

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLOREKTAL KANSER OLUŞUM
MEKANİZMALARINDA VE KARACİĞER METASTAZI
OLUŞUMUNDA ROL OYNAYAN GENLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Duygu Altınok DİNDAR

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2020

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLOREKTAL KANSER OLUŞUM
MEKANİZMALARINDA VE KARACİĞER METASTAZI
OLUŞUMUNDA ROL OYNAYAN GENLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Duygu Altınok DİNDAR

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Doç. Dr. Emel ERGÜL

KOÜ BAP Proje No: 2018/008
MÜ Araştırma Etik Kurulu Protokol No:09.2013.0189

KOCAELİ
2020

KABUL VE ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

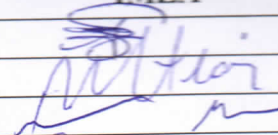
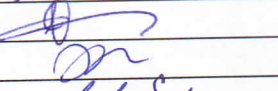
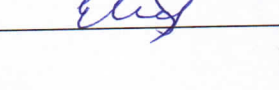


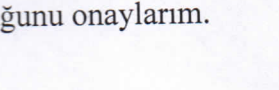
Tez Adı: KOLOREKTAL KANSER OLUŞUM MEKANİZMALARINDA VE KARACİĞER METASTAZI OLUŞUMUNDA ROL OYNAYAN GENLERİN ARAŞTIRILMASI

Tez yazarı: Duygu ALTINOK DİNDAR

Tez savunma tarihi: 03/01/2020

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emel ERGÜL

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN (ÜYE)	Prof. Dr. ALİ SAZCI	
ÜYE	Prof. Dr. Muh. Zafar Utkan	
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Saygı	
ÜYE	Doç. Dr. Neslihan ABACI	
ÜYE	Doç. Dr. Sema AŞKIN KEÇELİ	
DANIŞMAN	Doç. Dr. Emel Ergül	

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.... /.... /2020

Prof. Dr. Sema AŞKIN KEÇELİ
KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür

ÖZET

Kolorektal Kanser Oluşum Mekanizmalarında ve Karaciğer Metastazı Oluşumunda Rol Oynayan Genlerin Araştırılması

Amaç: Amacımız kolorektal kanser primer tümör, tümör mikroçevresi ve metastaz dokularının ayrıntılı genomik özelliklerini tüm ekzom dizileme verisi yoluyla araştırmaktır. Farklı patolojik dokulardaki tüm ekzom dizileme verisi ile hastalığın karsinogenez ve metastaz mekanizmalarında yer alan genomik değişikliklerin anlaşılması hedeflenmiştir.

Yöntem: Aydınlatılmış Onamları alınan kemo/radyo terapi almamış kaaraciğer metastazlı beş farklı kolon kanseri hastasından senkron yapılan kolorektal kanser ve karaciğer metastazektomi ameliyat spesimenlerinden eş zamanlı patolog eşliğinde alınan normal kolon, primer tümör, tümör mikroçevresi ve metastazını içeren 21 doku örneğine yeni nesil dizileme yöntemi ile tüm ekzom analizi yapıldı ve doğal genomik yapı veri seti oluşturuldu. (hastalardan birinde ayrıca bir polip dokusu da mevcuttu.) Dokuların DNA izolasyonları yapıldı ve DNA örnekleri Illumina Hi-Seq yeni nesil dizileme makinesinde dizilendi. Kalite kontrol testleri, 60x ortalama kapsama alanını yüksek kalitede okudu. Oluşturulan FASTQ dosyaları çoklu haritalama ve değişken keşif algoritmalarıyla işlendi ve sonuçlar karşılaştırıldı.

Bulgular: Beş hastadan ikisinde biyopsiden altı ay sonra tümör nüksü vardı. Veri setimizde, TP53, APC, KRAS vb. kolorektal kanser için bilinen sürücü mutasyonlarını gözlemlemenin yanı sıra FAM25C, ZNF704, EEF1A1, MUC2, RGP4 ve APOBR gibi olası yeni sürücü varyantlar belirlendi. Ayrıca Tümör Mutasyon Yüğü (TMB) ve Mikrosatellit İnstabilite (MSI) analizleri yapıldı. Bir hastada yüksek TMB değeri izlendi. Tümör evrimini anlayabilmek adına her hasta için filogenetik ağaçlar yapıldı. Ortak eksonik değişkenler açısından benzerlikler küçük olmasına rağmen, tüm örneklerde metastaz ile mikroçevre arasında primer tümörden daha fazla benzerliğe rastlandı

Sonuç: Araştırmamız primer tümör ve metastazın mikroçevrede meydana gelen varyasyonlardan kaynaklanabileceğini gösteren bulguları desteklemektedir. Sonuçların örnekleme büyük dizileme çalışmaları ile birlikte kullanılmasının, Türkiye'de ve dünyada daha iyi tedavi stratejileri belirlemek üzere kolorektal kanser topluluğunun bu ölümcül hastalığı daha iyi anlamasına yardımcı olacağına inanıyoruz.

