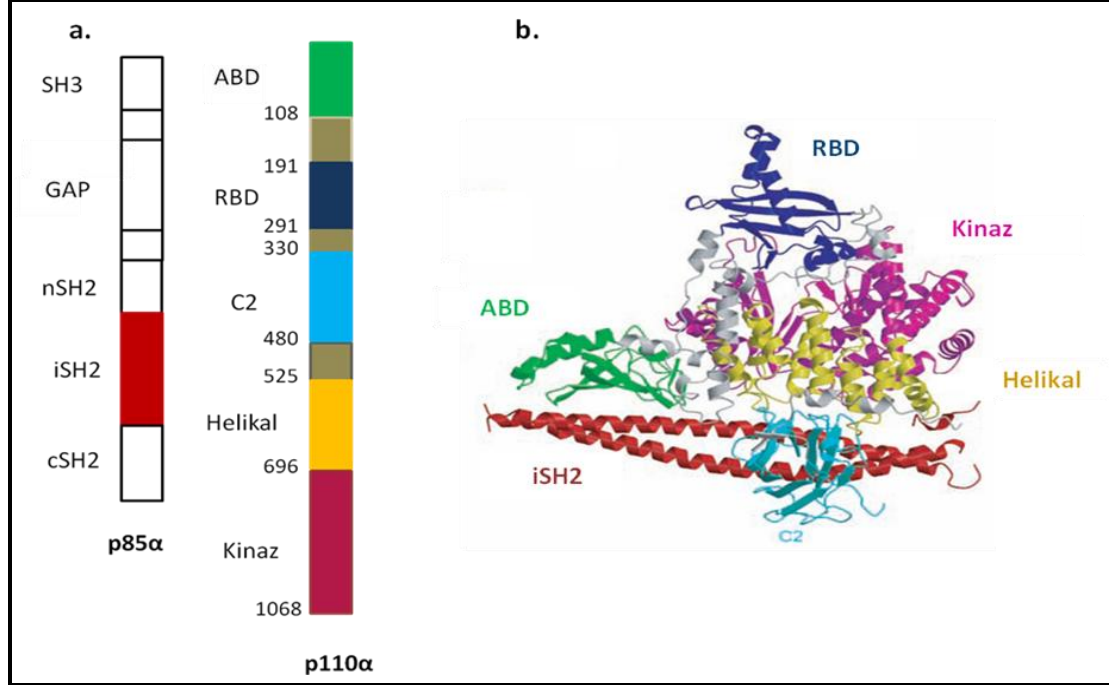
PIK3CA geni bir onkogendir ve protein kinaz kodlar. Bu enzimin aktivasyonunun süreklilik kazanması ilişkili olduğu sinyal yollarının da sürekli aktif olmasına yol açar. Bu sinyal yolları hücre proliferasyonunu, apoptozu ve hücre büyümesini regüle eden yollardır. Bu nedenle *PIK3CA* geninde meydana gelen mutasyonlar tümörojenik etki potansiyeli olan değişikliklerdir.

PIK3CA geninde aktive edici mutasyonlar NSCLC dahil pek çok kanser türünde bildirilmiştir (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>; Ligresti ve ark., 2009; Samuels ve ark., 2004; Janku ve ark., 2012).

Literatürde NSCLC’de *PIK3CA* mutasyon oranı %2-4 olarak bildirilmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada örneklerin %7,5’inde NSCLC’de tanımlanmış fonksiyon kazancına yol açan mutasyon saptanmıştır. Bizim saptadığımız mutasyon sıklığının literatürde bildirilenden daha yüksek olması hasta seçiminden olabileceği gibi toplumlar arası farklardan da kaynaklanıyor olabilir. NSCLC’den sorumlu tutulan mutasyonlar arasında toplumlar arası farklılığın en belirgin örneği *EGFR* geni mutasyonlarıdır. Yapılan çalışmalarda Kuzey Amerika ve Avrupalılarda *EGFR* geni mutasyon oranı %10-15 iken, Doğu Asya toplumlarından oluşan serilerde bu oran %22-50 olarak bildirilmektedir (Cholgue ve ark., 2013; Yang P.C. ve ark., 2012).

PIK3CA geninin kodladığı p110 α ’nın domain yapısı incelendiğinde 5 domainden oluştuğu görülür (Şekil 5.1). Bunlar; adaptör bağlayıcı domain (ABD, P85 bağlayıcı domain), Ras bağlayıcı domain (RBD), C2 domaini, helikal domain (PIK) ve bir kinaz domainidir. P110 α ’nın işlev partneri olan p85 α ’nın da bilinen 5 domaini vardır (Şekil 5.1). Bunlardan 2 SH2 domaini (N terminal nSH2 ve C terminal cSH2) arasında bulunan inter SH2 domaini katalitik subünite bağlanmayı sağlar (Huang C. H. ve ark., 2007). Hücrel uyarı olduğunda nSH2 ve cSH2 domainleri aktif reseptördeki veya adaptör proteinlerdeki fosforile tirozinlere bağlanır. Bu bağlanma p85 α ’yı p110 α ’dan ayırmaksızın p110 α katalitik subüniti aktive eder. P85 N-terminal SH2

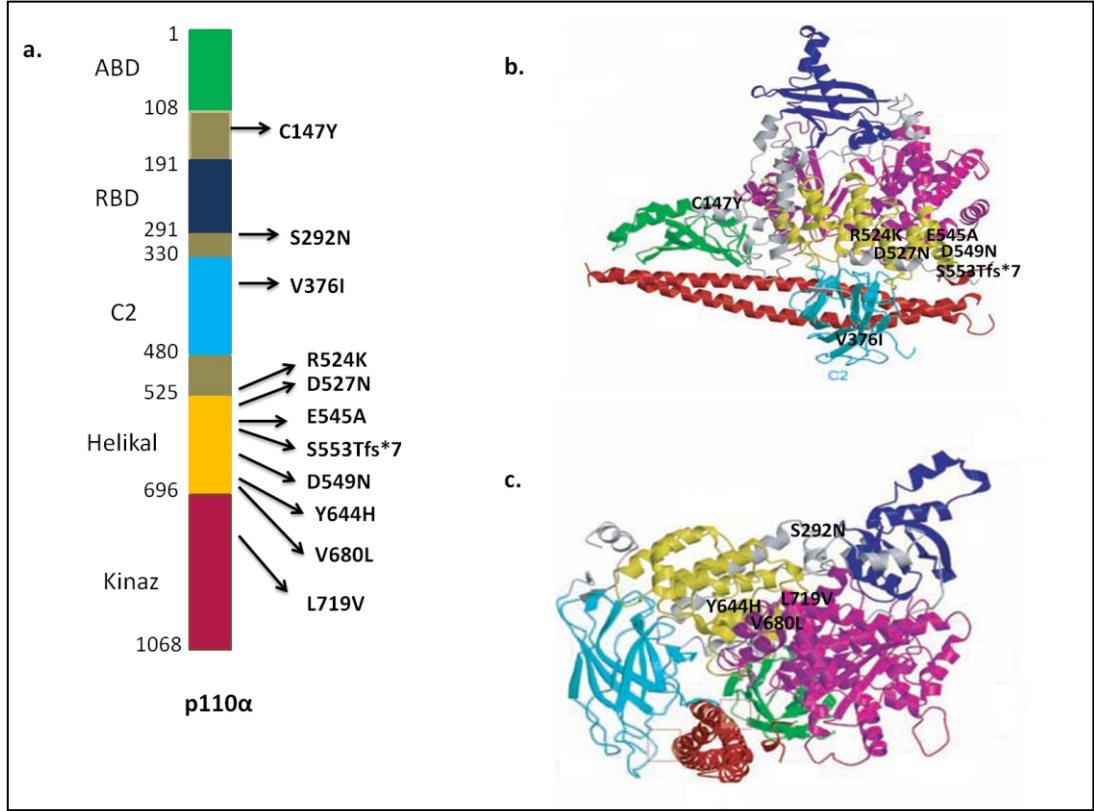
domaini ile p110 α 'nın helikal domaini arasında etkileşim olduğu bilinmektedir. Bu etkileşim p110 α 'nın p85 tarafından inhibe edilmesini sağlar.



Şekil 5.1. a) p85 α ve p110 α domain organizasyon şeması, b) p85/p110 α protein diyagramı.

