





Nadir paranazal sinüs kanserlerinde yeni tanımlanan reseptör tirozin kinaz mutasyonları ve potansiyel fonksiyonel etkileri

Novel receptor tyrosine kinase mutations in rare paranasal sinus cancers and their potential functional implications

Bakiye Göker Bağca¹ 

Sercan Göde² 

Göksel Turhal² 

Neslihan Pınar Özateş³ 

Ali Veral⁴ 

Cumhur Gündüz⁵ 

Çiğır Biray Avcı⁵ 

¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

² Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³ Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

⁴ Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁵ Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

ÖZ

Amaç: Paranazal sinüs kanserleri oldukça nadir görülen heterojen bir hastalık grubudur. Maksiler sinüs skuamoz hücreli karsinomu, paranazal sinüs kanserlerinin anatomik ve histolojik olarak en yaygın alt tipidir. Bu kanserin genetik profiline dair bilginin sınırlı olması, hastaların hedefli tedavi seçeneklerinden yararlanamamasına neden olmaktadır. Çalışmamızda bu nadir kanserdeki reseptör tirozin kinaz mutasyonlarının tanımlanması ve mutasyonların olası fonksiyonel etkilerinin tahmin edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla 30 olgunun tümörüne ait FFPE dokulardan DNA izolasyonu gerçekleştirildi, olguların mutasyon profili yeni nesil sekanslama yöntemi ve biyoinformatik değerlendirme ile belirlendi. Belirlenen patojenik/ olası patojenik varyantların fonksiyonel etkileri farklı *in silico* araçlar yardımıyla tahminlendi.

Bulgular: Olgularının tamamında en az bir adet patojenik/olası patojenik *KIT*, *PDFGRA* ve *RET* mutasyonu belirlendi. *KIT* geninin katalitik bölgesindeki mutasyonların kinaz aktivitesini arttıracığı tahmin edildi. *PDFGRA* genindeki p.P567P ve p.D1074D mutasyonları, 30 olgunun tamamında ve SRA veritabanından elde edilen normal dokulara ait okumaların tümünde belirlendi.

Sonuç: Reseptör tirozin kinaz mutasyonlarının paranazal sinüs kanserlerinde de önemli rol oynayabileceğinin belirlenmiş olması özellikle artmış kinaz aktivitesini hedefleyen tedavi yaklaşımlarını bu olguların erişimine sunma potansiyeli taşıması bakımından oldukça önemlidir.

Anahtar Sözcükler: paranazal sinüs kanseri, maksiler sinüs skuamoz hücreli karsinomu, yeni nesil sekanslama, reseptör tirozin kinaz.

Bu çalışma Bakiye Göker Bağca'nın doktora tezinin bulgularından türetilmiştir.

ABSTRACT

Aim: Paranasal sinus cancers are a very rare heterogeneous group of diseases. Maxillary sinus squamous cell carcinoma is the most common anatomical and histological subtype of paranasal sinus cancers. The limited knowledge about the genetic profile of this cancer causes patients not to benefit from targeted therapy options. In our study, we aimed to identify receptor tyrosine kinase mutations in this rare cancer and to predict the possible functional effects of these mutations.

Sorumlu yazar: Bakiye Goker Bagca
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi
Biyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye
E-posta: goker.bb@gmail.com
Başvuru tarihi: 27.06.2022 Kabul tarihi: 17.10.2022

Materials and Methods: For this purpose, DNA isolation was performed from FFPE tissues belonging to the tumors of 30 cases, and the mutation profile of the cases was determined by next-generation sequencing and bioinformatics analyses. The functional effects of the determined pathogenic/ likely pathogenic variants were estimated by using different *in silico* tools.

Results: At least one pathogenic/ likely pathogenic *KIT*, *PDGFR*, and *RET* mutations were identified in all cases. It was predicted that mutations in the catalytic region of the *KIT* gene would increase kinase activity. Mutations *p.P567P* and *p.D1074D* in the *PDGFR* gene were detected in all 30 cases and all reads from normal tissues from the SRA database.

Conclusion: The determination that receptor tyrosine kinase mutations may play an important role in paranasal sinus cancers is crucial in terms of the potential to offer treatment approaches targeting increased kinase activity to these patients.

Keywords: paranasal sinus cancer, maxillary sinus squamous cell carcinoma, next-generation sequencing, receptor tyrosine kinase

GİRİŞ

Nazal kavite ve paranasal sinüs kanserleri, tüm kanserlerin yaklaşık binde ikisini oluşturan ve insidansı %0,001'in altında olan nadir malignitelere aittir. Nadir bir kanser türü olmakla birlikte anatomik ve histolojik olarak farklı alt tipleri içeren oldukça heterojen bir hastalık grubudur. Bu heterojen grubun yaklaşık %40'ını oluşturan, histolojik ve anatomik olarak en geniş alt tip ise maksiller sinüs skuamöz hücreli karsinomudur. Bu alt tipin insidansı yaklaşık milyonda dördü ve sağ kalım oranı, diğer alt tiplerle benzer şekilde %50'nin altındadır (1-3). Tedavi seçenekleri, cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapiyi içeren konvansiyonel yaklaşımlarla sınırlı durumdadır. Bu durum olguların görme, işitme, beslenme gibi hayati işlevlerini yerine getirememesine veya yaşam kalitesinin düşmesine, bunun yanında sınırlı tedavi uygulamaları nedeniyle beş yıllık sağ kalım oranının %50'nin altında kalmasına da neden olmaktadır (4).

Bu kanserde herhangi bir moleküler imza ya da tedavi hedefi tanımlanmamış olması hastaların modern hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarına ulaşamamasına neden olduğundan hastaların sağ kalımını arttırmak ve hayat kalitesini iyileştirebilmek için hastalığın zemininde bulunan genomik profilin aydınlatılması ve potansiyel tedavi hedeflerinin belirlenebilmesi büyük önem taşımaktadır.

Sinyal transdüksiyonu ekstraselüler alandan gelen sinyallerin hücre içine aktarılacak şekilde oluşturulmasını sağlayan moleküler kaskad içerir. Bu iletimin ilk basamağında hücre membranında yer alan reseptörler bulunmaktadır. Reseptör tirozin kinazlar (RTK'lar), transmembran yapıdaki protein kinazlardır.

Ekstraselüler altbirimleri aracılığıyla spesifik ligandları ile etkileşim kurmakta ve dimerizasyon gerçekleştirmektedirler. Bu etkileşim reseptörlerin aktivasyonunu sağlamaktadır. Membranı kateden transmembran altbirim intraselüler altbirimler tarafından takip edilmektedir. Bu altbirimlerden katalitik domain, reseptörün aktif bölgesini oluşturmaktadır. ATP bağlanma bölgesi aracılığıyla ATP ile etkileşim kurmakta ve bir fosfat grubunun hedef proteinin tirozin rezidüsüne transferini sağlamaktadır. Bu katalitik altbirim, reseptörün aktivitesini düzenleyen otoregülatör bir altbirim tarafından takip edilmektedir. *KIT*, *PDGFR* ve *MET* RTK'ları ekspresyon veya mutasyon bağlamında sinusal kanserlerde değerlendirilmiş olmakla birlikte (5, 6) fonksiyonel özellikleri üzerinde durulmamıştır.

Bu bağlamda çalışmamızda paranasal sinüs kanserlerinin en yaygın alt tipini oluşturan maksiller sinüs skuamöz hücreli karsinomunda hedefe yönelik bir tedavi adayı olan *KIT*, *PDGFR*, *MET*, *ALK* ve *RET* RTK'larının mutasyon profili değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hasta seçimi ve numune toplama

Çalışmaya Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda paranasal sinüs kanserinin maksiller sinüs skuamöz hücreli karsinomu tanısı almış ve rutin tedavi protokolü çerçevesinde opere edilen 30 olgunun tümörüne ait FFPE örnekleri dahil edildi. Bu çalışma Helsinki Deklarasyonu ve Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'nun 29.04.2020 tarih ve 20-4.2T/24 sayılı onayı doğrultusunda gerçekleştirildi (7).

Yeni nesil sekanslama aracılığıyla reseptör tirozin kinaz mutasyonlarının belirlenmesi

FFPE dokularından DNA izolasyonu, GeneRead DNA FFPE Kiti (Qiagen, Kat. No: 180134) ve QIAcube cihazı (Qiagen, Kat. No: 9001292) kullanılarak izole edildi. DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflığı Qubit 4 Fluorometer (Life Technologies, Kat. No: Q33238), Qubit dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Kat. No: Q32851) ve NanoDrop 1000 Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak ölçüldü. Konsantrasyon ve A260/A280 değerleri sırasıyla $\geq 6,5$ ng/ μ l ve $\sim 1,8$ olan numuneler çalışmaya dahil edildi. Kütüphane, her örnek için 150 ng giriş DNA'sı ile Human Actionable Solid Tumor Panel (Qiagen DHS101Z, Kat. No: 333502) kullanılarak hazırlandı. Kitaplıkların fragment uzunlukları QIAxcel Advanced System (Qiagen, Kat. No: 9002123), QIAxcel Screen Gel (Qiagen, Kat. No: 9001941) ve QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen, Kat. No: 929002); konsantrasyonları ise QIAseq Library Quant System QIAseq Library Quant Assay Kit (Qiagen, Kat.No: 333314) ve Rotor Gene (Qiagen, Kat. No: 9001580) ile belirlendi. Fragment uzunluğu 300–1000 baz çifti aralığında olan kütüphaneler çalışmaya dahil edildi. Yeni nesil sekanslama MiniSeq MidOutput Kit (Illumina, FC-420-1004), Nextera XT Index Kiti2 (Illumina, Kat. No: FC-131-2001) ve MiniSeq (Illumina) cihazı ile gerçekleştirildi. Sekans döngüleri (300 döngü) tamamlandıktan sonra, her numune için ileri (R1) ve geri (R2) okumalardan oluşan iki ayrı .fastq dosyası dışa aktarıldı.

Biyoinformatik değerlendirme

Her örneğe ait R1 ve R2 okumalarının .fastq dosyaları eşleştirilerek CLC Genomics Workbench 20 (Qiagen Bioinformatics) yazılımına aktarıldı. Bu yazılımda uygun filtrelemeler gerçekleştirilerek primerlerin kırılması, okumaların genoma hizalanması, varyantların belirlenmesi marjinal varyantların uzaklaştırılmasının ardından her örnek kopya sayısı değişimleri (CNV'ler), bilinen (önceden tanımlanmış) varyantları ve yeni (önceden tanımlanmamış) varyantları belirlemek için üç ayrı grupta analiz edildi. CNV'ler QCI Analyze (Qiagen, Kat. No: 188001) sistemi, bilinen varyantlar QCI Interpret, yeni varyantlar VarSome veritabanı (<https://varsome.com/>) (8) kullanılarak belirlendi. Varyantların patojenik, olası patojenik, benign ve olası benign olarak tanımlanması

ACMG/AMP 2015 ve AMP/ASCO/CAP 2017 yönergelerine göre gerçekleştirildi (9, 10).