Anahtar sözcükler: Kolorektal kanser, ekzom, metastaz, tümör mikroçevresi

SUMMARY

Investigation of Genes in Colorectal Cancer Formation Mechanisms and Liver Metastasis

Objective: The aim of the study was to investigate the detailed genomic properties of colorectal cancer by sequencing primary tumor, tumor microenvironment and metastasis tissues using next generation sequencing method in order to understand the role of genomic changes in the mechanism of carcinogenesis and metastasis in different pathological tissues of colon cancer patients

Method: The study group consists of 5 metastatic colon cancer patients which did not undergo chemo/radio therapy. The informed consent was signed by all patients. The tissues were taken from normal colon, primary tumor, tumor microenvironment and metastatic part in the liver of patients under pathologist assistance. The DNA was isolated from 21 tissue samples including polyp tissue from one of the patients by conventional DNA isolation methods. The whole exome analysis was performed using next generation method on Illumina Hi-seq platform. Quality control tests read 60x average coverage at high quality. The generated FASTQ files were processed with multiple mapping and variable discovery algorithms and the results were compared.

Results: Two of five patients had tumor recurrence six months after biopsy. In our data set, in addition to observing known driver mutations such as TP53, APC, KRAS etc for colorectal cancer, possible novel driver variants as FAM25C, ZNF704, EEF1A1, MUC2, RGD4 and APOBR were identified. In addition, Tumor Mutation Load (TMB) and Microsatellite Instability (MSI) analyzes were performed. One patient had high TMB. Phylogenetic trees were constructed for each patient in order to evaluate the tumor status. Although similarities in terms of common exonic variables were small, more similarities were found between metastasis and microenvironment than primary tumor in all samples.

Conclusions. Our study supports the idea that primary tumor and metastasis may be caused by variations in microenvironment. The data of our study may help to find new treatment strategies for metastatic colon cancer in Turkey as well as worldwide.

Key Words: Colorectal cancer, exon, metastasis, tumor microenvironment

TEŞEKKÜR

Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenen tez çalışmamın ve tüm doktora eğitim sürecimin gerçekleşmesinde emeği olan başta danışmanım, hocam Doç. Dr. Emel Ergül olmak üzere, tez izleme kurulunda yer alan ve desteklerini tıp fakültesinde öğrencileri olduğum günden bu yana hiçbir zaman esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Nihat Zafer Utkan ve Prof. Dr. Ali Sazcı'ya ;

Doktora eğitimi sürecinde desteklerini esirgemeyen Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof Dr. Murat Kasap, öğretim üyeleri Prof.Dr.Mehmet Doğan Gülkaç, Doç.Dr.Gürler Akpınar, Dr.Öğr.Üyesi Aylin Kanlı, araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Nihal Üren ve Tuğcan Koruk'a ; Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü yönetici ve çalışanlarına en derin saygılarımı sunar teşekkür ederim.

Tüm zorluklara rağmen her koşulda benimle olan ve beni destekleyen aileme çok teşekkür ederim.

01/01/2020

Duygu ALTINOK DİNDAR

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

01/01/2020

Duygu ALTINOK DİNDAR

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZET	iii
SUMMARY.....	iii
TEŞEKKÜR	v
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÇİZİMLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. KANSER ve METASTAZ OLUŞUMUNDAKİ MOLEKÜLER MEKANİZMALAR ROL OYNAYAN GENLER VE PATOFİZYOLOJİK SONUÇLARI	2
1.1.1 DNA, Gen ve Mutasyon	4
1.1.2 Çift Vuruş Hipotezi	8
1.1.3 Kanserin HücreSEL Özellikleri	9
1.2. YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİSİ: GENOMİK VERİ OLUŞTURMADA KULLANILAN YÜKSEK VERİMLİ YÖNTEM	17
1.3. KOLOREKTAL KANSER ve KOLOREKTAL KANSER KARACİĞER METASTAZI OLUŞUMUNDAKİ MOLEKÜLER MEKANİZMALAR, ROL OYNAYAN GENLER VE PATOFİZYOLOJİK ETKİLERİ.....	22
1.3.1 Kolorektal kanser paradigması	25
1.4. KOLOREKTAL KANSERLERDE KARACİĞER METASTAZI:.....	30
1.4.1 Adezyon Molekülleri:.....	32
1.4.2 Hareket ve İnvazyon.....	33
1.4.3 Ekstraselüler Matriksin Bozulması.....	34
1.4.4 Matris Bozucu Metalloproteinazlar (MMP)	34

1.4.5	Plazminojen / Fibrinaz Sistemi.....	34
1.4.6	Tümör Damarının Oluşumu.....	34
1.5.	KOLOREKTAL KANSERDE KLİNİK GENETİK SINIFLAMA	35
2.	AMAÇ	37
3.	YÖNTEM:	37
3.1	Kolorektal Kanser Doku Toplanması ve –80 ‘C de saklanması:.....	37
3.2	Taze Donmuş Dokulardan DNA İzolasyonu Yapılması:	38
3.3	Yeni Nesil Dizileme Adaptörlü Kütüphane hazırlığı:	38
3.4	Biyoinformatik Çalışma Süreci	39
4.	BULGULAR	41
4.1	GERMLİNE VARYASYONLAR	43
4.2	SOMATİK VARYASYONLAR:.....	78
4.3.	SÜRÜCÜ GENLER ve FİLOGENETİK AĞAÇ MODELLEME.....	80
4.3.1	Filogenetik Ağaç Modelleme	82
4.4	SOMATİK VERİ KOPYA SAYISI DEĞİŞİMLERİ, TÜMÖR SÜPRESÖR, PROTOONKOGEN ,UYGUNSUZ DNA ONARIM GENLERİ ve SEÇİLEN PATOJEN VARYASYONLAR	91
5.	TARTIŞMA.....	134
6.	SONUÇ:.....	153
7.	KISITLILIKLAR.....	154
	KAYNAK DİZİNİ.....	155
	ÖZGEÇMİŞ.....	161