Literatürde *PIK3CA* geninde tanımlanmış olan mutasyonlar ABD, C2, helikal domain ve kinaz domaininde lokalizedir. Bunların büyük bir kısmı helikal ve kinaz domaininde bulunmaktadır (Samuel ve ark., 2004). Genel olarak helikal domain mutasyonlarının bu etkileşimi zayıflatarak inhibisyonu ortadan kaldırdıkları düşünülmektedir (Zhao L. ve ark., 2008).

Bizim saptadığımız mutasyonlardan 7'si helikal domainde, 1 tanesi kinaz domaininde, 1'i C2 domaininde, 1'i RBD ile C2'arasındaki bağlantı bölgesinde ve diğer bir tanesi ise ABD ile RBD arasındaki bağlantı bölgesinde yerleşiktir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. a) Saptanan mutasyonların domain organizasyon şemasındaki lokalizasyonları, b, c) Saptanan mutasyonların protein diyagramındaki lokalizasyonları.

Olgu 2, 13 ve 32’de saptadığımız E545A değişikliği sıklıkla over, meme, kolon, endometrium, tiroid, özofagus, pankreas kanserlerinde, hepatoblastomda, santral sinir sistemi gliomlarında ve hematolojik malignitelerde tanımlanmış bir değişikliktir (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>; Hartman W. ve ark., 2009; Horn S. ve ark., 2008). NSCLC hastalarında da tanımlanmıştır. Lee ve ark.’nın yaptığı çalışmada 173 NSCLC hastasının 5’inde *PIK3CA* geninde mutasyon saptandığı ve bunlardan birinin E545A mutasyonu olduğu bildirilmiştir (Lee ve ark., 2010).

Biyokimyasal çalışmalarda helikal domaindeki 542, 545 ve 546. aminoasit rezidülerindeki mutasyonların p85 nSH2 domaininin p110α üzerindeki inhibitör etkisini bozdukları ve hücre serilerinde yapılan çalışmalarda da kinaz aktivasyonuna yol açtıkları gösterilmiştir (Miled ve ark., 2007; Samuels Y. ve ark., 2005).

E545A değişikliği saptanan olgu 2, 13 ve 32’de ekzon 9’da frameshift mutasyona yol açan 1658_1659delGTinsC değişikliği de saptanmıştır. Bu mutasyon da kanserde tanımlanmış bir mutasyondur.

İleri evre endometrial adenokarsinom olgularında yapılmış bir çalışmada, çalışmaya dahil edilen 36 olgunun birinde 1658_1659delGTinsC değişikliği saptandığı bildirilmiştir (Tredan ve ark., 2012). 65 hepatoselüler karsinom hastasının tümör doku örneğinin incelendiği başka bir çalışmada da 10 örnekte 1658_1659delGTinsC mutasyonu saptandığı bildirilmiştir (Colombino ve ark., 2012).

İki mutasyonun birlikte görüldüğü olgular da literatürde bildirilmiştir. 2008 yılında yapılan 76 DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma) olgusunun dahil edildiği bir çalışmada 1 olguda E545A ve 1658_1659delGTinsC saptandığı bildirilmiştir. Ancak bu iki mutasyonun birlikteliğiyle ilgili herhangi bir yorum yapılamamıştır (Baohua ve ark., 2008).

Bu iki mutasyonun birlikteliği 2013 yılında Cowden sendromlu (CS) hastalarda gösterilmiştir. Yakın zamana kadar meme, tiroid ve diğer kanser türlerinin sık görüldüğü multipl hamartomlarla karakterize bir kanser predispozisyon sendromu olan CS’nun *PTEN* germ-line mutasyonlarından kaynaklandığı bilinmekteydi. Orloff ve ark.’nın *PTEN* mutasyonu saptanmayan 91 CS olgusunda yaptıkları bir çalışmada bu hastaların 10’unda *PIK3CA* geninde germ-line mutasyon saptandığı bildirilmiştir. Bu hastalardan 71 ve 27 yaşlarındaki iki kadın hastada E545A ve 1658_1659delGTinsC mutasyonlarının birlikte bulunduğu gösterilmiştir. Bu mutasyonu taşıyan hastaların lenfoblastoid hücrelerinden p-AKT1 ve p110α protein ekstraksiyonu sonrasında western blot analizi yapıldığında p-Thr308-AKT1 düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla önemli oranda artış gösterdiği bildirilmiştir (Orloff ve ark., 2013). Buna göre bu iki mutasyonun birlikteliği p110α proteininin kinaz aktivitesini artırmaktadır (Orloff ve ark., 2013).

Mutasyon saptadığımız olgu 13 ve 32’de prognozun kötü olması ile olgu 2’de gözlenen tedavi direnci bu mutasyonlarla ilişkili olabilir. Mutasyon saptadığımız bu 3 olguda farklı doku örneğinde dizi analizi yapılarak mutasyonun konfirme edilme imkânı bulunamamıştır ve hastalarda NSCLC

dışında Cowden sendromuyla uyumlu olabilecek başka bir bulgu olup olmadığı bilinmemektedir.

Olgu 25’de saptadığımız R524K mutasyonunun literatürde bir kolon kanseri hastasında (Berg ve ark., 2010) ve orofaringeal skuamöz hücreli karsinom hastasında saptandığı bildirilmiştir. Orofaringeal SCC’de E525K mutasyonu ile birlikte saptanmıştır (Chiosea ve ark., 2013).

Bu mutasyon helikal domainde lokalizedir. Helikal domainin moleküldeki diğer tüm domainlerin bağlandığı bir çekirdek gibi fonksiyon gördüğü düşünülmektedir. Bu domainin ana rolü kompleks içinde birbiriyle direkt kontakt kurabilen tek yapı olan C2 ve heliks domainleri ile diğer p110 α subünit domainleri arasında köprü oluşturmalarıdır. Biyokimyasal çalışmalarda helikal domain mutasyonlarının (özellikle 542 ve 545. pozisyonlardaki) p85’in N-terminal SH2 domaini ile p110’un helikal domaininin arasındaki inhibitör etkileşimi bozduğu gösterilmiştir. R524K değişikliği de protein yapısında bulunduğu konumdan dolayı proteinde fonksiyon kazancına yol açabileceği düşünülebilir. Ancak bu mutasyon ile pozitif yüklü polar bir aminoasit olan arginin yerine yine pozitif yüklü polar bir aminoasit olan lizin gelmiştir. Bu özelliği ile protein yapılıması içinde tolere edilebilir bir değişiklik olarak düşünülebileceği için işlevsel etkinliği tartışmalı olarak değerlendirilmiştir. Diğer yandan lizin aminoasitinin sadece bir amino grubunun bulunması ve bunun sonucu olarak daha az sayıda hidrojen bağı oluşturabilmesi nedeni ile protein stabilitesini bozmaya yönelik olası bir etkinin de göz önünde bulundurulması gereklidir.

Literatürde bu mutasyonun bildirildiği diğer olguların klinik seyri ile ilgili bilgi verilmemiştir. Bizim mutasyon saptadığımız klinik açıdan evre IV NSCLC tanısı alan ve oldukça hızlı bir progresyon gösteren olgu 25’de *EGFR*, *KRAS* ve *BRAF* mutasyonlarının ve *PIK3CA* geninde başka bir mutasyonun saptanmamış olması bu mutasyonun hastalık patogenezinde önemli rol oynuyor olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bunu ortaya koyabilmek için translasyonel çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmüştür.

Olgu 24’te saptanan D549N mutasyonu literatürde endometrium kanserinde yapılmış bir çalışmada bir olguda T1025A mutasyonu ile birlikte

saptanmıştır (Murayama-Hosokawa ve ark., 2010). 39 insan kanseri hücre serisinden oluşan panel (JFCR39) üzerinde yapılan bir çalışmada kolon kanseri hücre serisi olan HCT-15'de *PIK3CA* geninde D549N mutasyonu saptandığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada mutasyonların kinaz aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde tek başına D549N mutasyonunun kinaz aktivitesini arttırmadığı ancak E545A/D549N mutasyonu ile birlikte olduğunda kinaz aktivitesinde artışa yol açtığı bildirilmiştir (Dan ve ark., 2010).