SRA veritabanı kullanılarak benign fenotipin belirlenmesi

Olası benign fenotipin tanımlanabilmesi için NCBI Sequence Reading Archive (SRA) veritabanından (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) paranazal sinüs skuamöz hücreli karsinomlu olguların normal doku örneklerine ait (Erişim numaraları: SRR5831063, SRR5831053, SRR5831054, SRR5831056, SRR5831069, SRR5831065) .fastq okumaları elde edildi. Bu okumalar diğer örneklerle aynı şekilde biyoinformatik olarak değerlendirildi.

Fonksiyonel tahminler

Gen ve protein sekansları, bölge ve domain bilgileri NCBI/ Nucleotide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>), Ensembl/ Sequence (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons), Ensembl/ Protein (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary), NCBI/Protein (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) ve NCBI/CCDS (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS>) veritabanlarından elde edildi. Mutasyon taşıyan diziler manuel olarak ExPASy/Translate (<https://web.expasy.org/translate>) aracı ile elde edildi. Genin kodladığı proteinlerin birbiriyle etkileşimi STRING v11.5 (<https://string-db.org/>) veritabanı ile belirlendi [eşik değeri 0,7]. Varyantların ilgili genin fonksiyonel birimleri üzerindeki potansiyel etkilerini tahmin etmek için farklı biyoinformatik araçlar kullanıldı. Gen-miRNA etkileşimleri, valide miRNA-hedef dizileri miRTarBase 8.0 (<http://mirtarbase.cuhk.edu.cn/php/index.php>) (11) kullanılarak belirlendi [K/T (NCBI Reference Sequence: NC_000004.11; hg19, GRCh37.p13 (55604724– 55604780 nükleotit arasındaki bölge)]. ATP bağlanma etkinliği ATPint (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/atpint/index.html>) (12) aracı ile belirlendi [ALK (NCBI Reference: NP_004295.2), RET (NCBI Reference: NP_066124.1), PDGFRA (Ensembl: ENST00000257290.9) genleri değerlendirildi, eşik değeri 0,2]. Kinaz aktivitesinin belirlenmesinde Kinact (<http://biosig.unimelb.edu.au/kinact>) (13) aracı kullanıldı [RET (PDB: 4CKJ), PDGFRA (PDB: 5K5X), KIT (PDB: 6KLA, 6GQJ, 6GQM)]. Protein-

protein etkileşimleri ISLAND (https://island.pythonanywhere.com/welcome/default/index) (14) aracı ile belirlendi [PDGFRA (Ensembl ENST00000257290.9; Ig-benzeri domaindeki varyasyonlar; PDGFRA, PDGFA;Ensembl ENSP00000346508.5 vePDGFB; Ensembl ENSP00000330382.6 ile karşılaştırıldı). KIT (Ensembl ENSP00000288135.6; Ig-benzeri domaindeki varyasyonlar KIT ve KITLG; Ensembl ENSP0000054216.5 ile karşılaştırıldı)].

İstatistiksel analizler

Olgularda ortak olarak belirlenen ($n > 2$) tüm patojenik/ olası patojenik varyantların sağ kalım, metastaz ve nüks ile ilişkisi ve farklı gen bölgelerinde (UTR ve ekzon bölgeleri) patojenik/ olası patojenik varyant taşımanın sağ kalım, metastaz ve nüks ile ilişkisi GraphPad Prism 8 yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Kaplan-Meier analizi ve Gehan-Breslow-Wilcoxon testi uygulanarak ortalama sağ kalım süreleri ve p değerleri elde edildi. Parametrik olmayan nüks ve metastaz verilerinin analizinde ki-kare testi uygulandı.

BULGULAR

***KIT* geninin mutasyon profili**

KIT geninin ekzon, intron, 3'UTR bölgelerinde toplam 2238 adet varyant, ayrıca altı olguda amplifikasyon belirlendi (Şekil-1a). Toplam varyant yoğunluğu ekzon 2, 18 ve 21'de yüksek olmakla birlikte patojenik/ olası patojenik varyantlar ekzon 8 ve 18'de birikim gösterdi. Ekzon 8'de 28 olguda ortak şekilde patojenik/ olası patojenik varyant belirlendi (Şekil-1b). Bu genin kodladığı proteinin en yüksek ilişki kurduğu beş protein EPOR, KITLG, SH2B3, PIK3R1 ve GRB2 olarak belirlendi (Şekil-1c). Patojenik ve olası patojenik varyantların genin kodladığı proteinin kinaz domaini (566. ve 907. aminoasitler arası) üzerinde yoğunlaştığı, bunların büyük çoğunluğunun yeni varyantlar olduğu belirlendi (Şekil-1d). Patojenik c.1238delC delesyonu 23 olguda ortak şekilde belirlendi (Şekil-1e). Kinaz domainini kodlayan dizilerinde belirlenen tüm ($n \geq 2$) yanlış anlamlı patojenik/ olası patojenik varyantların kinaz fonksiyonunu aktive edici özelliği bulunduğu belirlendi (Şekil-1f). Ig-benzeri domainde meydana gelen patojenik/ olası patojenik varyasyonların ($n \geq 5$) ligand-reseptör etkileşimini azaltacağı tahmin edildi (Şekil-1g). 3'UTR'de CACCC dizisini etkileyen iki mutasyonun beş olguda miR-342-

5p'nin bağlanma dizisini ortadan kaldıracığı tahmin edildi (Şekil-1h). SRA verilerinde de belirlenen p. L862L, p.M541L, p.I798I ve p.I935I varyantlarının benign özellikle ilişkilendirilebileceği tahmin edildi (Şekil-1i).

KIT geninde p.L71Hfs*3 mutasyonu taşıyan olgularda meydan sağ kalım 9 ay, taşımayan olgularda ise 41 ay olarak belirlendi. Bu mutasyonun sağ kalımla ilişkisi anlamlı bulundu ($p= 0,005$). Bu gendeki p.D737Efs*24 mutasyonunun nüks ile ilişkisinin anlamlı olduğu belirlendi ($p=0,0143$; Tablo-1).

***PDGFRA* geninin mutasyon profili**

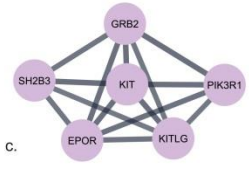
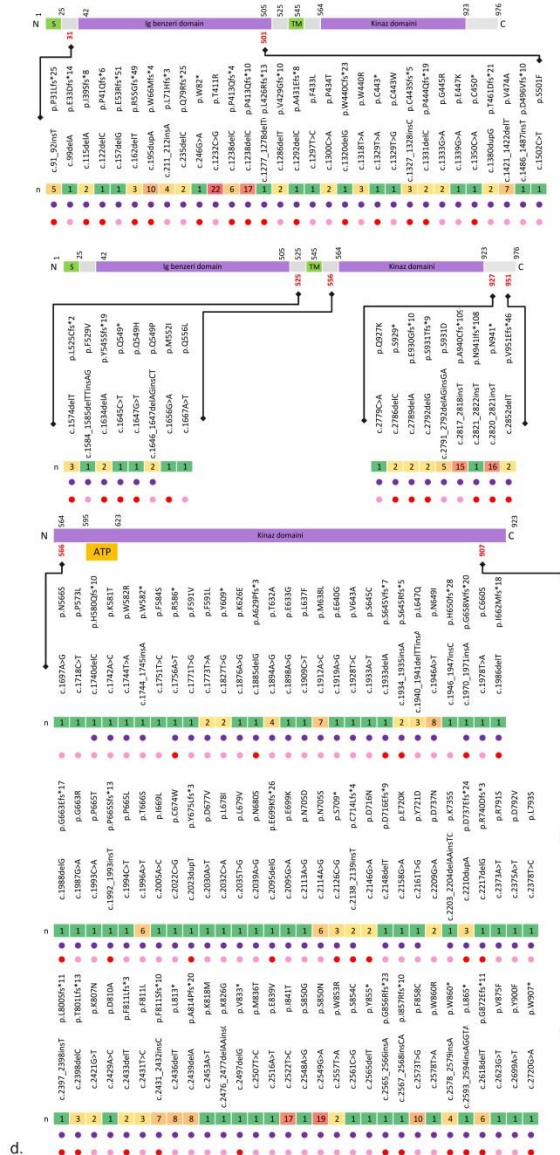
PDGFRA geninin ekzon, intron, 3'UTR bölgelerinde toplam 2.111 adet varyant belirlendi (Şekil-2a). Toplam varyant yoğunluğu ekzon 3, 7 ve 23'te yüksek olmakla birlikte patojenik varyantlar ekzon 7'de birikim gösterdi. Ekzon 7'de 21 olguda ortak şekilde patojenik/ olası patojenik varyant belirlendi (Şekil-2b). Bu genin kodladığı proteinin en yüksek ilişki kurduğu beş protein PDGFA, PIK3R1, PDGFC, PDGFB ve CRK olarak belirlendi (Şekil-2c). Patojenik ve olası patojenik varyantların genin kodladığı proteinin kinaz domaini (601. ve 821. aminoasitler arası) üzerinde yoğunlaştığı, bunların büyük çoğunluğunun yeni varyantlar olduğu belirlendi (Şekil-2d). Patojenik c.934_935insG insersiyonu 25 olguda ortak şekilde belirlendi (Şekil-2e). Kinaz domainini kodlayan dizilerinde belirlenen tüm ($n \geq 2$) yanlış anlamlı patojenik/ olası patojenik varyantların kinaz fonksiyonunu aktive edici özelliği bulunduğu belirlendi (Şekil-2f). Ig-benzeri domainde meydana gelen patojenik/ olası patojenik varyasyonların ($n \geq 5$) PDGFA ligandı ile bağlanmayı arttırabileceği tahmin edildi (Şekil-2h). SRA verilerinde de belirlenen p.P567P, p.D1074D, p.V824V, p.G313G, p.N204N, p.S478P, p.A603A ve p.G79D varyantlarının benign özellikle ilişkilendirilebileceği tahmin edildi (Şekil-2i).

PDGFRA geninde p.A663Cfs*26 mutasyonu taşıyan olgularda meydan sağ kalım 5,5 ay, taşımayan olgularda ise 41 ay olarak belirlendi. Bu mutasyonun sağ kalımla ilişkisi anlamlı bulundu ($p=0,0086$; Tablo-1). Bu genin ekzon 12 bölgesinde patojenik/ olası patojenik varyant taşıyan olgularda meydan sağ kalım 20 ay, taşımayan olgularda ise 70 ay olarak belirlendi. Bu ekzonda patojenik/ olası patojenik varyant taşınmasının sağ kalımla ilişkisi anlamlı bulundu ($p=0,0417$; Tablo-2).