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- aa : Amino Asit
ATP : Adenin Trifosfat
BM : Bazal Membran
DNA : Deoksiribonükleik Asit
ECM : Ekstraselüler Matris
EMT : Epitelyal- Mezenşimal Transformasyon
FAP : Familial Adenomatöz Polipozis
FDG : Florodeoksiglikoz
GIS : Gastrointestinal Sistem
GTP : Guanin Trifosfat
GTP az : Guanin Trifosfataz
HDL : Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HGF : Hepatik Büyüme Faktörü
IL : İnterlökin
KRK : Kolorektal Kanser
LDL : Düşük Dansiteli Lipoprotein
MMR : Uygunsuz Onarım
MSI : Mikrosatellit İnstabilite
ncRNA : Kodlamayan Ribonükleik asit
NK : Doğal Katil Lenfosit Hücresi
PDL : Programlanmış Ölüm Ligandı
PZR : Polimerize Zincir Reaksiyonu
RNA : Ribonükleik Asit
SNP : Tek Nükleotid Polimorfizmi
SNV : Tek Nükleotid Varyasyonu
TGF : Transforme Eden Büyüme Faktörü
TNF α : Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNM : Tümör-Lenfnodu-Metastaz
Tpa : Doku Plazminojen Aktivatörü
UV : Ultraviole
VLDL : Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
YND : Yeni Nesil Dizileme

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1 Kanserin Hücresel Özellikleri Ve Terapötik Yanıtları (Hanahan Ve Weinberg,2011'den Alınmıştır.).....	17
Çizim 1.2 Kolon Histolojisi (Human Histology Atlas'dan Alınmıştır.).....	23
Çizim 1.3 Kolon Kriptinde Kök Hücre Artışı Ve Hücre Ölümü: Kolorektal Epitelin Kript Olarak Bilinen Yapısal Komponentinin İnvajinasyon Görüntüsü. Bu Resim Hücre Sayısının Artması Ya Da Hücre Ölümünün Azalması Durumunda Hiperselüleritenin Artıp ,Doku Organizasyonun Bozulması Dolayısıyla İntestinal Epitelin Fonksiyonel Ve Anatomik Zarar Görmesi Anlamına Gelmektedir.(Çizim Genetic Basis Of Cancer'dan Alınmıştır.)	24
Çizim 1.4 Kolorektal Kanser İmmunohistokimyasal Boyama Altında (Human Pathology Atlas'dan Alınmıştır.).....	26
Çizim 1.5 Kolon Kanseri Sinyal Yolakları Ve Metastaz Mekanizması.....	29
Çizim 3.1 DNA İzolasyonu Sonrası DNA Kalite Analizleri; %1 Agaroz Jel.....	38
Çizim 3.2 Illumina Hi-Seq Dizileme Cihazı	39
Çizim 4.1 Farklı Dokulardaki Belirgin Sürücü Varyantları Gösteren Isı Haritası.....	81
Çizim 4.2 Tüm Dokuları Değerlendiren Varyasyon Benzerlik Matrisi	82
Çizim 4.3: Birinci Hasta Filogenetik Ağaç, Ortak Sürücü Mutasyonlar	84
Çizim 4.4 İkinci Hasta Filogenetik Ağaç, Ortak Sürücü Mutasyonlar	86
Çizim 4.5 Üçüncü Hasta Filogenetik Ağaç, Ortak Sürücü Mutasyonlar	88
Çizim 4.6 Dördüncü Hasta Filogenetik Ağaç, Ortak Sürücü Mutasyonlar.....	90
Çizim 4.7 Beşinci Hasta Filogenetik Ağaç, Ortak Sürücü Mutasyonlar.....	91
Çizim 4.8 Birinci Hasta Tüm Doku Örneklerinde İzlenen Kromozomal Kopya Sayısı Değişimleri	93
Çizim 4.9. Birinci Hasta Somatik Veri Doku Örneklerinde Ayrı Ayrı İzlenen Kromozomal Kopya Sayısı Değişimleri.....	93
Çizim 4.10 İkinci Hastanın Tüm Doku Örneklerinde İzlenen Kromozomal Kopya Sayısı Değişimleri	101
Çizim 4.11. İkinci Hasta Somatik Veri Doku Örneklerinde Ayrı Ayrı İzlenen Kromozomal Kopya Sayısı Değişimleri.....	101
Çizim 4.12 Üçüncü Hastanın Tüm Doku Örneklerinde İzlenen Kromozomal Kopya Sayısı Değişimleri	108

Çizim 4.13. Üçüncü Hasta Somatik Veri Doku Örneklerinde Ayrı Ayrı İzlenen Kromozomal Kopya Sayısı Değişimleri.....	109
Çizim 4.14 Dördüncü hastanın tüm doku örneklerinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri	115
Çizim 4.15. Dördüncü Hasta Somatik Veri Doku Örneklerinde Ayrı Ayrı İzlenen Kromozomal Kopya Sayısı Değişimleri.....	116
Çizim 4.16 Beşinci Hastanın Tüm Doku Örneklerinde İzlenen Kromozomal Kopya Sayısı Değişimleri	129
Çizim 4.17. Beşinci Hasta Somatik Veri Doku Örneklerinde Ayrı Ayrı İzlenen Kromozomal Kopya Sayısı Değişimleri.....	129
Çizim 5.1. İmmunohistokimyasal yöntem ile ZNF704 proteinin İnsan ince barsak goblet hücrelerinde güçlü stoplazmik pozitiflik görüntüsü(The Human Protein Atlas)	141
Çizim 5.2 İmmuno histokimyasal yöntem ile EEF1A1 proteinin ekspresyonunun hepatoselüler kanser hücrelerinde güçlü pozitiflik görüntüsü (The Human Protein Atlas)	145