Whyte ve Holbeck'in yaptığı bir çalışmada E545K/D549N mutasyonu barındıran hücre serilerindeki kinaz aktivitesi incelenmiştir. Kinaz aktivitesini artırıcı değişiklik olarak 545.pozisyonundaki değişikliğin yeterli olduğu ve bu nedenle D549N değişikliğinin bystander değişiklik olabileceği bildirilmiştir (Whyte ve Holbeck, 2006).

Bizim olgumuzda da D549N mutasyonu tek başına bulunmayıp beraberinde D527N değişikliği saptanmıştır. D527N değişikliği daha önce bildirilmemiş bir mutasyondur. Yaban tip proteinin 527. pozisyonunda yer alan aspartik asit negatif yüklü polar bir aminoasittir. Pozitif yüklü aminoasitlerle etkileşerek tuz köprüleri oluşturur ve hidrojen bağlarını stabilize eder. Bu nedenle protein stabilitesinin sağlanmasında önemli rol oynar. Aspartik asitin yerini yine polar ama negatif yük içermeyen bir aminoasit olan asparajinin almış olması protein stabilitesini bozmuş olabilir. Bu iki mutasyonun birlikteliği P85 subünitinin katalitik subünit üzerindeki inhibitör etkisini azaltmış olabilir. Olgu 24'te tedavi direnci bu mutasyonlarla ilişkili olabilir.

Olgu 1, 5, 6, 12, 14, 16, 18, 23, 27, 33, 35, 42, 44, 48 ve 52'de saptanan L719V mutasyonu meme kanseri hastalarında yapılan bir çalışmada bir olguda H701P ve E707K mutasyonlarıyla birlikte saptanmıştır (Troxell ve ark., 2010). Aynı olgularda V680L mutasyonu da saptanmıştır. Her iki mutasyonun da polimorfizm olabileceği düşünülerek 30 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda *PIK3CA* geni ekzon 13'ün dizi analizi yapılmıştır ve 27 olguda her iki mutasyon da saptanmıştır. Bu nedenle belirtilen değişikliğin polimorfizm olduğu sonucuna varılmıştır.

Olgu 40'da saptanan V376I mutasyonu kanserde bildirilmemiş bir mutasyondur. Protein düzeyinde C2 domainine lokalize olan bu mutasyonda nötral ve nonpolar bir aminoasit olan valin yerine yine nötral ve nonpolar bir aminoasit olan izolösin gelmiştir. Her iki aminoasitinde yan zincirleri non-reaktif olduğu için bu aminoasitlerin genel olarak protein işlevi için çok önemli rol oynamadıkları bilinmektedir. Daha çok substrat tanınması ve bağlanmasında rol oynarlar. Bu mutasyon PI3K enziminin substratı PIP2'ye afinitesinin veya C2 domaininin lipid membranla etkileşimi sağlayan domain olması nedeniyle lipid membranla etkileşiminin artmasına yol açabilir. Bu mutasyonun saptanmış olduğu olgu 40'da gözlenen tedavi direnci, değişimin patojenik etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Olgu 47'de saptanan C147Y mutasyonu kanserde bildirilmemiş bir mutasyondur. Protein düzeyinde ABD ve RBD domainlerinin arasındaki bağlantı bölgesinde lokalizedir. Olgu 47'de saptanan tek mutasyondur ancak bu olguda DNA hem kalitatif hem de kantitatif açıdan yetersiz olduğundan sadece ekzon 2'ye bakılabilmektedir. Tirozin aminoasitinin fosforillenebilen bir aminoasit olması önemli bir aminoasit değişikliği gibi görünmekle beraber protein içerisinde yerleştiği konum itibarıyla protein fonksiyonu üzerine etkisiyle ilgili yorum yapabilmek için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

Olgu 42'de saptanan S292N mutasyonu kanserde bildirilmemiş bir mutasyondur. Protein düzeyinde RBD ile C2 domaini arasındaki bağlantı bölgesinde RBD'ye yakın yerleşimlidir. Bulunduğu bölgenin protein fonksiyonuna etkisi bilinmemektedir. Serin fosforillenebilen bir aminoasittir. Fosforillenebilen bir aminoasit rezidüsünün değişmesi proteinde fonksiyonel bir değişiklik yapmış olabilir. Bu olguda V680L, L719V mutasyonları ile KRAS kodon 61 mutasyonu bulunmaktadır. Kemoterapiden kısa süre sonra progresyon gösteren hastadaki agresif seyir muhtemelen KRAS mutasyonuna bağlıdır.

PIK3CA mutasyonlarının MAPK yolak mutasyonlarıyla birlikte bulunduğunu bildiren yayınlar mevcuttur (Janku ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda da olgu 5 ve 23'de *EGFR* ekzon 19 delesyonu, olgu 42'de *KRAS* kodon 61 mutasyonu ve olgu 16'da *BRAF* V600E mutasyonu

bulunmaktadır. Bu olgularda saptadığımız *PIK3CA* mutasyonlarının kinaz fonksiyonu üzerindeki etkileri tam bilinmediğinden, *EGFR*, *KRAS* ve *BRAF* mutasyonları yürütücü mutasyon olarak ön plana çıkmaktadır.

6. SONUÇLAR

1. Bu çalışmaya dahil edilen olguların %57,5'inde *PIK3CA* geninde değişim saptanmıştır. On bir farklı değişimin 3 tanesi polimorfizm olarak değerlendirilmiştir.
2. Olguların %7,5'inde NSCLC'de tanımlı fonksiyon kazancına yolaçtığı bilinen E545A mutasyonu saptanmıştır. Aynı olgularda ikinci bir mutasyon (S553Tfs*7) daha saptanmıştır. Bu iki mutasyonun birlikteliği CS olgularında tanımlanmıştır. NSCLC tanısıyla gelen hastalarda altta yatan bir kanser predispozisyon sendromu olabileceğini ortaya koyması açısından önemli bir bulgudur.
3. Olguların %5'inde NSCLC dışında diğer kanserlerde tanımlı R524K ve D549N mutasyonları saptanmıştır. Bunların karsinogeneziste etkili oldukları daha önce bildirildiğinden, NSCLC etyopatolojisinde de rol oynayabileceklerini düşündürmektedir.
4. Olguların %10'unda saptanan yeni mutasyonların hastalık etyopatolojisindeki rolü bilinmemekle birlikte, proteinin işlevsel önemi ve bazı mutasyonların doğası (frame shift mutasyonlarda olduğu gibi), bu değişimlerin de hastalık gelişiminde etkili olacağını düşündürmektedir.
5. *PIK3CA* proteinini hedefleyen terapötik ajanların geliştirildiği günümüzde diğer mutasyonların işlevsel ve translasyonel çalışmalarının yapılması büyük önem taşımaktadır.
6. Bu değişimlerin işlevsel önemi aydınlatıldığında olguların %20'si gibi bir bölümünde hedefli tedavi şansı gündeme gelebilir.

ÖZET

Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri Dokularında *PIK3CA* Mutasyonlarının Araştırılması

Kanser moleküler etyopatogenezinde rol oynayan onkogenlerin kodladıkları proteinlerin önemli bir kısmı protein kinaz olarak fonksiyon görmektedir. Mutasyonlar nedeniyle bu proteinlerin konstitüsyonel aktivite kazanmaları; hücre proliferasyonu, apoptoz, protein sentezi, hücre migrasyonu gibi pek çok hücresel işlevde rol alan sinyal yollarının aktive olmasına yol açar.

Kanser patogenezinde rol oynayan en önemli sinyal yollarından birisi de fosfatidil inozitol 3 kinaz (PI3K) sinyal yolağıdır. PI3K'lar içinde özellikle sınıf IA PI3K'ların kanser patogenezinde rol oynadıkları bilinmektedir. Sınıf IA PI3K'ların enzimatik fonksiyonundan temel olarak katalitik domaini p110 α izoformu sorumludur. *PIK3CA* geni tarafından kodlanmaktadır.