	Toplam Varyantlar					Eşsiz Varyantlar				
	Ekzon	Intron	3'UTR	CNV	Toplam	Ekzon	Intron	3'UTR	CNV	Toplam
Bilinen	201	36	0	6	243	97	13	0	1	111
Yeni	745	1222	34	0	2001	247	432	17	0	696
Toplam	946	1258	34	6	2244	344	445	17	1	807

Varyant	Ekzonlar									
	ekzon1	ekzon2	ekzon3	ekzon4	ekzon5	ekzon6	ekzon7	ekzon8	ekzon9	ekzon10
Toplam	131	46	83	97	41	71	4	56	65	43
Eşsiz	46	26	26	36	22	35	3	28	33	14
Toplam patojenik	30	66	12	10	13	3	38	29	12	
Eşsiz patojenik	10	16	5	6	12	2	19	17	8	

Olgu	Ekzonlar									
	ekzon1	ekzon2	ekzon3	ekzon4	ekzon5	ekzon6	ekzon7	ekzon8	ekzon9	ekzon10
Toplam	29	28	29	22	23	4	25	26	23	
Toplam Patojenik	20	28	11	10	8	3	24	16	10	

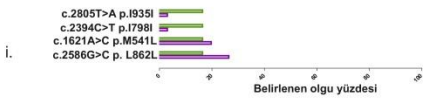


Alterasyon	Alterasyon	24	23	22	21	20	Yeni
c.2529_2530delCTinsAC	p.N843_C844delinsKR						
c.1238delC	p.P413Qfs*4						
c.1232C>G	p.P413Qfs*10						
c.2914G>C	p.T411R						
c.2541_2542delGTinsAG	p.V972L						
	p.F848V						

Alterasyon	n	Etki
p.T632A	4	▲
p.M638L	7	▲
p.N649I	8	▲
p.T666S	6	▲
p.I841T	17	▲
p.S850N	19	▲
p.F888C	10	▲
p.S931D	5	▲

ligand	Ig benzeri domain					
	KIT Y T	p.F311Lfs*25	p.W66Mfs*4	p.T411R	p.P413Qfs*4	p.P413Qfs*10
dimer	-	5	10	22	6	17
KITLG	-	-10,19	-0,71	-0,86	-	-
KIT Y T	-	-10,45	-	-10,44	-10,30	-10,29

Yeni	Alterasyon	n	Etkilenen dizi	miRNA	Valide hedef geni
●	c.*24C>T	2	CACCCC	hsa-miR-342-5p	ENIG
●	c.*25C>A	3			



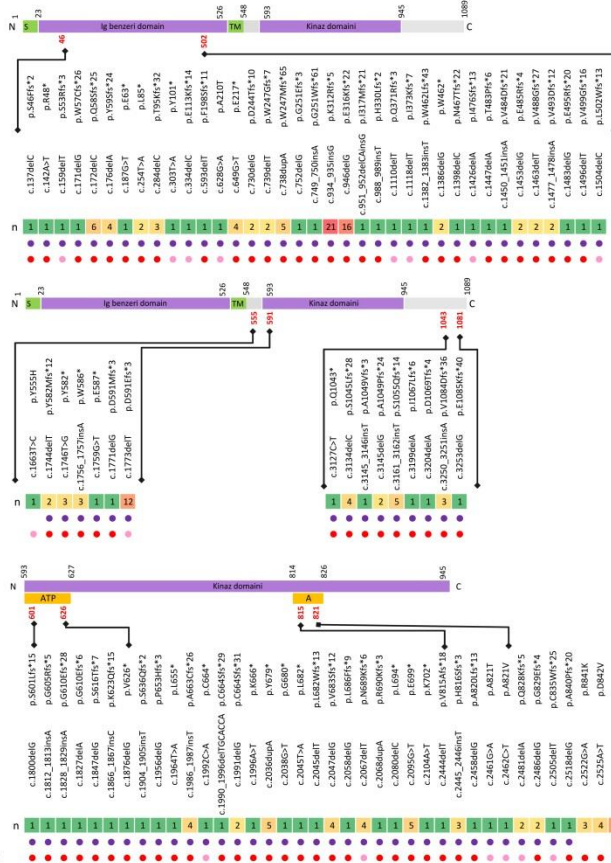
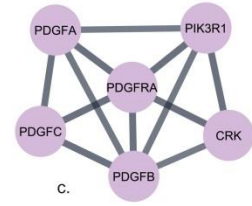
● Belirgin değil
 ● Olası patojenik
 ● Patojenik
 ● Yeni
 ■ Çalıgımaya ait veriler
 ■ SRA verileri
 ■ Aktive edici mutasyon
 ■ Bağlanma afinitesi artışı
 n Olgu sayısı
 N Amino terminal
 C Karboksil terminali
 S Sinyal peptidi
 TM Transmembran
 Ig İmmünooglobulin

Şekil-1. KIT geninde belirlenen varyantların genel perspektifi. a. Belirlenen toplam ve yeni varyantların sayısal dağılımı, b. Toplam varyantların, patojenik/ olası patojenik varyantların ekzonlara göre dağılımı ve her ekzonda varyant ve patojenik/ olası patojenik varyant taşıyan olgu sayısı, c. Genin kodladığı proteinin en yüksek etkileşim kurduğu beş protein, d. Patojenik/ olası patojenik varyantların detaylı dağılımı, e. En yüksek sayıda olguda ortak olarak belirlenen varyasyonlar, f. Yanlış anlamlı mutasyonların katalitik aktivite üzerindeki potansiyel etkisi, g. Mutasyonların protein-protein etkileşimi üzerine olası etkisi, h. Varyasyonların gen-miRNA etkileşimi üzerine olası etkisi, i. Varyasyonların SRA verileri ile karşılaştırılması ve potansiyel benign varyantlar.

	Toplam Varyantlar				Eşsiz Varyantlar			
	Ekzon	Intron	3'UTR	Toplam	Ekzon	Intron	3'UTR	Toplam
Bilinen	224	35	2	261	92	12	1	105
Yeni	827	966	57	1850	333	775	27	1135
a. Toplam	1051	1001	59	2111	425	787	28	1240

Varyant	Ekzonlar															
	ekzon1	ekzon2	ekzon3	ekzon4	ekzon5	ekzon6	ekzon7	ekzon8	ekzon9	ekzon10	ekzon11	ekzon12	ekzon13	ekzon14	ekzon15	ekzon16
Toplam	144	34	50	4	138					92		105	69	57	43	
Eşsiz	67	19	27	3	29					61		32	36	29	26	
Toplam patojenik	23	2	15		41					16		23	7	12	25	
Eşsiz patojenik	11	2	6		6					12		7	7	8	11	

Olgu	Ekzonlar															
	ekzon1	ekzon2	ekzon3	ekzon4	ekzon5	ekzon6	ekzon7	ekzon8	ekzon9	ekzon10	ekzon11	ekzon12	ekzon13	ekzon14	ekzon15	ekzon16
Toplam	29	18	23	4	30					26		30	28	23	21	
Toplam Patojenik	16	2	11		21					10		14	6	7	16	

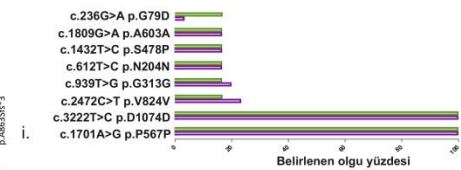


Alterasyon	n	Etki
c.1701A>G	30	●
c.3222T>C	25	●
c.932A>G	20	●
c.934_935insG	20	●
c.941T>C	20	●
p.P567P	25	●
p.D1074D	20	●
p.E311G	20	●
p.K312Rfs*5	20	●
p.F314S	20	●

Alterasyon	n	ATP bağlanma bölgesi	Etki
PDGFRA YT	-	814 CVHRLAaRNVLI 826	-
p.D591Efs*3	12	-	X

Alterasyon	n	Etki
p.D842V	4	▲
p.R841K	3	▲

İg-benzeri domain	n			
	PDGFRA YT	p.Q685Sfs*25	p.K312Rfs*5	p.E316Kfs*22
dimer PDGFRA YT	-10.29	-10.34	-10.44	-10.16
ligand PDGFRA YT	-10.48	-10.73	-10.97	-10.77
PDGFB YB	-10.10	-10.87	-10.87	-10.10



- Açıklamalar**
- Benign
 - Belirgin değil
 - Olası patojenik
 - Patojenik
 - Yeni
 - S Sinyal peptidi
 - A Aktif bölge
 - N Amino terminal
 - K Karboksil terminal
 - TM Transmembran domain
 - X Dizi ortadan kalkar
 - ▲ Aktive edici mutasyon
 - n Olgu sayısı
 - Çalışmaya ait veriler
 - SRA verileri
 - Bağlanma afinitesi artışı

Şekil-2. PDGFRA geninde belirlenen varyantların genel perspektifi. a. Belirlenen toplam ve yeni varyantların sayısal dağılımı, b. Toplam varyantların, patojenik/ olası patojenik varyantların ekzonlara göre dağılımı ve her ekzonda varyant ve patojenik/ olası patojenik varyant taşıyan olgu sayısı, c. Genin kodladığı proteinin en yüksek etkileşim kurduğu beş protein, d. Patojenik/ olası patojenik varyantların detaylı dağılımı, e. En yüksek sayıda olguda ortak olarak belirlenen varyasyonlar, f. Mutasyonların ATP bağlanma dizisi üzerindeki potansiyel etkisi, g. Yanlış anlamlı mutasyonların katalitik aktivite üzerindeki potansiyel etkisi h. Mutasyonların protein-protein etkileşimi üzerine olası etkisi, i. Varyasyonların SRA verileri ile karşılaştırılması ve potansiyel benign varyantlar.

MET geninin mutasyon profili

MET geninin ekzon ve intron bölgelerinde toplam 113 adet varyant belirlendi (Şekil-3a). Tüm varyantlar ekzon 19'da belirlendi bu bölgede 12 olguda ortak şekilde patojenik/ olası patojenik varyant belirlendi (Şekil-3b). Bu genin kodladığı proteinin en yüksek ilişki kurduğu beş protein

CDH1, GAB1, HGF, CBL ve GRB2 olarak belirlendi (Şekil-3c). Kinaz domaini üzerindeki olası patojenik c.3851T>A mutasyonu dört olguda ortak şekilde belirlendi (Şekil-3d).