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Hastaların Demografik Verileri.....	42
Çizelge 4.2 Hastaların Hastalık Süreci Bilgileri	42
Çizelge 4.3 Örneklerin Ortalama Kapsam Bilgileri	43
Çizelge 4.4 Germline Nadir İzlenen Ortak Ekzonik Varyasyonlar.....	44
Çizelge 4.5.a,b Birinci Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyant Çeşitleri.....	44
Çizelge 4.6.a,b Birinci Hasta Germline Protoonkogen Varyant Çeşitleri	47
Çizelge 4.7.a,b Birinci Hasta Germline Uygunsuz DNA Onarım Genleri Varyant Çeşitleri	48
Çizelge 4.8.a,b İkinci Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyant Çeşitleri.....	50
Çizelge 4.9.a,b İkinci Hasta Germline Protoonkogen Varyant Çeşitleri	53
Çizelge 4.10.a,b İkinci Hasta Germline Uygunsuz DNA Onarım Genleri Varyant Çeşitleri	54
Çizelge 4.11.a,b Üçüncü Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyant Çeşitleri.....	57
Çizelge 4.12.a,b Üçüncü Hasta Germline Protoonkogen Varyant Çeşitleri.....	61
Çizelge 4.13.a,b Üçüncü Hasta Germline Uygunsuz DNA Onarım Genleri Varyant Çeşitleri.....	63
Çizelge 4.14.a,b Dördüncü Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyant Çeşitleri	65
Çizelge 4.15.a,b Dördüncü Hasta Germline Protoonkogen Varyant Çeşitleri	68
Çizelge 4.16.a,b Dördüncü Hasta Germline Uygunsuz DNA Onarım Genleri Varyant Çeşitleri.....	69
Çizelge 4.17.a,b Beşinci Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyant Çeşitleri	71
Çizelge 4.18.a,b Beşinci Hasta Germline Protoonkogen Varyant Çeşitleri	74
Çizelge 4.19.a,b Beşinci Hasta Germline Uygunsuz DNA Onarım Genleri Varyant Çeşitleri.....	76
Çizelge 4.20 Tüm Somatik Varyasyonlar	78
Çizelge 4.21 Farklı hastalarda ve farklı doku örneklerinde ortak olarak izlenen somatik varyasyonlar.....	79
Çizelge 4.22 Karaciğer Metastaz Dokularında ortak izlenen varyasyonlar	80
Çizelge 4.23 Birinci Hastanın Farklı Dokularında Tespit Edilen Kanser İçin Doğrulanmış Bulunan Sürücü Mutasyonlar	83
Çizelge 4.24 1. Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi.....	84

Çizelge 4.25 İkinci Hastanın Farklı Dokularında Tespit Edilen Kanser İçin Doğrulanmış Bulunan Sürücü Mutasyonlar	85
Çizelge 4.26 İkinci Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi	86
Çizelge 4.27 Üçüncü Hastanın Farklı Dokularında Tespit Edilen Kanser İçin Doğrulanmış Bulunan Sürücü Mutasyonlar	86
Çizelge 4.28 3. Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi.....	87
Çizelge 4.29 Dördüncü Hastanın Farklı Dokularında Tespit Edilen Kanser İçin Doğrulanmış Bulunan Sürücü Mutasyonlar	88
Çizelge 4.30 4. Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi.....	89
Çizelge 4.31 Beşinci Hastanın Farklı Dokularında Tespit Edilen Kanser İçin Doğrulanmış Bulunan Sürücü Mutasyonlar	90
Çizelge 4.32 Beşinci Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi.....	91
Çizelge 4.33 Kanser ilişkili olabilme prediksyonu yüksek driver genler	91
Çizelge 4.34 Birinci hasta mikroçevre dokusu ekzom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar	95
Çizelge 4.35 Birinci hasta polip dokusu ekzom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar.....	96
Çizelge 4.36 Birinci hasta primer tümör dokusu ekzom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar	96
Çizelge 4.37 Birinci hasta metastaz dokusu ekzom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar.....	97
Çizelge 4.38.a,b Birinci Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Genlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar.....	98
Çizelge 4.39.a,b Birinci Hasta Somatik Verisinde Protoonkogenlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar.....	99
Çizelge 4.40.a,b Birinci Hasta Somatik Verisinde Uygunsuz DNA Onarım Genlerinde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar	100
Çizelge 4.41 İkinci hasta mikroçevre dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar	103
Çizelge 4.42 İkinci hasta primer tümör dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar	103
Çizelge 4.43 İkinci hasta metastaz dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar	104
Çizelge 4.44.a,b İkinci Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Genlerde tespit edilen	

varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar.....	105
Çizelge 4.45.a,b İkinci Hasta Somatik Verisinde Protoonkogenlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar.....	107
Çizelge 4.46.a,b İkinci Hasta Somatik Verisinde Uygunsuz DNA Onarım Genlerinde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar	107
Çizelge 4.47 Üçüncü hasta mikroçevre dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar	110
Çizelge 4.48 Üçüncü hasta primer tümör dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar	111
Çizelge 4.49 Üçüncü hasta metastaz dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar	112
Çizelge 4.50.a,b Üçüncü Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Genlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar.....	113
Çizelge 4.51.a,b Üçüncü Hasta Somatik Verisinde Protoonkogenlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar.....	114
Çizelge 4.52.a,b Üçüncü Hasta Somatik Verisinde Uygunsuz DNA Onarım Genlerinde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar	114
Çizelge 4.53 Dördüncü hasta mikroçevre dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar	117
Çizelge 4.54 Dördüncü hasta primer tümör dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar	119
Çizelge 4.55 Dördüncü hasta metastaz dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar	121
Çizelge 4.56.a,b Dördüncü Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Genlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar.....	124
Çizelge 4.57.a,b Dördüncü Hasta Somatik Verisinde Protoonkogenlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar.....	126
Çizelge 4.58.a,b Dördüncü Hasta Somatik Verisinde Uygunsuz DNA Onarım Genlerinde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar	127
Çizelge 4.59 Beşinci hasta mikroçevre dokusu ekzom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar	131
Çizelge 4.60 Beşinci hasta primer tümör dokusu ekzom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar	131
Çizelge 4.61 Beşinci hasta metastaz dokusu ekzom verisinde patojen olan ya da patojenite	

skoru yüksek bulunan varyantlar	131
Çizelge 4.62.a,b Beşinci Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Genlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar.....	132
Çizelge 4.63.a,b Beşinci Hasta Somatik Verisinde Protoonkogenlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar.....	133
Çizelge 4.64.a,b Beşinci Hasta Somatik Verisinde Uygunsuz DNA Onarım Genlerinde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular, varyasyonlar	133



KOLOREKTAL KANSER OLUŞUM MEKANİZMALARINDA VE KARACİĞER METASTAZI OLUŞUMUNDA ROL OYNAYAN GENLERİN ARAŞTIRILMASI

1. GİRİŞ

Kanser bilinen en ölümcül hastalıklardan biridir. Dünyada 2018 yılı verilerine göre, 18.078.957 hastaya yeni kanser olgusu tanısı koyulmuş, 9.555.027 hasta kanser nedeniyle yaşamını yitirmiş ve 43.841.302 hasta kanser tanısı ile yaşamını sürdürmektedir. 2018 yılında kolorektal kanser tanısı alan hasta sayısı 1.849.518 dir. Kolorektal kanser tüm kanserlerin %10.2 si gibi bir oranla dünyada kadın ve erkeklerde sıklık açısından üçüncü sırada yer alan kanser hastalığıdır. 2018 yılında kolorektal kanser nedeni ölüm sayısı 880792 olarak kanser ölümlerinin %9,2 si olarak raporlanmıştır. Küresel kanser yükünün 2025 yılında 20 milyondan daha fazla yeni olgu ile gerçekleşeceği tahmin edilmektedir. Özellikle kolorektal kanser insidansında iki kata ulaşan artış beklenmektedir. (Bray ve diğ 2018).

Kanser hastalığı ve özellikle kolorektal kanser için artan riskler göz önüne alındığında, hastalıktan korunmak, hastalığı önleyici tedbirler almak gerekliliği birincil hedef olmalıdır. Bunu sağlayabilmek için öncesinde hastalığı tanımak ve erken tanı koyabilmek ve süreci doğru yönetebilmek adına uygun tedaviyi planlayabilmek gerekir. Doğru tedavi seçimi hastalığın biyolojisini bilmekle sağlanabilir. Günümüzde tanı ve tedavideki zorlukların başında mevcut patofizyolojide temelde yer alan moleküler biyolojiye dair bilinmeyenler yer almaktadır. Mevcut, klasik tanı ve tedavi yöntemlerinde kullanılmak üzere hastalığın moleküler biyolojisine dair araştırmalar son 30 yılda başlamış ve hastalıktan ziyade hastaya özel nedenlerin varlığına dair ciddi bulguları ortaya çıkarmıştır. (Ponder 2001). Bu araştırmaların sonucunda kanser sürecinin her bireyde farklı seyrettiği ve bunun temelde bireye özgü biyolojik değerlendirmesinin yapılması gerekliliği gösterilmiştir. Yeni nesil dizileme teknolojileri, hastaya özel moleküler varyasyonların hızlı ve doğru biçimde tespit edilmesini sağlamıştır. Bu durum kanser genomik araştırma alanında devrim niteliğinde bir fikrin, kişiselleştirilmiş tedavi fikrinin doğmasını sağlamıştır. Bu alanda tüm genom dizileme, tüm eksom dizileme, ekspresyon analizleri, metilasyon profili belirleme ve daha az gen içeren hedef sıcak noktaları tespit etme şeklinde farklı yöntemler mevcuttur. (Chin ve diğ 2011).

Kansere bağlı mutasyonların yaklaşık % 85'inin protein kodlayan bölgelerde yer aldığı ve eksom diziliminin kanser dokularında mutasyon keşfi için kullanışlı bir teknik

olduğu, tüm genom dizilemeye göre biyoinformatik açıdan daha anlaşılır ve maliyet açısından ise ucuz olması tüm eksom dizileme yönteminin kanser araştırmalarında genel kabul görmesini sağlamıştır (Bick ve Dimmock 2011). Böylece eksom dizileme kullanılarak farklı kanser türlerinin mutasyon profilleri üzerine çalışmalar yapılmıştır. (Kamps ve diğ 2017)