Literatürde *PIK3CA* geninin NSCLC dahil pek çok kanser türünde mutasyona uğradığı bildirilmektedir. Bu çalışma ülkemizde bu konuyla ilgili yapılmış ilk çalışmadır. Bu çalışma kapsamında 40 NSCLC tümör doku örneğinde *PIK3CA* geni dizi analizi yöntemiyle incelenmiştir. İncelenen doku örneklerinin %7,5'inde NSCLC ve diğer kanser türlerinde tanımlı 1634A>C mutasyonu saptanmıştır. Bu mutasyon oranı literatürde bildirilen oranlardan daha yüksektir. İlginç olarak bu mutasyonun saptandığı hastalarda ikinci bir mutasyon (1658_1659delGTinsC) daha saptanmıştır. Bu iki mutasyonun birlikteliği literatürde Cowden sendromu olarak bilinen kanser yatkınlık sendromu hastalarında bildirilmektedir. Bu bulgu NSCLC tanısıyla gelen hastalarda altta bir kanser predispozisyon sendromu olabileceğini göstermesi açısından son derece önemlidir. Olguların %5'inde *PIK3CA* geninde daha önce farklı kanser türlerinde bildirilmiş mutasyonlar ve %10'unda daha önce hiç bildirilmemiş mutasyonlar saptanmıştır. PI3KCA proteinini hedefleyen terapötik ajanların geliştirildiği günümüzde, bu mutasyonların kinaz aktivasyonuna etkilerini değerlendirebilmek için in vitro çalışmalar gereklidir. Eğer bu değişimlerin işlevsel önemi aydınlatılırsa olguların %20 gibi bir bölümünde hedefli tedavi şansı gündeme gelebilir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, NSCLC, *PIK3CA*, PI3K

SUMMARY

Investigation of *PIK3CA* Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer

Most of the proteins that are encoded by oncogenes which play a role in molecular pathogenesis of cancer, function as protein kinases. Constitutional activity acquired by these proteins due to the mutations leads to the activation of signaling pathways which are involved in cell proliferation, apoptosis, protein synthesis, cell migration and many other cellular processes.

One of the most important signaling pathways that plays a role in the pathogenesis of cancer is phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) signaling pathway. Especially class IA PI3Ks are known to play a role in the pathogenesis of cancer. Basically, p110 α isoform of catalytic domain accounts for the enzymatic function of class IA PI3Ks. It is encoded by *PIK3CA* gene.

In the literature it has been reported that *PIK3CA* gene mutated in many cancers including NSCLC. This is the first study on this topic in our country. In this study the *PIK3CA* gene are investigated by sequence analysis in 40 NSCLC tumor tissue samples. The 1634A>C mutation which has already been identified in many cancers and NSCLC was determined in 7.5% of the tumor tissue samples. This mutation rate is higher than reported in the literature. Interestingly a second mutation (1658_1659delGTinsC) was identified in these patients. The concurrence of these two mutations has been reported as Cowden syndrome in the literature which is known to be a cancer predisposition syndrome. This finding is quite important since it can be an indication of underlying cancer predisposition syndrome in NSCLC patients. In 5% of patients previously reported mutations in different cancer types in *PIK3CA* gene were identified whereas other mutations which have never been reported were detected in 10% of patients. Today as therapeutic agents which target PIK3CA protein are developed, *in vitro* studies are required to reveal the effects of these mutations on kinase activation. If the functional significance of these mutations are enlightened, the chance of targeted therapy may emerge in a group of patients as high as 20%.

Key words: Lung cancer, NSCLC, *PIK3CA*, PI3K

KAYNAKLAR

- ALAMGEER, M., Ganju, V., Watkins, D.N., Novel terapotic targets in non-small cell lung cancer, *Curr Opin Pharmacol*, 13(3), 394-401, (2013).
- AVIEL-RONEN, S., Blackhall, F.H., Shepherd, F.A., Tsao, M.S., K-RAS mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review, *Clin Lung Cancer*, 8(1), 30-8, (2006).
- BAOHUA Y., Xiaoyan Z., Tiecheng Z., Tao Q., Daren S., Mutations of the PIK3CA gene in diffuse large B cell lymphoma. *Diagn Mol Pathol.*, 17(3), 159-65, (2008).
- BEAN, J., Brennan, C., Shih, J.Y., Riely, G., Viale, A., Wang, L., Chitale, D., Motoi, N., Szoke, J., Broderick, S., Balak, M., Chang, W.C., Yu, C.J., Gazdar, A., Pass, H., Rusch, V., Gerald, V., Huang, S.F., Yang, P.C., Miller, V., Ladanyi, M., Yang, C.H., Pao, W., MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(52), 20932-7, (2007).
- BERGETHON, K., Shaw, A.T., Ou, S.H., Katayama, R., Lovly, C.M., McDonald, N.T., Massion, P.P., Siwak-Tapp, C., Gonzalez, A., Fang, R., Mark, E.J., Batten, J.M., Chen, H., Wilner, K.D., Kwak, E.L., Clark, J.W., Carbone, D.P., Ji, H., Engelman, J.A., Mino-Kenudson, M., Pao, W., Iafrate, A.J., ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers, *J Clin Oncol*, 30(8), 863-70, (2012).
- BERG M., Danielsen S.A., Ahlquist T., Merok M.A., Agesen T.H., Vatn M.H., Mala T., Sjo O.H., Bakka A., Moberg I., Fetveit T., Mathisen Q., Husby A., Sandvik O., Nesbakken A., Thiis-Evensen E., Lothe R.A., DNA Sequence Profiles of the Colorectal Cancer Critical Gene Set KRAS-BRAF-PIK3CA-PTEN-TP53 Related to Age at Disease Onset *PLoS One* 2010 Nov 12;5(11):e13978

- BIRCHMEIER, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., Vande Woude, G.F., Met, metastasis, motility and more, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(12), 915-25, (2003).
- BIRCHMEIER, C., Birnbaum, D., Waitches, G., Fasano, O., Wigler, M., Characterization of an activated human ROS gene. *Molec Cell Biol*, 6(9), 3109-16, (1986).
- BIRCHMEIER, C., Sharma, S., Wigler, M., Expression and rearrangement of the ROS1 gene in human glioblastoma cells. *Proc Nat Acad Sci*, 84(24), 9270-4, (1987).
- BRENNER, D.R., McLaughlin, J.R., Hung R.J., Previous Lung Diseases and Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis, *PLoS One*, 6(3), (2011).
- CANTLEY, L.C., The phosphoinositide-3 kinase pathway, *Science*, 296(5573), 1655-7 (2002).
- CAPPUZZO, F., Marchetti, A., Skokan, M., Rossi, E., Gajapathy, S., Felicioni, L., Del Grammastro, M., Sciarrotta, M.G., Buttitta, F., Incarbone, M., Toschi, L., Finocchiaro, G., Destro, A., Terracciano, L., Roncalli, M., Alloisio, M., Santoro, A., Varella-Garcia, M., Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients, *J Clin Oncol*, 27(10), 1667-74, (2009).
- CARPTEN, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Bokuslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S., Uhlink, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y.W., Zeckner, D.J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., Schevitz, R., Lai, M.H., Blanchard, K.L., Thomas, J.E., A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer, *Nature*, 448(7152), 439-44, (2007).
- Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>).

- CECCHI, F., Rabe, D.C., Bottaro, D.P., Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy, *Expert Opin Ther Targets*, 16(6), 553-72, (2012).
- CHAFT, J.E., Arcila, M.E., Paik, P.E., Lau, C., Riely G.J., Pietanza, M.C., Zakowski, M.F., Rusch, V., Sima, C.S., Ladanyi, M., Kris M.G., Coexistence of PIK3CA and other oncogene mutations in lung adenocarcinoma – rationale for comprehensive mutation profiling *Mol Cancer Ther.*, 11(2), 485-91, (2012)
- CHANG, H.W., Aoki, M., Fruman, D., Auger, K.R., Bellacosa, A., Tsichlis, P.N., Cantley, L.C., Roberts, T.M., Vogt, P.K., Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase. *Science*, 276(5230), 1848-50, (1997).
- CHIOSEA, S.I., Grandis, J.R., Lui, V.W., Diergaarde B., Maxwell, J.H., Ferris, R.,L., Kim, S.W., Luvison, A., Miller, M., Nikiforova, M.N., PIK3CA, HRAS and PTEN in human papillomavirus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2013 Dec 17; 13:602.,
- CHOUGULE, A., Prabhush, K., Noronha, V., Joshi, A., Thavamani, A., Chandrani, P., Upadhyay, P., Utture, S., Desai, S., Jambhekar, N., Dutt, A., Frequency of EGFR Mutations in 907 Lung Adenocarcinoma Patients of Indian Ethnicity. *PLoS One*, 4, 8(10), (2013).
- COLOMBINO M., Sperlongano P., Izzo F., Tatangelo F., Botti G., Lombardi A., Accardo M., Tarantino L., Sordelli I., Agresti M., Abbruzzese A., Caraglia M., Palmieri G., BRAF and PIK3CA genes are somatically mutated in hepatocellular carcinoma among patients from South Italy. *Cell Death Dis.* 2012 Jan 19;3:e259
- COURAUD, S., Zalcman, G., Milleron, B., Morin, F., Souquet, P.J., Lung Cancer in Never Smokers: A Review, *European Journal of Cancer*, 48, 1299-311, (2012).
- COURTNEY, K.D., Corcoran, R.B., Engelman, J.A., The PI3K pathway as a drug target in human cancer, *J Clin Oncol*, 28(6), 1075-83, (2010).