Tablo-1. Olgularda ortak şekilde belirlenen (n >2) patojenik/ olası patojenik varyantların sağ kalım, nüks ve metastaz ile ilişkisi

Gen	Mutasyon	Sağ kalım				Nüks		Metastaz	
		Varyant taşıyan olgularda medyan sağ kalım (ay)	Varyant taşımayan olgularda medyan sağ kalım (ay)	p değeri	Anlamlılık	p değeri	Anlamlılık	p değeri	Anlamlılık
KIT	p.P31Lfs*25	28,00	40,00	0,4546	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.R55Gfs*49	49	39	0,2812	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.W66Mfs*4	n/a	39	0,4441	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.L71Hfs*3	9	41	0,005	**	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.T411R	40	39	0,9129	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.P413Qfs*4	28	40	0,8329	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.P413Qfs*10	41	39	0,7498	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.W440R	n/a	39	0,6153	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.C443Sfs*5	n/a	39	0,3585	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.V474A	24	40	0,4796	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.L525Cfs*2	n/a	39	0,4973	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.T632A	24	40	0,6746	ns	0,0547	ns	n/a	ns
KIT	p.M638L	11	41	0,2519	ns	n/a	ns	0,356	ns
KIT	p.L647Q	n/a	39	0,5194	ns	0,4142	ns	0,051	ns
KIT	p.N649I	14	41	0,4382	ns	0,7119	ns	n/a	ns
KIT	p.T666S	40	39	0,6651	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.N705S	14	40	0,5322	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.S709*	41	40	0,8392	ns	0,4142	ns	n/a	ns
KIT	p.D737Efs*24	44,5	40	0,547	ns	0,0143	*	n/a	ns
KIT	p.T801Lfs*13	n/a	39	0,696	ns	0,4142	ns	n/a	ns
KIT	p.F811L	n/a	39	0,3246	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.F811Sfs*10	n/a	24	0,0544	ns	0,8469	ns	n/a	ns
KIT	p.L813*	n/a	24	0,0253	*	0,7119	ns	n/a	ns
KIT	p.A814Pfs*20	n/a	24	0,0253	*	0,7119	ns	n/a	ns
KIT	p.I841T	40	39	0,626	ns	0,41	ns	n/a	ns
KIT	p.S850N	41	39	0,6308	ns	0,8655	ns	n/a	ns
KIT	p.F858C	40	39	0,6398	ns	0,4884	ns	n/a	ns
KIT	p.W860*	11	41	0,0619	ns	n/a	ns	0,1143	ns
KIT	p.G872Efs*11	14	40	0,65	ns	>0,9999	ns	n/a	ns
KIT	p.S931D	39	40	0,8155	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	p.A940Cfs*109	41	26,5	0,2338	ns	0,6242	ns	n/a	ns
KIT	p.N941*	41	14	0,1028	ns	0,7434	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.D842V	25,5	40	0,6176	ns	n/a	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.R841K	12	40	0,1859	ns	n/a	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.Q58Sfs*25	41	39	0,8582	ns	n/a	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.Y59Sfs*24	40	39	0,7195	ns	n/a	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.T95Kfs*32	8	40	0,1934	ns	n/a	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.E217*	41	39	0,8035	ns	0,631	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.W247Mfs*65	8	41	0,1097	ns	0,8266	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.K312Rfs*5	70	39	0,391	ns	0,593	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.E316Kfs*22	70	39	0,3638	ns	0,7434	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.Y582*	10	40	0,4792	ns	n/a	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.W586*	40	39	0,9047	ns	0,4142	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.D591Efs*3	28	70	0,1595	ns	0,3173	ns	0,7651	ns
PDGFRA	p.A663Cfs*26	5,5	41	0,0086	**	0,631	ns	0,1143	ns
PDGFRA	p.Y679*	10,5	40	0,3009	ns	n/a	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.V683Sfs*12	n/a	28	0,1328	ns	n/a	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.N689Kfs*6	25	41	0,5967	ns	n/a	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.E699*	28	40	0,768	ns	0,1251	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.H816Sfs*3	n/a	39	0,696	ns	0,4142	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.K860*	n/a	31,5	0,1257	ns	0,3173	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.W861Mfs*5	21	41	0,2484	ns	0,4602	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.A863Sfs*3	28	41	0,3606	ns	0,8266	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.S1045Lfs*28	40	39	0,5338	ns	n/a	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.S1055Qfs*14	n/a	39	0,276	ns	0,8266	ns	n/a	ns
PDGFRA	p.V1084Dfs*36	53	40	0,3134	ns	n/a	ns	n/a	ns
MET	p.T1259Kfs*7	8	40	0,1934	ns	n/a	ns	0,051	ns
MET	p.V1284E	24	40	0,8072	ns	0,631	ns	n/a	ns
RET	p.E595Dfs*9	40	39	0,5737	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.E598Sfs*40	24	40	0,4513	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.E598Dfs*6	28	70	0,2987	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.Q626Rfs*12	8	41	0,0027	**	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.S653P	39	40	0,4488	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.N702Tfs*29	n/a	39	0,3112	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.P766S	39	40	0,9387	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.D771V	70	39	0,677	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.S774Qfs*6	39	n/a	0,5356	ns	n/a	ns	0,1904	ns
RET	p.E775Rfs*69	39	n/a	0,5356	ns	n/a	ns	0,1904	ns

RET	p.E775Afs*69	39	n/a	0,5356	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.F776L	39	n/a	0,5356	ns	n/a	ns	0,1904	ns
RET	p.L779*	39	n/a	0,5356	ns	n/a	ns	0,1904	ns
RET	p.K780Qfs*64	39	n/a	0,5356	ns	n/a	ns	0,1904	ns
RET	p.N783Y	39	41	0,8396	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.H784L	10,5	40	0,217	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.I788L	25	41	0,5441	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.C794P	23	40	>0,9999	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.Q796L	23	40	>0,9999	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.D797G	n/a	39	0,6667	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.L870H	n/a	39	0,5994	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.H872P	70	40	0,3437	ns	0,593	ns	n/a	ns
RET	p.R873W	11	41	0,2715	ns	n/a	ns	n/a	ns
RET	p.Q910Rfs*36	14	41	0,3087	ns	>0,9999	ns	n/a	ns
ALK	p.E1472Rfs*49	85,5	40	0,9435	ns	n/a	ns	n/a	ns
ALK	p.Q1428Hfs*49	24	40	>0,9999	ns	0,593	ns	n/a	ns
ALK	p.P1423Lfs*54	24	70	0,2102	ns	0,1017	ns	0,5229	ns
ALK	p.K1416*	55,5	39	0,2587	ns	n/a	ns	n/a	ns
ALK	p.I1399*	n/a	39	0,2015	ns	0,631	ns	n/a	ns
ALK	p.V1265Gfs*19	24	40	0,8569	ns	0,3344	ns	n/a	ns
ALK	p.R1264Qfs*98	24	40	0,7319	ns	0,2207	ns	n/a	ns
ALK	p.C1255Afs*3	39	40	0,6915	ns	0,7119	ns	0,4399	ns
ALK	p.L1221Wfs*37	92	28	0,1281	ns	n/a	ns	n/a	ns
ALK	p.Q1217Sfs*68	16,5	40	0,1709	ns	0,2207	ns	n/a	ns
ALK	p.E1197Rfs*88	n/a	28	0,1201	ns	n/a	ns	n/a	ns
ALK	p.E1110Rfs*23	70	39	0,3648	ns	n/a	ns	n/a	ns
ALK	p.D1107Gfs*26	41	25,5	0,4075	ns	0,4884	ns	n/a	ns
ALK	p.K1079*	11	40	0,5553	ns	0,8469	ns	n/a	ns
ALK	p.Q1064*	40	70	0,7365	ns	0,7119	ns	n/a	ns
ALK	p.H989Pfs*4	41	39	0,5941	ns	0,7119	ns	n/a	ns
ALK	p.L861Afs*4	41	39	0,6076	ns	0,4142	ns	n/a	ns
ALK	p.T523Pfs*12	40	39	0,7219	ns	0,729	ns	n/a	ns

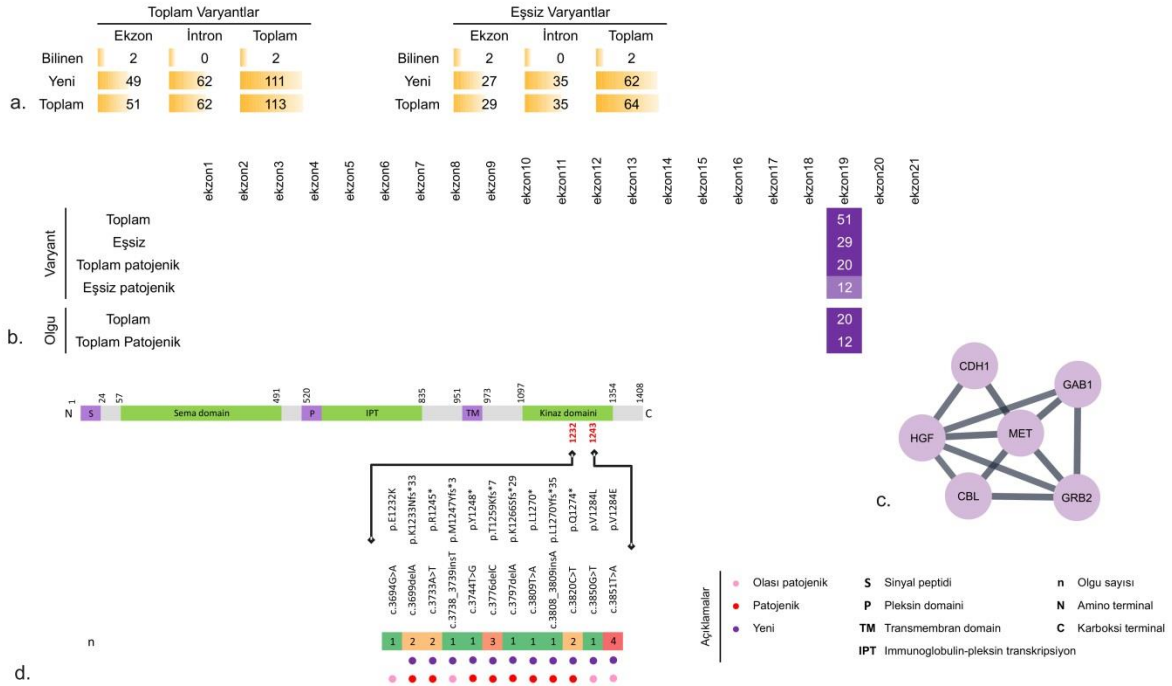
n/a: hesaplanamayan değerler; ns: istatistiksel olarak anlamlılık vermeyen sonuçlar; *p≤0,05; **p≤0,01