Biz de çalışmamızda metastatik kolorektal tümörlerin genomik profilini incelemek üzere germline ve somatik mutasyonlarını araştırmayı amaçlayan bir ekzom dizileme analizi yaptık. 2013-2014 yılları arasında karaciğer metastatik kolorektal kanser hastalarından neoadjuvan kemoterapi radyoterapi almamış beş farklı hastanın ameliyat ile çıkartılan spesimeninden eş zamanlı alınmış normal kolon dokusu, kolorektal kanser tanılı tümör dokusu, kolon tümör mikroçevresi ve karaciğer metastaz dokusu mutasyon analizleri ile aynı hastaların farklı doku örneklerindeki benzerlik ve özgünlükleri araştırıp, hastalığın patofizyolojik sürecine moleküler bir bakış açısı ile yaklaştık. Hastaların 5 yıllık takip ve tedaviye yanıtlarının yanında , nüks ve rekküren hastalık durumlarının bir bütün halinde klinik ve genomik değerlendirmeleri yapılmaya çalışıldı. Hedefimiz hem kolorektal kanserlerin hem de karaciğer metastazlarının ekzomik yapısını aynı hastaların kanser mikroçevrelerinin genomik yapısı ile birlikte araştırmak; benzerlikler, farklılıklar, sürücü mutasyonlar ve kanser yolakları üzerinden kapsamlı bir moleküler patofizyolojik araştırma yapmaktır.

Araştırmamızın gerekçesi olarak tanımlanacak nihai hedef histopatolojik değerlendirmeye göre aynı patolojik evredeki farklı kanser hastalarının sahip olduğu genomik farklılıkların tespit edilebilmesi, hastalığın tedavi sürecini ve tedavi sonrası hastalıksız sağkalım süresi ile nükslerinin üzerindeki etki derecesinin tespitidir. Bu nedenle çalışmamız bu konuda bilinen ve yeni bulunabilecek gen değişikliklerinin ve etki mekanizmalarını hastaların doku örneklerindeki mevcudiyetleri üzerinden tartışmak ve hastaların tedavi ve tedaviye yanıt ile takip süreçleri açısından yeni bir bakış açısı geliştirebilmek üzerine planlanmıştır.

1.1. KANSER ve METASTAZ OLUşUMUNDAKİ MOLEKÜLER

MEKANİZMALAR ROL OYNAYAN GENLER VE PATOFİZYOLOJİK

SONUÇLARI

Ökaryot canlılar karmaşık organizasyona sahip canlılardır. İnsanlar başta olmak üzere tüm ökaryot canlılarda organizmanın hayatta kalmasını sağlayan sistemlerin koordinasyonu şarttır. (Dodson 1971). Örneğin sindirim sisteminin en iyi şeklide çalışabilmesi için diğer

sistemler ve çevre faktörleri arasındaki ilişkilerin uyum içinde olması gerekir. Bu uyumun izlenebileceği temel yapı taşı olan hücrelerin doğru yerde ve doğru zamanda çoğalması, farklılaşması ve böylece normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi gerekir. (van Waes ve diğ 1995). Bölünerek çoğalan ve benzer şekilde farklılaşarak fonksiyon kazanan hücreler bir araya gelerek dokuları oluşturur. Bu hücreler diğer dokuları oluşturan farklı fonksiyonlara sahip hücrelerle bir araya gelebilme yetenekleri sayesinde organları oluştururlar. Bu denklemin ifade ettiği aslında her organın farklı fonksiyonlara sahip ancak bir arada senkronize çalışabilen dokulardan oluştuğudur.

Bir organın hastalığı da bu doku ve hücre temelinde düşünüldüğünde senkronizasyonun bozulması anlamına gelir. Organizmanın senkronizasyonu bozma potansiyeli olan her bir durumu düzeltme veya onarma yeteneği de vardır. Ancak bu yetenek de ayrı sistemlerin ve hücrelerin senkronizasyonu ile mümkündür. Büyük resim düşünüldüğünde insan bedeninin herhangi bir organında meydana gelen bir hastalığın tek başına bir nedeni olmadığı, senkronizasyonu bozan multiple faktörlü bir vaka ile karşılaşıldığı aşikardır.

Bu organizasyonun korunması için temel bileşen hücrenin sağlığıdır. Hücre sağlığının sürdürülmesinde genetik materyalinin yanında hücre-hücre, hücre-çevre doku iletişimleriyle çevresel faktörlerin çeşitliliği büyük önem taşır. (Egeblad ve diğ 2010). Yaşlanan ya da gereksinimden fazla oluşan ya da genomunda istenmeyen varyasyonlar oluşan hücreler programlı hücre ölümü, apoptozis ile ortadan kaldırılır. Hücrede 'bölünme, farklılaşma ve apoptozis' olarak bilinen üçlü organların anatomik ve fonksiyonel sağlıklı yaşam düzenini sağlar. Bu düzenin sağlanması organizmanın kendisinden yada dışardan gelen uyaranların etkisi ile oluşan sinyal aktarım sistemlerinin aktivasyonu veya inhibisyonunun kontrolü altındadır. (Carson and Ribeiro 1993). Oldukça kompleks olan bu sistemlerin nasıl çalıştığının bilinmesi, hastalıkların önlenmesi, tanısı ve tedavisi aşamalarında yol göstericidir. Temel moleküler biyolojinin bu alanda anlaşılması doğru tıbbi pratiklerin gelişebilmesinin ilk şartıdır.