- D'ANGELO, S.P., Pietanza, M.C., The molecular pathogenesis of small cell lung cancer, *Cancer Biol Ther*, 10(1), 1-10 (2010).
- DAN S., Okamura M., Seki M., Yamazaki K., Sugita H., Okui M., Mukai Y., Nishimura H., Asaka R., Nomura K., Ishikawa Y., Yamori T., Correlating phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor efficacy with signaling pathway status: in silico and biological evaluations, *Cancer Res*, 70(12), 4982-94, (2010).
- DAVIES, K.D., Le, A.T., Theodoro, M.F., Skokan, M.C., Aisner, D.L., Berge, E.M., Terracciano, L.M., Cappuzzo, F., Incarbone, M., Roncalli, M., Alloisio, M., Santoro, A., Camidge, D.R., Varella-Garcia, M., Doebele R.C., Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer, *Clin Cancer Res*, 18(17), 4570-9, (2012).
- DOWNWARD, J., Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy, *Nat Rev Cancer*, 3(1), 11-22, (2003).
- EL-DEEB, I.M., Yoo, K.H., Lee, S.H., ROS receptor tyrosine kinase: a new potential target for anticancer drugs, *Med Res Rev*, (2010).
- ENGELMAN, J.A., Luo, J., Cantley, L.C., The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature*, 7(8), 606-19, (2006).
- ENGELMAN, J.A., Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations, *Nat Rev Cancer*, 9(8), 550-62, (2009).
- ENGELMAN, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J.O., Lindeman, N., Gale, C.M., Zhao, X., Christensen, J., Kosaka, T., Holmes, A.J., Rogers, A.M., Cappuzzo, F., Mok, T., Lee, C., Johnson, B.E., Cantley, L.C., Janne, P.A., *MET* amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling, *Science*, 316(5827), 1039-43, (2007).
- FERLAY, J., Shin, H.R., et al., Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, *Int J Cancer*, 127(12), 2893-917, (2010).

- FORDE, P.M., Ettinger, D.S., Targeted therapy for non-small-cell-lung cancer: past, present and future, *Expert Rev Anticancer Ther* 13(6), 745-58, (2013).
- FRESNO VARA, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., González-Barón, M., PI3K signaling pathway and cancer, *Cancer Treat Rev*, 30(2), 193-204, (2004).
- FRUMAN, D.A., Meyers, R.E., Cantley, L.C., Phosphoinositide kinases, *Annu Rev Biochem*, 67, 481-507, (1998).
- GEORGE, S., Rochford, J.J., Wolfrum, C., Gray, S.L., Schinner, S., Wilson, J.C., Soos, M.A., Murgatroyd, P.R., Williams, R.M., Acerini, C.L., Dunger, D.B., Barford, D., Umpleby, A.M., Wareham, N.J., Davies, H.A., Schafer, A.J., Stoffel, M., O'Rahilly, S., Barroso, I., A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in *AKT2*, *Science*, 304(5675), 1325-8, (2004).
- GOLDMAN, J.W., Garon, E.B., Targeting MEK for the treatment of non-small-cell lung cancer, *J Thorac Oncol*, 7(16 Suppl 5), 377-8, (2012).
- GOVINDAN, R., A review of epidermal growth factor receptor /HER2 inhibitors in the treatment of patients with non-small-cell lung cancer, *Clin Lung Cancer*, 11(1), 8-12, (2010).
- HARTMANN, W., Küchler, J., Koch A., Friedrichs, N., Waha, A., Endl, E., Czerwitzki, J., Metzger, D., Steiner, S., Wurst, P., Leuschner, I., Von Schweinitz, D., Buettner, R., Pietsch, T., Activation of phosphatidylinositol-3'-kinase/Akt signaling is essential in hepatoblastoma survival, *Clin Cancer Res*, 15(14), 4538-45, (2009).
- HENNESSY, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., Mills, G.B., Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery, *Nature Reviews*, 4(12), 988-1004, (2005).
- HIRSCH, F.R., Varella-Garcia, M., Dziadziuszko, R., Xiao, Y., Gajapathy, S., Skokan, M., Lin, M., O'Neill, V., Bunn, P.A., Fluorescence in situ hybridization subgroup analysis of TRIBUTE, a phase III trial of

- erlotinib plus carboplatin and paclitaxel in non-small cell lung cancer, *Clin Cancer Res*, 14(19), 6317-23, (2008).
- HIRSCH, F.R., Wynes, M.W., Gandara, D.R., Bunn, P.A., The tissue is the issue: Personalized Medicine for non-small cell lung cancer, *Clin Cancer Res*, 16(20), 4909-11, (2010).
- HORN, L., Pao, W., *EML4-ALK*: honing in on a new target in non-smallcell lung cancer, *J Clin Oncol*, 27(26), 4247-53, (2009).
- HORN, S., Berghotz, U., Jücker, M., McCubrey., J.A., Trümber, L., Stocking, C., Basecke, J., Mutations in the catalytic subunit of class IA PI3K confer leukemogenic potential to hematopoietic cells, *Oncogene*, 3, 27(29), 4096-106, (2008).
- HUANG, C.H., Mandelker, D., Schmidt-Kittler, O., Samuels, Y., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Gabelli, S.B., Amzel, L.M., The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science*. 14;318(5857):1744-8, (2007).
- HU, P., Margolis, B., Skolnik, E.Y., Lammers, R., Ullrich, A., Schlessinger, J., Interaction of phosphatidylinositol 3-kinase associated p85 with epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors, *Mol Cell Biol*, 12(3), 981-90, (1992).
- IWAHARA, T., Fujimoto, J., Wen, D., Cupples, R., Bucay, N., Arakawa, T., Mori, S., Ratzkin, B., Yamamoto, T., Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system, *Oncogene*, 14(4), 439-49, (1997).
- JANKU, F., Wheler, J.J., Naiging, A., Steapek, V.M., Falchook, G.S., Fu, S., Garrido-Laguna, I., Tsimberido, A.M., Piha-Paul, S.A., Moulder, S.L., Lee, J.J., Luthra, R., Hong, D.S., Kurzrock, R., PIK3CA mutations in advanced cancers: characteristics and outcomes, *Oncotarget*, 3(12), 1566-75 (2012).

- Ji, H., Li, D., Chen, L., Shimamura, T., Kobayashi, S., McNamara, Mahmood, U., Mitchell, A., Sun, Y., Al-Hashem, R., Chirieac, L.R., Padera, R., Bronson, R.T., Kim, W., Janne, P.A., Shapiro, G.I., Tenen, D., Johnson, B.E., Weisleder, R., Sharpless, N.E., Wong, K.K., The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR targeted therapies, *Cancer Cell*, 9(6), 485-95, (2006).
- Ji, M., Guan, H., Gao, C., Shi, B., Hou, P., Highly frequent promoter methylation and *PIK3CA* amplification in non small cell lung cancer (NSCLC), *BMC Cancer*, 11, 147, (2011).
- JONATHAN, M.S., Avila-Tang, E., Boffeta, P., Hannan, L.M., Olivo-Marston, S., Thun, M.J., Rudin, C.M., Lung Cancer in Never Smokers: Clinical Epidemiology and Environmental Risk Factors, *Clin Cancer Res*, 15(18), 5626-45, (2009).
- KAPLAN, D.R., Whitman, M., Schaffhausen, B., Raptis, L., Garcea, R.L., Pallas, D., Roberts, T.M., Cantley, L., Phosphatidylinositol metabolism and polyoma-mediated transformation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(11), 3624-8, (1986).
- KATSO, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., Waterfield, M.D., Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 615-75, (2001).
- KAWANO, O., Sasaki, H., Endo, K., Suzuki, E., Haneda, H., Yukiue, H., Kobayashi, Y., Yano, M., Fujii, Y., *PIK3CA* mutation status in Japanese lung cancer patients, *Lung Cancer*, 54(2), 209-15, (2006).
- KLIPPEL, A., Escobedo, J.A., Fantl, W.J., Williams, L.T., The C-terminal SH2 domain of p85 accounts for the high affinity and specificity of the binding of phosphatidylinositol 3-kinase to phosphorylated platelet-derived growth factor b receptor, *Mol Cell Biol*, 12(4), 1451-9, (1992).