Tablo-2. Gen bölgelerindeki patojenik/ olası patojenik varyantların sağ kalım, nüks ve metastaz ile ilişkisi

Gen	Gen bölgesi	Sağ kalım				Nüks		Metastaz	
		Varyant taşıyan olgularda medyan sağ kalım (ay)	Varyant taşımayan olgularda medyan sağ kalım (ay)	p değeri	Anlamlılık	p değeri	Anlamlılık	p değeri	Anlamlılık
KIT	Amplifikasyon	n/a	40,00	0,5560	ns	n/a	ns	0,2723	ns
KIT	3'UTR	41,00	26,00	0,3685	ns	0,5127	ns	n/a	ns
KIT	Ekzon 2	40	39	0,539	ns	0,729	ns	n/a	ns
KIT	Ekzon 8	39	n/a	0,8724	ns	0,631	ns	n/a	ns
KIT	Ekzon 9	24	n/a	0,0784	ns	0,3969	ns	0,6855	ns
KIT	Ekzon 10	70	39	0,6612	ns	0,4884	ns	n/a	ns
KIT	Ekzon 11	18	70	0,161	ns	0,8266	ns	n/a	ns
KIT	Ekzon 12	60,5	39	0,2697	ns	n/a	ns	n/a	ns
KIT	Ekzon 13	28	70	0,2786	ns	0,2207	ns	0,4642	ns
KIT	Ekzon 14	40	39	0,5585	ns	0,7434	ns	0,9221	ns
KIT	Ekzon 15	28	40	0,8335	ns	0,2207	ns	n/a	ns
KIT	Ekzon 17	n/a	14	0,1935	ns	0,41	ns	n/a	ns
KIT	Ekzon 18	40	39	>0,9999	ns	>0,9999	ns	0,4642	ns
KIT	Ekzon 19	28	41	0,6157	ns	0,8266	ns	n/a	ns
KIT	Ekzon 20	39	40	0,7257	ns	0,3969	ns	n/a	ns
KIT	Ekzon 21	40	39	0,7473	ns	>0,9999	ns	n/a	ns
PDGFRA	3'UTR	40	n/a	0,5453	ns	0,593	ns	n/a	ns
PDGFRA	Ekzon 3	40	39	0,6431	ns	0,1017	ns	n/a	ns
PDGFRA	Ekzon 4	4	40	0,2367	ns	0,1904	ns	n/a	ns
PDGFRA	Ekzon 5	41	28	0,7231	ns	0,8655	ns	n/a	ns
PDGFRA	Ekzon 7	70	39	0,391	ns	0,593	ns	n/a	ns
PDGFRA	Ekzon 10	40	39	0,7324	ns	0,729	ns	n/a	ns
PDGFRA	Ekzon 12	20	70	0,0417	*	0,7434	ns	0,1176	ns
PDGFRA	Ekzon 13	10,5	40	0,2897	ns	>0,9999	ns	n/a	ns
PDGFRA	Ekzon 14	10	41	0,1248	ns	0,8469	ns	0,356	ns
PDGFRA	Ekzon 15	40	39	0,9805	ns	0,5127	ns	n/a	ns
PDGFRA	Ekzon 18	41	39	0,3224	ns	0,8655	ns	0,6855	ns
PDGFRA	Ekzon 19	n/a	32	0,3817	ns	0,7434	ns	n/a	ns

PDGFRA	Ekzon 23	40	24	0,5901	ns	0,6242	ns	n/a	ns
MET	Ekzon 19	40	70	0,2839	ns	>0,9999	ns	0,7651	ns
RET	Ekzon 10	39	n/a	0,6323	ns	0,8655	ns	n/a	ns
RET	Ekzon 11	41	39	0,3188	ns	0,1416	ns	n/a	ns
RET	Ekzon 13	39	n/a	0,3743	ns	0,1904	ns	0,7858	ns
RET	Ekzon 15	40	40	0,455	ns	0,1251	ns	0,5127	ns
RET	Ekzon 16	17	70	0,0751	ns	0,0648	ns	n/a	ns
ALK	Ekzon 5	70	28	0,1685	ns	n/a	ns	n/a	ns
ALK	Ekzon 8	41	39	0,304	ns	0,8691	ns	n/a	ns
ALK	Ekzon 15	9,5	n/a	0,0086	**	0,4602	ns	n/a	ns
ALK	Ekzon 18	41	39	0,9373	ns	0,593	ns	n/a	ns
ALK	Ekzon 19	40	41	0,5394	ns	n/a	ns	n/a	ns
ALK	Ekzon 20	40	39	0,878	ns	0,631	ns	n/a	ns
ALK	Ekzon 21	28,5	40	0,6833	ns	0,1904	ns	n/a	ns
ALK	Ekzon 22	34,5	40	0,5273	ns	n/a	ns	0,011	*
ALK	Ekzon 23	41	39	0,5431	ns	n/a	ns	n/a	ns
ALK	Ekzon 24	39	40	0,4363	ns	0,1416	ns	0,9221	ns
ALK	Ekzon 25	39	40	0,4604	ns	>0,9999	ns	0,2723	ns
ALK	Ekzon 29	39	40	0,6971	ns	>0,9999	ns	0,2723	ns

n/a: hesaplanamayan değerler; ns: istatistiksel olarak anlamlılık vermeyen sonuçlar; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$



Şekil-3. MET geninde belirlenen varyantların genel perspektifi. a. Belirlenen toplam ve yeni varyantların sayısal dağılımı, b. Toplam varyantların, patojenik/ olası patojenik varyantların ekzonlara göre dağılımı ve her ekzonda varyant ve patojenik/ olası patojenik varyant taşıyan olgu sayısı, c. Genin kodladığı proteinin en yüksek etkileşim kurduğu beş protein,

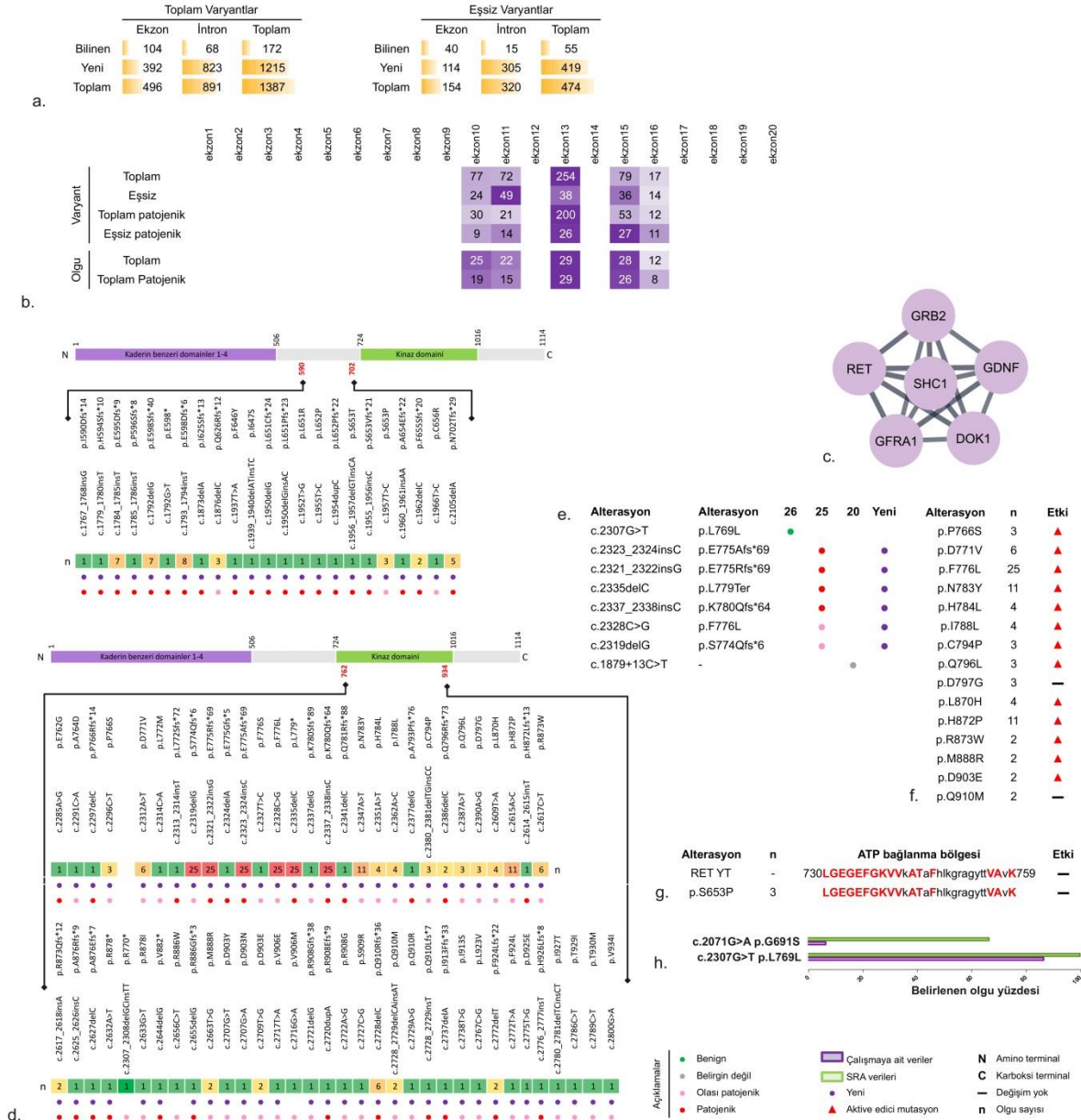
RET geninin mutasyon profili

RET geninin ekzon ve intron bölgelerinde toplam 1387 adet varyant belirlendi (Şekil-4a). Toplam varyant ve patojenik/ olası patojenik varyant yoğunluğu ekzon 13'te belirlendi ve bu ekzonda 29 olguda ortak şekilde patojenik varyant belirlendi (Şekil-4b). Bu genin kodladığı proteinin en yüksek ilişki kurduğu beş protein GRB2, GDNF, DOK1, GFRA1 ve SHC1 olarak belirlendi