Kanser kelime anlamıyla Latince yengeçten gelir. Kısaçaları olan ve sıkı sıkıya tutan bir hastalıktır. (Franks ve Knowles 2005) Patofizyolojide aslında karsinom kelimesi epitelyum kökenli, sarkom kelimesi ise stroma kökenli, kontrolsüz çoğalan, durdurulamayan, normal morfoloji ve fonksiyonlarını ve hatta genomunu değiştirmiş invazyon yeteneğine sahip malign hücreleri temsil eder. (Rosai 2011) Yaygın kullanımda karsinom ve sarkomlar köken aldığı dokudan bağımsız 'kanser' kelimesi ile anılır. Kanserin temel moleküler biyolojisini anlamak için üç kavram ile başlamak gerekir. Bunlardan ilki DNA, diğeri gen,

bir diğeri ise mutasyon ifadesidir.

1.1.1 DNA, Gen ve Mutasyon

DNA birçok hücrenin çekirdeğinde yer alan vücuttaki tüm süreçlerin kontrolünden sorumlu moleküldür. DNA birbirine bağlanan deoksiribonükleik asit zincir oluşumunu sağlayan bazlardan meydana gelir. Hücre bölündüğünde her zaman replike edilerek yeni hücrelere aktarılır. Gen DNA'nın fonksiyonel ürününün yani proteinlerin ya da translasyon yapmayan RNA'ların kodlandığı alanını kapsar. İnsan genomunda yaklaşık 25000 gen bulunur.

DNA hücre içinde çekirdekte kromozomların içinde paketlenmiş biçimde bulunur. Bu sayede çok küçük bir alanda dağılmadan korunur ve çoğalabilir. İnsanda her kromozomdan 2 tane olmak üzere 22 çift somatik, bir çift de sex kromozomu bulunur, bu nedenle insan diploiddir. Her genin biri anneden biri babadan olmak üzere iki kopyası vardır. DNA daki bilgi moleküler biyolojinin santral dogması olarak bilinen haliyle RNA'ya oradan da proteine dönüşür. Bu haliyle her organizma kendi fenotipini oluşturur.

Hücreler bölünürken DNA'sını replike eder ve oğul hücrelerine aktarır. DNA hücre bölünmesi süreci dışında her zaman çekirdektedir. Bu nedenle hata oranı azdır. RNA ,DNA transkripsiyonu sonucu oluşarak hücre çekirdeği dışına stoplazmaya verilir. Stoplazmada RNA kodu proteine çevrilir ve translasyon gerçekleşir. Proteinler hücrenin yapısını oluşturan,sinyal sistemleri ile hücrenin içerde ve dışarda iletişimini, farklı reaksiyonlarla hücrenin metabolizmasını sağlarlar. (Thompson ve Thompson, Genetics in Medicine 2015)

Farklı hücrelerde aynı DNA bulunmasına rağmen farklı işler yapılmasını sağlayan Epigenetik denetim kontrolünün işlevi her hücrenin kendi ihtiyacına uygun gen transkripsiyonu yapıyor olmasıdır. Hücrede epigenetik kontrol; metilasyon, ncRNA'ler ve histon modifikasyonları ile yapılır. (Kim ve diğ 2009). İnsan genomunun yaklaşık %99.5 i diğer insanlarla aynıdır. Geriye kalan %0.5 popülasyondaki bireysel farklılıkları, bireyleri ayırdetmeyi sağlayan varyasyonları içerir. Bu varyasyonlar genelde belirli lokasyonlardaki birkaç baz değişikliğini içerir ve toplumda %1 ve üzeri bir sıklıkta karşımıza çıktığında polimorfizm yada SNP (single nükleotid polimorfizm) adını alır ve genomun özgünlüğünü belirler. Aynı şekilde allellerin paternal ve maternal iki kopyadan oluşması ve birbirinden farklı olabilmesi genetik çeşitlilik sağlar. (Rutherford 2000). Kalıtılan fonksiyonel ünitelerin, genlerin, kromozom üzerindeki lokasyonuna 'Lokus' denir. Bir gen lokusu ortalama 5x10.000 bp (baz çifti) alanı kapsar. Açık okuma alanları, (okuma çerçevesi) (ORF) ekzomlarda yer alan, bir proteini tanımlayan aminoasitleri kodlayan kodonların bütünüdür.

DNA transkripsiyonu sırasında intronlar uzaklaştırılır ve ekzomlar RNA yı oluşturmak üzere birleştirilir (splicing). Sürecin devamında transkriptin 5'ucu şapkalınır; 3' ucuna poliadenilasyon yapılır ve matür RNA oluşturulur. Okuma çerçevelerindeki mutasyonlar; amino asit (aa) dizilimini etkileyerek protein sentezinde bir sonuç meydana getirebilir. Egzomdaki mutasyon genin fonksiyonunu ve proteinin yapısını değiştirebilir.

Splicing nedeniyle intronlar mRNA transkripsiyon sürecinde yer almadıkları için protein ekspresyonunu etkilemedikleri düşünülür, ancak bu bilgi ispatlanmamıştır. Nadir durumlarda intronlardaki mutasyonların kriptik birleşme yerlerini harekete geçirip, daha sonra anormal RNA türlerinin üretimine yol açan yeni birleşme yerleri oluşturdukları bilinmektedir. (Sun ve diğ 2000).