- KONDO, M., Ji, L., Kamibayashi, C., Tomizawa, Y., Randle, D., Sekido, Y., Kashuba, V., Zabarovsky, E., Kozmin, I., Lerman, M., Roth, J., Minna, J.D., Overexpression of candidate tumor suppressor gene FUS1 isolated from the 3p21.3 homozygous deletion region leads to G1 arrest and growth inhibition of lung cancer cells, *Oncogene*, 20(43), 6258-62, (2001).
- KONG-BELTRAN, M., Seshagiri, S., Zha, J., Zhu, W., Bhawe, K., Mendoza, N., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Fu, L., Severin, C., Rangell, L., Schwall, R., Amler, L., Wickramasinghe, D., Yauch, R., Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer, *Cancer Res*, 66(1), 283-9, (2006).
- KRUCZYNSKI, A., Delsol, G., Laurent, C., Brousset, P., Lamant, L., Anaplastic lymphoma kinase as a teurapotic target, *Expert Opin Ther Targets*, 16(11), 1127-38, (2012).
- KUMAR, A., Petri, E.T., Halmos, B., Boqqon, T.J., Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer, *J Clin Oncol*, 26(10), 1742-51, (2008).
- LANDI, L., Minuti, G., D'Incecco, A., Cappuzzo, F., Targeting c-Met in the battle against advanced nonsmall-cell lung cancer, *Curr Opin Oncol*, 25(2), 130-6, (2013).
- LEE, S.Y., Kim, M.J., Jin, G., Yoo, S.S., Park, J.Y., Choi, J.E., Jeon, H.S., Cho, S., Lee, E.B., Cha, S.I., Park, T.I., Kim, C.H., Jung, T.H., Park, J.Y., Somatic mutations in epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in non-small cell lung cancers, *J Thorac Oncol*, 5(11), 1734-40, (2010).
- LEICHT, D.T., Balan, V., Kaplun, A., Singh-Gupta, V., Kaplun, L., Dobson, M., Tzivion, G., Raf kinases: function, regulation and role in human cancer, *Biochim Biophys Acta*, 1773(8), 1196-212, (2007).
- LIANG, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.H., Ciarallo, S., Catzavelos C., Beniston R., Franssen, E.,

- Slingerland, J.M., PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest, *Nat Med* 8(10), 1153-60, (2002).
- LIGRESTI, G., Militello, L., Steelman, L.S., Cavallaro, A., Basile, F., Nicoletti, F., Stivala, F., McCubrey, J.A., Libra M PIK3CA mutations in human solid tumors: roles in sensitivity to various therapeutic approaches, *Cell Cycle*, 8(9), 1352-8, (2009).
- LIU, P., Cheng, H., Roberts, T.M., Zhao, J.J., Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer, *Nat Rev Drug Discov*, 8(8), 627-44, (2009).
- LYNCH, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Haris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., Louis, D.N., Christiani, D.C., Settleman, J., Haber, D.A., Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib, *N Engl J Med*, 350(21), 2129-39, (2004).
- MALANGA, D., Scrima, M., De Marco, C., Fabiani, F., De Rosa, N., De Gisi, S., Malara, N., Savino, R., Rocco, G., Chiappetta, G., Franco, R., Tirino, V., Pirozzi, G., Viglietto, G., Activating E17K mutation in the gene encoding the protein kinase AKT1 in a subset of squamous cell carcinoma of the lung, *Cell Cycle*, 7(5), 665-9, (2008).
- MAO, C., Qiu, L.X., Liao, R.Y., Du, F.B., Ding, H., Yanq, W.C., Li, J., Chen, Q., KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies, *Lung Cancer*, 69(3), 272-8, (2010).
- MARCHETTI, A., Felicioni, L., Malatesta, S., Grazia, Sciarrotta, M., Guetti, L., Chella, A., Viola, P., Pullara, C., Mucilli, F., Buttitta, F., Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations, *J Clin Oncol*, 29(26), 3574-9, (2011).

- MARKS, J.L., Gong, Y., Chitale, D., Golas, B., McLellan, M.D., Kasai, Y., Ding, L., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Solit, D., Levine, R., Michel, K., Thomas, R.K., Rusch, V.W., Ladanyi, M., Pao, W., Novel *MEK1* mutation identified by mutational analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma, *Cancer Res*, 68(14), 5524-8, (2008).
- MARUYAMA, N., Miyoshi, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., Monden, M., Noguchi, S., Clinicopathologic analysis of breast cancers with PIK3CA mutations in Japanese women, *Clin Cancer Res*, 13, 408-14, (2007).
- MARUYAMA-HOSOKAWA S., Oda K., Nakagawa S., Ishikawa S., Yamamoto S., Shoji K., Ikeda Y., Uehara Y., Fukayama M., McCormick F., Yano T., Taketani Y., Aburatani H., Genome-wide single-nucleotide polymorphism arrays in endometrial carcinomas associate extensive chromosomal instability with poor prognosis and unveil frequent chromosomal imbalances involved in the PI3-kinase pathway, *Oncogene*, 1, 29(13), 1897-908, (2010).
- MAURER, G., Tarkowski, B., Baccarini, M., RAF kinases in cancer-roles and therapeutic opportunities, *Oncogene*, 30(32), 3477-88, (2011).
- MEDEMA, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L., Burgering, B.M., AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1, *Nature*, 404(6779), 782-7, (2000).
- MILED, N., Yan, Y., Hon, W.C., Perisic, O., Zvelebil, M., Inbar, Y., Schneidman-Duhovny, D., Wolfson, H.J., Backer, J.M., Williams, R.L., Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science* 317(5835), 239-242, (2007).
- MINO-KENUDSON, M., Chirieac, L.R., Law, K., Hornick, J.L., Lindeman, N., Mark, E.J., Cohen, D.W., Johnson, B.E., Janne, P.A., Iafrate, A.J., Rodiq, S.J., A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by Standard immunohistochemistry, *Clin Cancer Res*, 16(5), 1561-71, (2010).

- MINUTI, G., D'Incecco, A., Cappuzzo, F., Targeted therapy for NSCLC with driver mutations, *Expert Opin Biol Ther*, 13(10), 1401-12, (2013).
- MITSUUCHI, Y., Testa J.R., Cytogenetics and Molecular Genetics of Lung Cancer, *American Journal of Medical Genetics (Semin Med Genet)*, 115, 183-8, (2002).
- MOLINA, J.R., Yang, P., Cassivi, S.D., Schild, S.E., Adjei, A.A., Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, And Survivorship, *Mayo Clin Proc*, 83(5), 584-94, (2008).
- MORRIS, S.W., Kirstein, M.N., Valentine, M.B., Dittmer, K., Shapiro, D.N., Look, A.T., Saltman, D.L., Fusion of a kinase gene, *ALK*, to a nucleolar protein gene, *NPM*, in non-Hodgkin's lymphoma, *Science*, 267(5196), 316-7, (1995).
- MULLER, P.A., Vousden, K.H., P53 mutations in cancer, *Nat Cell Biol*, 15(1), 2-8, (2013).
- NIE, W., Tang, L., Zhang, H., Shao, J., Wang, Y., Chen, L., Li, D., Guan, X., Structural analysis of the EGFR TK domain and potential implications for EGFR targeted therapy, *International Journal of Oncology*, 40(6), 1763-9, (2012).
- NORMANNO, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., Salomon, D.S., Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer, *Gene*, 366(1), 2-16, (2006).
- ODORIZZI, G., Babst, M., Emr, S.D., Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast, *Trends Biochem Sci*, 25(5), 229-35, (2000).
- OKUDEA, K., Suzuki, M., Kageyama, S., Bunai, T., Nagura, K., Igarashi, H., Takamochi, K., Suzuki, K., Yamada, T., Niwa, H., Ohashi, R., Ogawa, H., Mori, H., Kitamura, H., Kaneko, T., Tsuneyoshi, T., Sugimura, H., *PIK3CA* mutation and amplification in human lung cancer, *Pathol Int*, 57(10), 664-71, (2007).