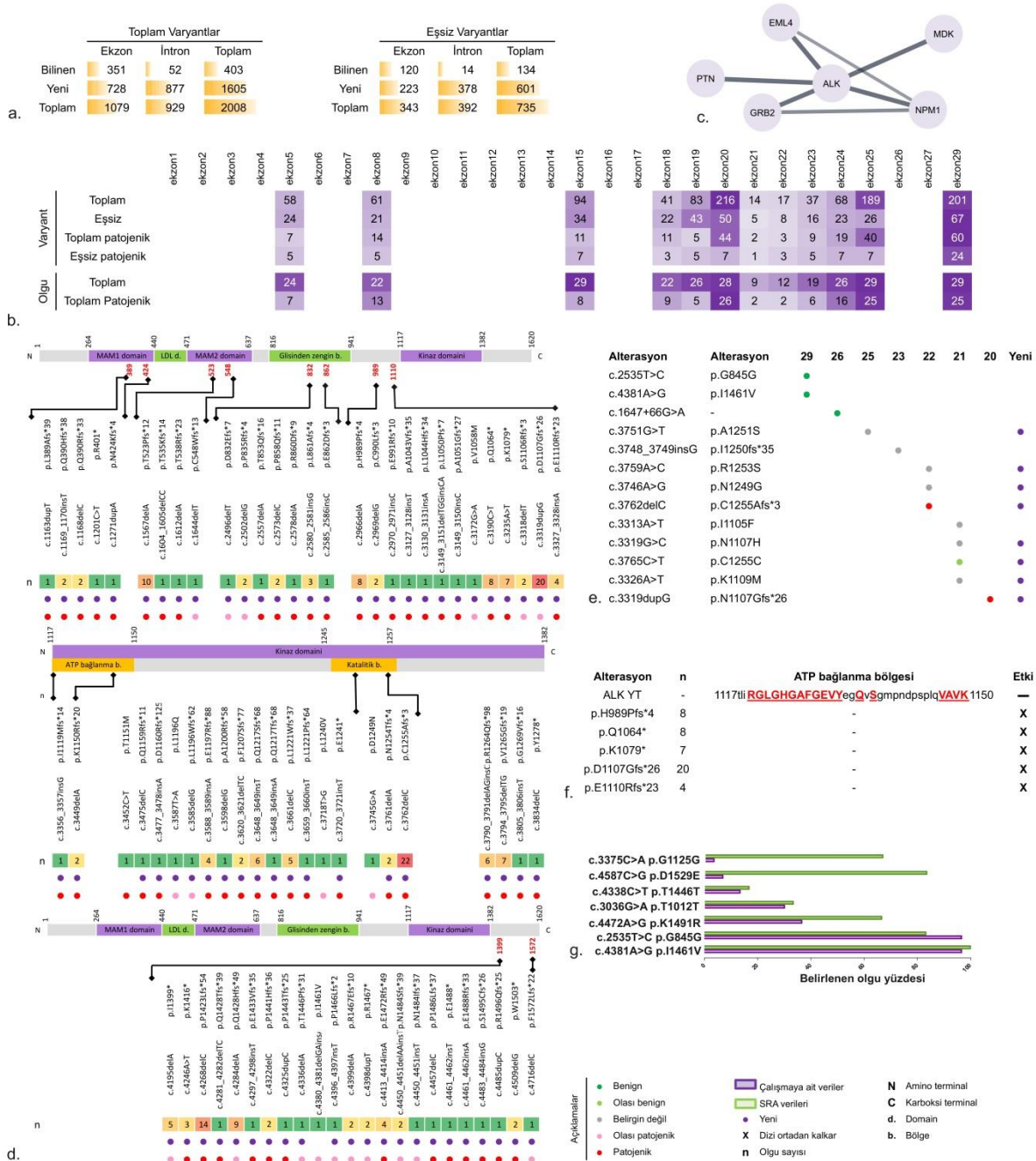
(Şekil-4c). Patojenik ve olası patojenik varyantların genin kodladığı proteinin kinaz domaini (762. ve 934. aminoasitler arası) üzerinde yoğunlaştığı, bunların büyük çoğunluğunun yeni varyantlar olduğu belirlendi (Şekil-4d). Yeni tanımlanan patojenik c.2323_2324insC, c.2321_2322insG, c.2335delC, c.2337_2338insC ve olası patojenik c.2328C>G ve c.2319delG varyasyonları 25 olguda ortak şekilde belirlendi (Şekil-4e). Kinaz

domainini kodlayan dizilerinde belirlenen tüm (n ≥ 2) yanlış anlamlı patojenik/ olası patojenik varyantların çoğunun kinaz fonksiyonunu aktive edici özelliği bulunduğu belirlendi (Şekil-4f). SRA verilerinde de belirlenen p.L769L ve p.G691S varyantlarının benign özelliklerle ilişkilendirilebileceği tahmin edildi (Şekil-4h).

RET geninde p.Q626Rfs*12 mutasyonu taşıyan olgularda meydan sağ kalım 8 ay, taşımayan olgularda ise 41 ay olarak belirlendi. Bu mutasyonun sağ kalımla ilişkisi anlamlı bulundu (p=0,0027; Tablo-1).



Şekil-4. RET geninde belirlenen varyantların genel perspektifi. a. Belirlenen toplam ve yeni varyantların sayısal dağılımı, b. Toplam varyantların, patojenik/ olası patojenik varyantların ekzonlara göre dağılımı ve her ekzonda varyant ve patojenik/ olası patojenik varyant taşıyan olgu sayısı, c. Genin kodladığı proteinin en yüksek etkileşim kurduğu beş protein, d. Patojenik/ olası patojenik varyantların detaylı dağılımı, e. En yüksek sayıda olguda ortak olarak belirlenen varyasyonlar, f. Yanlış anlamlı mutasyonların katalitik aktivite üzerindeki potansiyel etkisi, g. Mutasyonların ATP bağlanma dizisi üzerindeki potansiyel etkisi, h. Varyasyonların SRA verileri ile karşılaştırılması ve potansiyel benign varyantlar.



Şekil-5. ALK geninde belirlenen varyantların genel perspektifi. a. Belirlenen toplam ve yeni varyantların sayısal dağılımı, b. Toplam varyantların, patojenik/ olası patojenik varyantların ekzonlara göre dağılımı ve her ekzonda varyant ve patojenik/ olası patojenik varyant taşıyan olgu sayısı, c. Genin kodladığı proteinin en yüksek etkileşim kurduğu beş protein, d. Patojenik/ olası patojenik varyantların detaylı dağılımı, e. En yüksek sayıda olguda ortak olarak belirlenen varyasyonlar, f. Mutasyonların ATP bağlanma dizisi üzerindeki potansiyel etkisi g. Varyasyonların SRA verileri ile karşılaştırılması ve potansiyel benign varyantlar.

ALK geninin mutasyon profili

ALK geninin ekzon ve intron bölgelerinde toplam 2.008 adet varyant belirlendi (Şekil-5a). Toplam varyant ve patojenik yoğunluğu ekzon 20, 25 ve

29'da birikim gösterdi. Ekzon 20'de 26 olguda ortak şekilde patojenik/ olası patojenik varyant belirlendi (Şekil-5b). Bu genin kodladığı proteinin en yüksek ilişki kurduğu beş protein PTN, EML4, GRB2, NPM1 ve MDK olarak belirlendi (Şekil-5c).

Patojenik ve olası patojenik varyantların genin kodladığı proteinin kinaz domaini (1117. ve 1382. aminoasitler arası) üzerinde yoğunlaştığı, bunların büyük çoğunluğunun yeni varyantlar olduğu belirlendi (Şekil-5d). Patojenik c.3762delC delesyonu 22 olguda ortak şekilde belirlendi (Şekil-5e). Katalitik bölgede meydana gelen patojenik/ olası patojenik varyantların ATP bağlanma dizisini ortadan kaldıracağı tahmin edildi (Şekil-5f). SRA verilerinde de belirlenen p.L1461V, p.G845G, p.K1491R, p.T1012T, p.T1446T, p.D1529E ve p.G1125G varyantlarının benign özellikle ilişkilendirilebileceği tahmin edildi (Şekil-5g).

ALK geninin 15. ekzonunda patojenik/ olası patojenik varyant taşıyan olgularda meydan sağ kalım 9,5 ay olarak belirlendi. Bu ekzonda patojenik/ olası patojenik varyant taşınmasının sağ kalımla ilişkisi anlamlı bulundu ($p= 0,0086$). Bu genin 22. ekzonunda patojenik/ olası patojenik varyant taşınmasının ise metastaz ile ilişkisi ise anlamlı olarak belirlendi ($p=0,011$; Tablo-2).

TARTIŞMA

KIT ve *PDGFRA* genleri sınıf III RTK'ları olan PDGFR ailesi kinazlarını kodlamaktadır (15). Çalışmamızda değerlendirilen olgulardan altı tanesinde *KIT* amplifikasyonu belirlenmiştir. *KIT* amplifikasyonunun kanserde rol aldığı bilinmekle birlikte (16) paranazal sinüs kanseri ile ilişkilendirildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan olguların %20'lik bölümünde belirlenen bu amplifikasyon, özellikle olguların bireysel olarak değerlendirilebilmesi ve *KIT* amplifikasyonunu hedefleyen tirozin kinaz inhibitörleri açısından değerlendirilmesinin önemini ortaya koymaktadır. Literatürde bulunan, beş adet inverted papillom kökenli sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu olguda *KIT* mutasyonunu değerlendiren çalışmada, olguların birinde mutasyon belirlenmiş, aynı mutasyon, tümörün köken aldığı benign lezyonda da saptanmış olduğundan benign olarak değerlendirilmiştir (5). Bununla birlikte çalışmamızda değerlendirilen otuz olgunun tamamında en az bir adet *KIT* varyasyonu belirlenmiştir. Ayrıca bu gen üzerinde saptanan varyantların yaklaşık %90'ı literatürde daha önce tanımlanmamış yeni varyantlardan oluşmaktadır. Bu durum farklı kanser tipleri açısından da yol gösterici bir rol oynayabilecektir. Ayrıca olguların tümünde en az bir adet patojenik/ olası patojenik *KIT* mutasyonu tanımlanmıştır. Tanımlanan patojenik/ olası patojenik varyantların genin kodladığı proteinin fonksiyonel özellikleri üzerine

olası etkileri bakımından değerlendirilebilmesi için çeşitli tahminleme araçlarından yararlanılmıştır.

Ligand-reseptör etkileşiminde görevli Ig-benzeri domainleri kodlayan dizilerde belirlenen patojenik çerçeve kayması mutasyonlarının [R55Gfs*49 (3/30), W66Mfs*4 (10/30), L71Hfs*3 (4/30), Q79Rfs*25 (2/30)] *KIT*'in ligandı olan *KITLG* ile etkileşim üzerine etkisi değerlendirildiğinde etkileşimin azalacağı tahmin edilmiştir. Benzer şekilde, dimerizasyon ilişkili bölgelerdeki mutasyonların [T411R (22/30), V474A (7/30), P413Qfs*4 (23/30)] dimerizasyon üzerindeki olası etkisi test edildiğinde bu mutasyonların etkileşimde belirgin bir değişiklik oluşturmayacağı öngörülmüştür. Bu nedenle *KIT* geninin Ig-benzeri domainlerini kodlayan bölgelerde meydana gelen mutasyonların, sinyal transdüksiyonunu arttırarak onkogenik dönüşümde rol oynadığını önermemekle birlikte, tümör progresyonundaki rolü bakımından değerlendirilmesinin önemini vurgulamaktayız.

KIT mutasyonlarının kanserde sorumlu olduğu primer mekanizma, kinaz aktivitesinin artmasına neden olan mutasyonlardır (17). Çalışmamızda da benzer şekilde patojenik/ olası patojenik varyantların katalitik domaini kodlayan bölgede yoğunlaştığı belirlenmiştir. Bu bölgede belirlenen varyasyonların genin kodladığı proteinin katalitik aktivitesi üzerine etkisi değerlendirildiğinde, olguların yaklaşık %85'inde (25/30) kinaz aktive edici mutasyon belirlenmiştir. Bu nedenle *KIT* geninin artmış kinaz aktivitesinin ve buna yol açan katalitik bölge mutasyonlarının, paranazal sinüs kanserleri için sürücü mekanizmalardan birini oluşturabileceğini önermekteyiz.

Elde edilen bu bulguların, olgularda axitinib, imatinib, pazopanib, sunitinib gibi *KIT* aktivitesini hedefleyen tirozin kinaz inhibitörleri aracılığıyla hedefe yönelik tedavi seçenekleri bakımından değerlendirilmesinin önünü açabileceğini önermekteyiz (18).

3'UTR bölgesinde belirlenen varyantların ise az sayıda olguda miRNA hedef dizisini ortan kaldırma potansiyeli taşıdığından bu mekanizmanın sürücü bir rol oynayabileceğini öngörmekteyiz.

Bu genin p.L71Hfs*3 ve p.D737Efs*24 patojenik çerçeve kayması mutasyonlarının ise sırasıyla sağ kalım ve nüks için biyobelirteç adayları olabileceğini önermekteyiz.

Çalışmamızda mutasyon profili değerlendirilen diğer Sınıf III RTK ailesi üyesi *PDGFRA* genidir. Paranazal sinüs kanserinde *PDGFRA* geninin

mutasyon durumunu değerlendiren tek çalışmada olguların yüzde otuz altısında (4/11) bu genin mutasyon taşıdığı belirlenmiştir (5). Bununla birlikte çalışmamızda değerlendirilen tüm olgularda en az bir *PDGFRA* mutasyonu belirlenmiştir. Belirlenen varyantların yaklaşık %88'i literatürde daha önce tanımlanmamış yeni varyantlardan oluşmaktadır. Özellikle, çalışmamızdaki tüm olgularda ortak şekilde belirlenen ve SRA veri tabanındaki verilerin işlenmesi sonucunda hem tümör hem de tümörün köken aldığı benign lezyonların da tamamında belirlenen c.1701A>G p.P567P ve c.3222T>C p.D1074D varyasyonlarının benign fenotiple eşleştirilebileceği ve bu varyasyonların tümörün erken evrede teşhis edilebilmesi açısından önemli prognostik biyobelirteçler olarak değerlendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Ayrıca olguların tümünde en az bir adet patojenik/ olası patojenik *PDGFRA* mutasyonu tanımlanmış, bu varyantlar genin kodladığı proteinin fonksiyonel özellikleri üzerine olası etkileri bakımından farklı tahminleme araçları kullanılarak değerlendirilmiştir.

Ligand-reseptör etkileşiminde görevli Ig-benzeri domainleri kodlayan dizilerde belirlenen patojenik [p.Q58Sfs*25 (6/30), p.K312Rfs*5 (21/30), p.E316Kfs*22 (16/30)] varyantların dimerizasyonda belirgin değişim oluşturmamakla birlikte PDGFA ligandı ile bağlanmayı arttırabileceği tahmin edilmiştir. Bu etkileşimler sinyal transdüksiyonunun ilk basamağını oluşturduğundan aberasyonları kanser ile ilişkilendirilmiştir (19). Özellikle literatürde ilk defa tanımladığımız ve 21 olguda belirlenen K312Rfs*5 çerçeve kayması mutasyonunun hem dimerizasyonu hem de her iki ligandla bağlanmayı arttırma potansiyeli ile kanser gelişiminde rolü olabileceğini ve hem paranazal sinüs kanserlerinde hem de farklı kanser tiplerinde sinyal iletimindeki rolü bakımından değerlendirilmesinin önemli olduğunu öngörmekteyiz.

Olgularda diğer mutasyon birikimi katalitik domaini kodlayan diziler üzerinde belirlenmiştir. Olguların tümünde bu bölgede en az bir patojenik/ olası patojenik varyant bulunmakla birlikte varyasyonların büyük bölümü olgular arasında ortaklık göstermemektedir. Bu bölgedeki mutasyonların büyük bölümünün çerçeve kayması şeklinde olması nedeniyle katalitik aktivite üzerindeki etkinliği tahminlenememiş olmakla birlikte daha önce farklı kanserler ile ilişkilendirilmiş patojenik yanlış

anamlı [p.R841K (3/30) ve p.D842V (4/30)] varyantların (20) kinaz fonksiyonunu aktive edici olduğu tahmin edilmiştir. Yeni tanımlanan p.D591Efs*3 (12/30) mutasyonunun ATP bağlanma bölgesinin tamamen ortadan kalkmasına neden olacağı tahmin edilmiş, bu durumun katalitik aktiviteyi azaltabileceği öngörüsü ile birlikte diğer açıdan ATP ile yarışan inhibitörlerin etki mekanizmasını ortadan kaldırması yoluyla kötü prognozda rol oynayabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır (21). Genel olarak olgularda belirlenen mutasyonların olgular arasında ortak şekilde görülmemesi ve katalitik aktiviteyi arttırma potansiyelinin düşük olması, belirlenen mutasyonların bu kanser tipi için sürücü rol oynamayabileceğini önermemize neden olmaktadır.

Bu genin p.A663Cfs*26 mutasyonunun ise sağ kalım için biyobelirteç adayı olabileceğini önermekteyiz.

Çalışmada değerlendirilen, sınıf VIII HGFR RTK'larına üye MET protein kinazını (15) kodlayan genin paranazal sinüs kanserlerinde değerlendirildiği tek çalışmada, olguların yüzde yirmisinden fazlasında (4/19) *MET* ifadesi immünohistokimya yöntemi ile gösterilmiş ve lenf nodu tutulumu ile ilişkilendirilmiş (6) olmakla birlikte mutasyon durumu herhangi bir çalışmada değerlendirilmemiştir. Çalışmamızda yirmi olguda *MET* mutasyonu, on iki olguda ise patojenik/ olası patojenik mutasyon belirlenmiştir. Belirlenen mutasyonların neredeyse tamamı (%98,2) literatürde ilk defa tanımlanan varyantları içerdiğinden, paranazal sinüs kanserlerinde sürücü mutasyon olarak rol oynamadığı öngörülmekle birlikte farklı kanser tipleri için bu mutasyonların kritik rol oynama potansiyeli değerlendirilmelidir. Ayrıca olgular arasında farklılık gösteren bu mutasyon profilinin kişiye-özü tedavide yaklaşımları açısından taşıdığı potansiyelin de değerlendirilmesi önemlidir.

RET geni sınıf XIV RTK olan RET kinazını kodlamaktaydı (15). Bu genin paranazal sinüs kanserlerindeki mutasyon profilini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle belirlenen tüm varyasyonlar bu hastalık için özgün bulgulardır. Çalışmada değerlendirilen tüm olgularda en az bir *RET* mutasyonu belirlenmiştir ve bu mutasyonların yaklaşık yüzde seksen yedisi ilk defa tanımlanmıştır. Ayrıca tüm olgularda en az bir adet patojenik/ olası patojenik özellikle *RET* mutasyonu belirlenmiş olması

paranasal sinüs kanserlerinde bu RTK'nın önemli rol oynayabileceğini vurgulamaktadır.

Kinaz bölgesinin amino terminalinde yer alan dizilerde (590.- 702. aminoasitler) meydana gelen mutasyonların genin kodladığı proteinin katalitik aktivitesi üzerindeki etkisi tahmin edilememekle birlikte bu bölgedeki çerçeve kayması mutasyonlarının [E595Dfs*9(7/30), E598Sfs*40(7/30), E598Dfs*6(8/30), F655Sfs*20(2/30) ve N702Tfs*29 (5/30)] 22 olguda kinaz aktivitesi olmayan RET proteininin kodlanmasına neden olacağı öngörülmektedir. Fonksiyon kaybı mutasyonlarının, onkojenik transformasyondan çok konjenital anomalilerle ilişkilendirilmiş (22) olması, bu bölgedeki mutasyonların kanserde sürücü rol oynayabileceğini önermememize neden olmaktadır.

Proteinin katalitik bölgesini kodlayan diziler (762.- 934. aminoasitler) üzerindeki yanlış anlamlı mutasyonların [özellikle p.F776L (25/30)] kinaz aktivitesinin artışına neden olacağı tahmin edilmiştir. Bu ve daha az sayıda olguda ortak olarak belirlenen diğer aktive edici diğer mutasyonların yanında, RTK üzerinde belirlenen mutasyonların genellikle çerçeve kayması şeklinde olması ve proteinin aktif bölge içermeyecek şekilde ifade edilmesine neden olması, fonksiyon kaybına işaret etmektedir. Bu bölgenin fonksiyon kaybı ile ilişkili az sayıda varyantın tanımlanmış olması literatür ile karşılaştırma yapılmasında kısıtlayıcılıklara neden olmaktadır. Bu bölgeye yakın pozisyonda benzer şekilde terminasyona neden olan mutasyon (p.G828Afs*41) adenokarsinomlu olgularda belirlenmiş olmakla birlikte, klinik anlamının üzerinde durulmamıştır (23). *RET* mutasyonlarının, bu kanserdeki rolünün tanımlanabilmesi için özellikle aşağı-akışında yer alan efektör molekülleri ile birlikte değerlendirileceği detaylı çalışmaların yapılması önemli görülmektedir.

Bu genin p.Q626Rfs*12 mutasyonunun ise sağ kalım için biyobelirteç adayı olabileceğini önermekteyiz.

Sınıf XVI LTK ailesine üye RTK'lardan (15) ALK'yi kodlayan genin paranasal sinüs kanserleri ile ilişkilendirildiği herhangi bir moleküler araştırma bulunmadığından, elde edilen bulgular bu kanser tipi için özgünlüğe sahiptir. Çalışmamızda olguların tümünde en az bir *ALK* mutasyonu belirlenmiştir. Olgularda belirlenen varyantların yaklaşık yüzde sekseni literatürde ilk defa tanımlanan varyantlardan oluşmaktadır.