- ORLOFF M.S., He X., Peterson C., Chen F., Chen J.L., Mester J.L, Eng C., Germline PIK3CA and AKT1 Mutations in Cowden and Cowden-like Syndromes, *Am J Hum Genet*, 10, 92(1),76-80, (2013)
- OXNARD, G.R., Binder, A., Jänne, P.A., New targetable oncogenes in non-small-cell lung, *Cancer J Clin Oncol*, 31(8), 1097-104, (2013).
- PAEZ, J.G., Janne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boqqon, T.J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M.J., Sellers, W.R., Johnson, B.E., Meyerson, M., EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy, *Science*, 304(5676), 1497-500, (2004).
- PAIK, P.K., Arcila, M.E., Fara, M., Sima, C.S., Miller, V.A., Kris, M.G., Ladanyi, M., Riely, G.J., Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations, *J Clin Oncol*, 29(15), 2046-51, (2011).
- PAO, W., Girard, N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer, *Lancet Oncol*, 12(2), 175-80, (2011).
- PEKARSKY, Y., Palamarchuk, A., Huebner, K., Croce, C.M., FHIT as tumor suppressor: mechanisms and therapeutic opportunities, *Cancer Biol Ther*, 1(3), 232-6, (2002).
- PHAY, J.E., Shah, M.H., Targeting RET receptor tyrosine kinase activation in cancer, *Clin Cancer Res*, 16(24), 5936-41, (2010).
- PLEASANCE, E.D., Stevens, P.J., O'Meara, S., McBride, D.J., Meynert, A., Jones, D., Lin, M.L., Beare, D., Lau, K.W., Greenman, C., Nik-Zainal, S., Varela, I., Davies, H.R.,Ordonez, G.R., Mudie, L.J., Latimer, C., Edkins, S., Stebbings, L., Chen, L., Jia, M., Leroy, C., Marshall, J., Menzies, A., Butler, A., Teaque, J.W., Mangion, J., Sun, Y.A., Mclauqhlin, S.F., Peckham, H.E., Tsung, E.F., Costa, G.L., Lee, C.C., Minna, J.D., Gazdar, A., Birney, E., Rhodes, M.D., McKernan, K.J., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Campbell, P.J., A small lung cancer

- genome with complex signature of tobacco exposure, *Nature*, 463(7278), 184-90, (2010).
- POLITI, K., Zakowski, M.F., Fan, P.D., Schonfeld, E.A., Pao, W., Varmus, H.E., Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors, *Genes Dev*, 20(11),1496-510, (2006).
- REUNGWETWATTANA, T., Weoha, S.J., Molina, J.R., Oncogenic Pathways, Molecularly Targeted Therapies, and Highlighted Clinical Trials in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC), *Clinical Lung Cancer*, 13(4), 252-66, (2012).
- RONG, R., Jin, W., Zhang, J., Saeed Sheikh, M., Huang, Y., Tumor suppressor RASSF1A is a microtubule-binding protein that stabilizes microtubules and induces G/M arrest. *Oncogene* 23(50), 8216–8230, (2004) Lin F., Xiao D., Kolluri SK., Zhang X. Unique anti-activator protein- 1 activity of retinoic acid receptor beta, *Cancer Res*, 60(12), 3271-80, (2000).
- ROWINSKY, E.K., The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Med*, 55, 433-57, (2004).
- SAMUELS, Y., Diaz, L.A., Schmidt-Kittler, O., Cummins, J.M., Delong, L., Cheong, I., Rago, C., Huso, D.L., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, V.E., Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 2005 Jun;7(6):561-73.
- SAMUELS, Y., Ericson, K., Oncogenic PI3K and its role in cancer, *Curr Opin Oncol*, 18(1), 77-82, (2006).
- SAMUELS, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S.M., Riggins, G.J., Willson, J.K., Markowitz, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., High frequency of

- mutations of the PIK3CA gene in human cancers, *Science*, 304(5670), 554, (2004).
- SASAKI, H., Hikosaka, Y., Kawano, O., Moriyama, S., Yano, M., Fujii, Y., MEK1 and AKT2 mutations in Japanese lung cancer, *J Thorac Oncol*, 5(5), 597-600, (2010).
- SATO, M., Shames, D.S., Gazdar, A.F., Minna, J.D., A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer, *J Thorac Oncol*, 2(4), 327-43, (2007).
- SEQUIST, L.V., Heist, R.S., Shaw, A.T., Fidias, P., Rosovsky, R., Temel, J.S., Lennes, I.T., Diquemarth, S., Waltman, B.A., Bast, E., Tammireddy, S., Morissey, L., Muzikansky, A., Goldberg, S.B., Gainor, J., Channick, C.L., Wain, J.C., Gaissert, H., Donahue, D.M., Muniappan, A., Wright, C., Willers, H., Mathisen, D.J., Choi, N.C., Baselga, J., Lynch, T.J., Ellisen, L.W., Mino-Kenudson, M., Lanuti, M., Borger, D.R., Iafrate, A.J., Engelman, J.A., Dias-Santagata, D., Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice, *Annals of Oncology*, 22(12), 2616-24, (2011).
- SHARMA, S.V., Bell, D.W., Settleman, J., Haber, D.A., Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer, *Nat Rev Cancer*, 7(3), 169-81, (2007).
- SHAW, A.T., Yeap, B.Y., Mino-Kenudson, M., Diquemarth, S.R., Costa, D.B., Heist, R.S., Solomon, B., Stubbs, H., Admane, S., McDermott, U., Settleman, J., Kobayashi, S., Mark, E.J., Rodig, S.J., Chirieac, L.R., Kwak, E.L., Lynch, T.J., Iafrate, A.J., Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK, *J Clin Oncol*, 27(26), 4247-53, (2009).
- SHER, T., Dy, G.K., Adjei, A.A., Small cell lung cancer, *Mayo Clin Proc*, 83(3), 355-67, (2008).

- SHIGEMATSU, H., Gazdar, A.F., Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers, *Int J Cancer*, 118(2), 257-62, (2006).
- SHIGEMATSU, H., Takahashi, T., Nomura, M., Majmudar, K., Suzuki, M., Lee, H., Wistuba, I.I., Fong, K.M., Toyooka, S., Shimizu, N., Fujisawa, T., Minna, J.D., Gazdar, A.F., Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas, *Cancer Res*, 65(5), 1642-6, (2005).
- SODA, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Suqiyama, Y., Mano, H., Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small-cell lung cancer, *Nature*, 448(7153), 561-6, (2007).
- SOS, M.L., Koker, M., Weir, B.A., Heynck, S., Rabinovsky, R., Zander, T., Seeger, J.M., Weiss, J., Fisher, F., Frommolt, P., Michel, K., Peifer, M., Mermel, C., Girard, L., Peyton, M., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Garraway, L.A., Kashkar, H., Pao, W., Meyerson, M., Thomas, R.K., PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR, *Cancer Res*, 69(8), 3256-61, (2009).
- STEPHENS, P., Hunter, C., Bignell, G., Edkins, S., Davies, H., Teague, J., Stevens, C., O'Meara, S., Smith, R., Parker, A., Barthorpe, A., Blow, M., Brackenbury, L., Butler, A., Clarke, O., Cole, J., Dicks, E., Dike, A., Drozd, A., Edwards, K., Forbes, S., Foster, R., Gray, K., Greenman, C., Halliday, K., Hills, K., Kosmidou, V., Lugg, R., Menzies, A., Perry, J., Petty, R., Raine, K., Ratford, L., Shepherd, R., Small, A., Stephens, Y., Tofts, C., Varian, J., West, S., Widaa, S., Yates, A., Brasseur, F., Cooper, C.S., Flanagan, A.M., Knowles, M., Leung, S.Y., Louis, D.N., Looijenga, L.H., Malkowicz, B., Pierotti, M.A., Teh, B., Chenevix-Trench, G., Weber, B.L., Yuen, S.T., Harris, G., Goldstraw, P., Nicholson, A.G., Futreal, P.A., Wooster, R., Stratton, M.R., Lung

- cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours, *Nature*, 431(7008), 525-6, (2004).
- SUGIMOTO, Y., Whitman, M., Cantley, L.C., Erikson, R.L., Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(7), 2117-21, (1984).
- SUGIO, K., Kishimoto, Y., Virmani, A.K., Hung, J.Y., Gazdar, A.F., K-ras mutations are a relatively late event in the pathogenesis of lung carcinomas, *Cancer Res*, 54(22), 5811-5, (1994).
- TANG, X., Shigematsu, H., Bekele, B.N., Roth, J.A., Minna, J.D., Hong, W.K., Gazdar, A.F., Witsuba, I.I., EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients, *Cancer Res*, 65(17), 7568-72, (2005).
- TESTA, J.R., Bellacosa, A., AKT plays a central role in tumorigenesis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(20), 10983-5, (2001).
- THUN, M.J., Henley, S.J., Burns, D., Jemal, A., Shanks, T.G., Calle, E.E., Lung cancer death rates in lifelong nonsmokers, *Journal of the National Cancer Institute*, 98(10), 691-9, (2006).
- TREDAN O., Treilleux I., Wang Q., Gane N., Pissaloux D., Bonnin N., Petit T., Cretin J., Bonichon-Lamichhane N., Priou F., Lavau-Denes S., Mari V., Freyer G., Lebrun D., Alexandre J., Ray-Coquard I., Predicting everolimus treatment efficacy in patients with advanced endometrial carcinoma: a GINECO group study, *Target Oncol*, 13, (2012)
- TROXELL M.L., Levine J., Beadling J., Warrick A., Dunlap J., Presnell A., Patterson J., Shukla A., Olson N.R., Heinrich M.C., Corless C.L., High prevalence of PIK3CA/AKT pathway mutations in papillary neoplasms of the breast, *Mod Pathol.*, 23(1), 27-37.
- TSAO, M.S., Sakurada, A., Cutz, J.C., Zhu, C.Q., Kamel-Reid, S., Squire, J., Lorimer, I., Zhang, T., Liu, N., Daneshmand, M., Marrano, P., Santos, G., Lagarde, A., Richardson, F., Seymour, L., Whitehead, M., Dink, K.,

- Pater, J., Shepherd, P.A., Erlotinib in lung cancer—molecular and clinical predictors of outcome, *N Engl J Med*, 353(2),133-44, (2005).
- UNO, F., Sasaki, J., Nishizaki, M., Carboni, G., Xu, K., Atkinson, E.N., Kondo, M., Minna, J.D., Roth, J.A., Ji, L., Myristoylation of the fus1 protein is required for tumor suppression in human lung cancer cells, *Cancer Res*, 64(9), 2969-76, (2004).
- VIRMANI, A.K., Rathi, A., Zöchbauer-Müller, S., Sacchi, N., Fukuyama, Y., Bryant, D., Maitra, A., Heda, S., Fong, K.M., Thunnissen, F., Minna, J.D., Gazdar, A.F., Promoter Methylation and Silencing of the Retinoic Acid Receptor-Gene in Lung Carcinomas, *J Natl Cancer Inst*, 92(16), 1303-7, (2000).
- VOGT, P.K., Kang, S., Elsliger, M.A., Gymnopoulos M., Cancer specific mutations in phosphatidylinositol 3-kinase, *TRENDS in Biochemical Sciences*, 32(7), 342-9, (2007).
- WAKELEE, H.A., Chang, E.T., Gomez, S.L., Keeqan, T.H., Feskanich, D., Clarke, C.A., Holmberg, L., Yong, L.C., Kolonel, L.N., Gould, M.K., West, D.W., Lung cancer incidence in cancer in never smokers, *J Clin Oncol*, 25(5), 472-8, (2007).
- WALKER, E.H., Perisic, O., Ried, C., Stephens, L., Williams, R.L., Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling, *Nature*, 402(6759), 313-20, (1999).
- WANG, R., Hu, H., Pan, Y., Li, Y., Ye, T., Li, C., Luo, X., Wang, L., Li, H., Zhang, Y., Li, F., Lu, Y., Lu, Q., Xu, J., Garfield, D., Shen, L., Ji, H., Pao, W., Sun, Y., Chen, H., RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer, *J Clin Oncol*, 30(35), 4352-9, (2012).
- WELCKER, M., Singer, J., Loeb, K.R., Grim, J., Bloecher, A., Gurien- West, M., Clurman, B.E., Roberts, J.M., Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation, *Mol Cell*, 12(2), 381-92, (2003).

- WHO, Global Health Risks, Mortality and burden of disease attributable to selected major risks, (2009).
- WHYTE D.B., Holbeck S.L., Correlation of PIK3Ca mutations with gene expression and drug sensitivity in NCI-60 cell lines, *Biochem Biophys Res Commun*, 10, 340(2), 469-475.
- WU, C.Y., Hu, H.Y., Pu, C.Y., Huang, N., Shen, H.C., Li, C.P., Chou, Y.J., Pulmonary Tuberculosis Increases the Risk of Lung Cancer, *Cancer*, 117(3), 618-24 (2011).
- WURMSER, A.E., Emr, S.D., Novel PtdIns(3)P-binding protein Etf1 functions as an effector of the Vps34 PtdIns 3-kinase in autophagy, *J Cell Biol*, 158(4), 761-72, (2002).
- YANG, P.C., Au J.S., Sirinivash G., Cornelio G.H., Tsai J.M., Thansprasert S.,Molecular epidemiological prospective study, *J. Clin. Oncol* 30, (suppl; abstr 1534) (2012).
- YANO, T., Haro, A., Shikado, Y., Maruyama, R., Maehara, Y., Non-small cell lung cancer in never smokers as a representative “non smoking associated lung cancer”:epidemiology and clinical features, *Int J Clin Oncol*, 16(4), 287-93, (2011).
- YAP, T.A., Yan, L., Patnaik, A., Fearen, I., Olmos, D., Papadopoulos, K., Baird, R.D., Delgado, L., Taylor, A., Lupinacci, L., Riisnaes, R., Pope, L.L., Heaton, S.P., Thomas, G., Garrett, M.D., Sullivan, D.M., de Bono, J.S., Tolcher, A.W., First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors, *J Clin Oncol*, 29(35), 4988-95, (2011).
- YATABE, Y., Takahashi, T., Mitsudomi, T., Epidermal growth factor receptor gene amplification is acquired in association with tumor progression of EGFR-mutated lung cancer, *Cancer Res*, 68(7), 2106-11, (2008).
- YI, E.S., Boland, J.M., Maleszewski, J.J., Roden, A.C., Oliviera, A.M., Aubry, M.C., Erickson-Johnson, M.R., Caron, B.L., Li, Y., Tang, H., Stoddard, S., Wampfler, J., Kuliq, K., Yanq, P., Correlation of IHC and FISH for

- ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH, *J Thorac Oncol*, 6(3), 459-65, (2011).
- YOKOMIZO, A., Tindall, T.J., Drabkin, H., Gemmill, R., Franklin, W., Yang, P., Suqio, K., Smith, D.I., Liu, W., PTEN/MMAC1 mutations identified in small cell, but not in non-small cell lung cancers, *Oncogene*, 17(4), 475-9, (1998).
- ZHANG, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A., Kuriyan, J., An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor, *Cell*, 125(6), 1137-49, (2006).
- ZHAO, J.J., Gjoerup, O.V., Subramanian, R.R., Cheng, Y., Chen, W., Roberts, T.M., Hahn, W.C., Human mammary epithelial cell transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase, *Cancer Cell*, 3(5), 483-95, (2003).
- ZHAO, L., Vogt, P.K., Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(7), 2652-7, (2008).
- ZHAO, L., Vogt, P.K., Hot-spot mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K): differential interactions with the regulatory subunit p85 and with RAS, *Cell Cycle*, 9(3), 596-600, (2010).