Ayrıca 29 olguda en az bir patojenik/ olası patojenik *ALK* mutasyonu belirlenmiştir. Belirlediğimiz varyantlar arasında daha önce patolojik olarak tanımlanmış tek mutasyonun [p.T1151M (1/30)] katalitik aktivitenin artışına neden olarak nöroblastomda rol oynadığı ve akciğer kanserinde ilaç direnci ile ilişkili olduğu (24,25), olası patojenik varyantların [L1240V(1/30), D1249N(1/30),I1461V (1/30)] ise akciğer ve hepatoselüler kanserlerde rol oynayabileceği önerilmiştir (26,27).

Yeni tanımlanan patojenik/ olası patojenik varyantlardan ekzon 25'te belirlenen p.C1255Afs*3 çerçeve kaymasının (22/30), ATP bağlanma kavitesini oluşturan (R1253, N1254, C1255, L1256) bölgede bulunması ve bu bölgenin *ALK* mutasyonlarında hedefe yönelik ilaç etkileşimi için kullanılan hedeflerden birini (28) oluşturması, bu ve diğer yeni tanımlanan mutasyonların ATP bağlanma dizisini tamamen ortadan kaldıracağı tahminlenmesi, bu gene ait mutasyonların olgularda anormal kinaz aktivitesine yol açma ve ilaç direnci oluşturma potansiyelini ortaya çıkarmaktadır.

Ayrıca ekzon 20'de, katalitik aktiviteye sahip bölgenin öncesinde yer alan p.D1107Gfs*26 duplikasyonunun (20/30) da hastalığın patogenezi açısından önemli rol oynayabileceğini önermekteyiz. Bu bölgenin herhangi bir katalitik aktivitesi bilinmemekle birlikte genin füzyonlarını içeren patojenitelerde füzyonların ekzon 20'nin tümünü içerecek şekilde meydana gelmesi bu bölgenin henüz tanımlanmamış kritik bir işlevi olabileceği (29) görüşünü desteklemektedir.

Katalitik bölgeyi kodlayan bölgede ortak olarak belirlenen ($n \geq 2$) tüm varyasyonların çerçeve kayması şeklinde olması bu bölgenin kinaz aktivitesi üzerine etkisinin tahminlenememesine neden olmakla birlikte olguların neredeyse tamamında bu bölgede patojenik/olası patojenik varyant belirlenmiş olması bu genin paranasal sinüs kanserlerinde önemli rol oynayabileceğini önermemize neden olmaktadır.

Ayrıca *ALK* geninin 15. ekzonunda patojenik/ olası patojenik varyant taşıyan olgularda meydan sağ kalım 9,5 ay olarak belirlendi. Bu ekzonda patojenik/ olası patojenik varyant taşınmasının sağ kalımla ilişkisi anlamlı bulundu ($p= 0,0086$). Bu genin 22. ekzonunda patojenik/ olası patojenik varyant taşınmasının ise metastaz ile ilişkisi ise anlamlı olarak belirlendi ($p=0,011$; Tablo-2).

Bu genin 15. ve 22. ekzonlarında patojenik varyant taşınmasının ise sırasıyla sağ kalım ve metastaz için biyobelirteç adayları olabileceğini önermekteyiz.

SONUÇ

Sonuç olarak paranazal sinüs kanserlerinde genetik bilginin yetersiz olması, tedavi seçeneklerini konvansiyonel yöntemlerle kısıtlamakta, bu da olguların yaşam kalitesini ve sağ kalım oranlarını olumsuz etkilemektedir. Bu çalışmada belirlenen özgün varyantlar ve potansiyel etki mekanizmaları daha detaylı ve fonksiyonel araştırmalarla desteklenerek hedefe

yönelik tedavi seçeneklerinin oluşturulmasında katkı sağlayacaktır.

Finansal destek: Bu çalışma Ege Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje no: TGA-2020-22306).

Etik beyan: Bu çalışma Helsinki Deklarasyonu ve Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'nun 29.04.2020 tarih ve 20-4.2T/24 sayılı onayı doğrultusunda yapılmıştır.

Çıkar çatışması: Herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

1. Rahman QB, Iocca O, Kufra K, Shanti RM. Global Burden of Head and Neck Cancer. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.* 2020; 32(3):367-75. doi: 10.1016/j.coms.2020.04.002.
2. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ (ed). WHO Classification of Head and Neck Tumours WHO/IARC Classification of Tumours, Vol. 9, 4th ed. IARC Press Lyon. 2017.
3. Elgart K, Faden DL. Sinonasal Squamous Cell Carcinoma: Etiology, Pathogenesis, and the Role of Human Papilloma Virus. *Curr Otorhinolaryngol Rep.* 2020; 8(2):111-9. doi: 10.1007/s40136-020-00279-6.
4. Lund VJ, Clarke PM, Swift AC, McGarry GW, Kerawala C, Carnell D. Nose and paranasal sinus tumours: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol.* 2016; 130(S2):111-8. doi: 10.1017/s0022215116000530.
5. Yasukawa S, Kano S, Hatakeyama H, Nakamaru Y, Takagi D, Mizumachi T, Suzuki M, Suzuki T, Nakazono A, Tanaka S, et al. Genetic mutation analysis of the malignant transformation of sinonasal inverted papilloma by targeted amplicon sequencing. *Int J Clin Oncol.* 2018; 23(5):835-43. doi: 10.1007/s10147-018-1296-1. Cited in : PMID: 29779136.
6. Choe JY, Nam SJ, Yun JY, Kim JE. Expression of c-met is different along the location and associated with lymph node metastasis of head and neck carcinoma. *Korean J Pathol.* 2012; 46(6):515-22. doi: 10.4132/KoreanJPathol.2012.46.6.515.
7. Göker Bağca B. Paranazal sinüs karsinogenezinde tedavi hedefi oluşturabilecek genomik profilin belirlenmesi (Doktora tezi). Ege Üniversitesi. 2021.
8. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, Massouras A. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics.* 2019;35(11):1978-80. doi: 10.1093/bioinformatics/bty897.
9. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, Tsimberidou AM, Vnencak-Jones CL, Wolff DJ, Younes A, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J. Mol. Diagnostics.* 2017;19(1):4-23. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.10.002.
10. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015; 17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
11. Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW, Huang WC, Sun TH, Tu SJ, Lee WH, et al. MiRTarBase update 2018: A resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1):296-302. doi: 10.1093/nar/gkx1067.
12. Chauhan JS, Mishra NK, Raghava GPS. Identification of ATP binding residues of a protein from its primary sequence. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:434. doi: 10.1186/1471-2105-10-434.

13. Rodrigues CHM, Ascher DB, Pires DEV. Kinact: A computational approach for predicting activating missense mutations in protein kinases. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):127-32. doi: 10.1093/nar/gky375.
14. Abbasi WA, Yaseen A, Hassan FU, Andleeb S, Minhas FUAA. ISLAND: in-silico proteins binding affinity prediction using sequence information. *BioData Min.* 2020;13(1):20. doi: 10.1186/s13040-020-00231-w.
15. Ségaliny AI, Tellez-Gabriel M, Heymann MF, Heymann D. Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *J. Bone Oncol.* 2015; 4(1):1-12. doi: 10.1016/j.jbo.2015.01.001.
16. Puputti M, Tynninen O, Sihto H, Blom T, Mäenpää H, Isola J, Paetau A, Joensuu H, Nupponen NN. Amplification of KIT, PDGFRA, VEGFR2, and EGFR in gliomas. *Mol Cancer Res.* 2006; 4(12):927-34. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0085.
17. Liang J, Wu YL, Chen BJ, Zhang W, Tanaka Y, Sugiyama H. The C-Kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 2013; 9(5):435-43. doi: 10.7150/ijbs.6087.
18. Ahn R, Ursini-Siegel J. Clinical potential of kinase inhibitors in combination with immune checkpoint inhibitors for the treatment of solid tumors. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(5):2608. doi: 10.3390/ijms22052608.
19. McDermott U, Ames RY, Iafrate AJ, Maheswaran S, Stubbs H, Greninger P, Mccutcheon K, Milano R, Tam A, Lee DY, et al. Ligand-dependent platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)- α activation sensitizes rare lung cancer and sarcoma cells to PDGFR kinase inhibitors. *Cancer Res.* 2009;69(9):3937-46. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4327.
20. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, et al. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 2003; 299(5607):708-10. doi: 10.1126/science.1079666.
21. Hantschel O, Grebien F, Superti-Furga G. The growing arsenal of ATP-competitive and allosteric inhibitors of BCR-ABL. *Cancer Res.* 2012;72(19):4890-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1276.
22. Takahashi M, Kawai K, Asai N. Roles of the RET Proto-oncogene in Cancer and Development. *JMA J.* 2020; 3(3):175-81. doi: 10.31662/jmaj.2020-0021.
23. Yang J, Lin Y, Huang Y, Jin J, Zou S, Zhang X, Li H, Feng T, Chen J, Zuo Z, et al. Genome landscapes of rectal cancer before and after preoperative chemoradiotherapy. *Theranostics.* 2019;9(23): 6856–66. doi: 10.7150/thno.37794.
24. George RE, Sanda T, Hanna M, Fröhling S, Luther W, Zhang J, Ahn Y, Zhou W, London WB, McGrady P, et al. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature.* 2008; 455(7215):975-8. doi: 10.1038/nature07397.
25. Zhu VW, Schrock AB, Bosemani T, Benn BS, Ali SM, Ou SHI. Dramatic response to alectinib in a lung cancer patient with a novel VKORC1L1-ALK fusion and an acquired ALK T1151K mutation. *Lung Cancer Targets Ther.* 2018; 9: 111-6. doi: 10.2147/LCTT.S186804.
26. Mansour H, Ouhajjou A, Bajic VB, Incitti R. Next-Generation Sequencing at High Sequencing Depth as a Tool to Study the Evolution of Metastasis Driven by Genetic Change Events of Lung Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2020; 10: 1215. doi: 10.3389/fonc.2020.01215.
27. Betge J, Kerr G, Miersch T, Leible S, Erdmann G, Galata CL, Zhan T, Gaiser T, Post S, Ebert MP, et al. Amplicon sequencing of colorectal cancer: Variant calling in frozen and formalin-fixed samples. *PLoS One.* 2015; 10(5): e0127146. doi: 10.1371/journal.pone.0127146.
28. Bossi RT, Saccardo MB, Ardini E, Menichincheri M, Rusconi L, Magnaghi P, Orsini P, Avanzi N, Borgia AL, Nesi M, et al. Crystal structures of anaplastic lymphoma kinase in complex with ATP competitive inhibitors. *Biochemistry.* 2010; 49(32):6813-25. doi: 10.1021/bi1005514.
29. Horn L, Pao W. EML4-ALK: Honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(26):4232-5. doi: 10.1200/JCO.2009.23.6661.