Birçok aa, eş anlamlı olan birkaç kodon tarafından kodlanabilir. Örneğin Lösin 6 farklı DNA üçlüsü kodon, tarafından kodlanır. Bir mutasyon sonucu lösini kodlayan kodonların kendi aralarındaki değişimleri proteinin yapısı ve işlevi üzerinde hiçbir etkiye sahip değildir. Bu mutasyonlar, **sessiz** veya **sinonim** mutasyonlar olarak adlandırılır. Hastalık riski açısından en zararsız mutasyonlardır. Bir kodon değişikliğine yol açan bp değişikliği örneğin CTT—ATT değişikliğinde ilk kodon Lösini kodlarken ikinci kodonun izolösini kodlaması durumunda bir baz değişikliği bir aa değişikliği anlamına gelebilir. Bu tip aa değişikliğine yol açan mutasyonlara **yanlış anlamlı (missense) veya nonsinonim** mutasyon denir.

Bir diğer mutasyon türü olan **anlamsız, (nonsense veya stopgain)** mutasyonlarda ise bir baz çifti değişikliği bir kodonu sonlandırma kodonlarından birine (TAG, TAA, TGA) çevirebilir. Bu tip mutasyonlara (**truncated**) **kesik** mutasyon da denir. Bu mutasyonlar okuma çerçevelerinin sonlanmasına neden olur. Ayrıca bir baz çifti değişikliği ile stop kodonunun değişmesi ile **stoploss** mutasyonlar da oluşabilir.

Yanlış anlamlı veya nonsinonim mutasyonlar çok geniş bir alanda fenotipik değişikliklere sebep olabilir. Birbirine yapısal ve kimyasal olarak benzeyen iki aa belki proteini değiştirmez ve fenotipe yansıyacak bir değişiklik oluşturmaz ancak bir asidik aa in yerini hidrofobik bir aa in alması durumunda ciddi fenotipik değişiklikler hatta orak hücre anemisinde olduğu gibi hastalıklar ortaya çıkar. Bir proteinin birincil yapısı aa dizilimini ifade eder. İkincil yapısı komşu aa'ler arası etkileşimi, üçüncül yapısı üç boyutlu konfigürasyonu için uzak aa'ler arası etkileşimi, dördüncül yapısı ise çoklu protein komplekslerinin alt birimleri arasındaki etkileşimi ifade eder. Tüm nonsinonim mutasyonlar proteinlerin birincil yapılarını değiştirir ve bazen daha yüksek protein yapısında da değişikliklere sebep olabilir (Strachan ve Read 2019)

Açık bir okuma çerçevesinde oluşacak silinme(delesyon) veya eklenmeler (inersiyon)

3 ün katı olmayan bir baz çifti sayısını içeriyorsa bu değişiklik okuma çerçevesinde bir kayma ile sonuçlanacaktır. Bu tip mutasyonlar çerçeve kayması (frameshift) olarak adlandırılır ve mutasyonun konumundan 3' yönünde, (translasyon yönü, aşağı yönde: downstream) tamamen farklı bir aa serisini kodlayan yeni bir kod seti oluşmasına sebep olurlar. Dolayısıyla küçük delesyon veya insersiyonlar çerçeve kayması mutasyonlar oluşturarak hem aa'leri değiştirerek farklı bir protein kodlayan bir kodlama dizisi hem de erken durdurma kodonlarını oluşturarak olmaması gerek yerde kesilmiş, durdurulmuş dolayısıyla farklı bir protein ürünü kodlayan yeni bir kodlama dizisi oluşturabilirler.

Bir mutasyonun okuma çerçevesinin neresinde oluştuğu da önemlidir. Örneğin bir proteinin amino terminalini kodlayan bir açık okuma çerçevesinin başlangıcında meydana gelen bir mutasyon çoğu zaman kodonların çoğunu koruyan okuma çerçevesinin en ucundaki bir mutasyondan daha büyük bir etkiye sahip olabilir.

Mutasyonlar hastalıkların gelişme riskini arttıran ya da nadir görülen hastalıklarda bizzat hastalığa sebep olan zararlı varyasyonlardır. Yapısal değerlendirmesi yukarda anlatıldığı gibi DNA diziliminde meydana getirdikleri farklılıklar üzerinden yapılırken, mutasyonlar fenotipik etkileri açısından protein ürünü ya da aktivitesinde yaptığı fonksiyonel değişikliğe göre fonksiyon kazandıran (aktivasyon yapan) ve fonksiyon kaybettiren (inhibisyon yapan) mutasyonlar olarak değerlendirilir. Fonksiyonel değerlendirmede en iyi örneği kanser etiyopatogenezinde görevli onkogenler ve tümör süpresör genler oluşturur. Mutasyon değerlendirmesi açısından onkogenlerde aktivasyon yapan, tümör süpresör genlerde inhibisyon yapan mutasyonlar kanser oluşumunda büyük ölçüde sorumludur. (Ponder,2001). Kanser genel görüş ile genomda zararlı varyasyonların/mutasyonların birikmesi ile oluşur. Kanser hastalığının temelinde iki genetik tablodan biri sorumludur. Bunların ilki kalıtsal genetik yatkınlık, diğeri ise kazanılmış somatik genetik değişikliklerdir. Kalıtsal yatkınlık (germline mutasyonlar)yaklaşık %10 luk bir oranda ve özellikle ailesel sendromların tanımlandığı kanser vakalarında görülür. Somatik mutasyonlar ise hastalığın yaklaşık %90'ında görülür. Bazı kanser çeşitlerinde tanımlanmış viral etkenler mevcuttur. Buradaki patogeneze virüslerin kanser genlerinin yayılmasını sağlayacak şekilde çevre dokuyu değiştirmesi, uygun ortam yaratması şeklinde tanımlanabilir. (Ponder 2001)

Kanser oluşumu ile ilişkilendirilmiş temelde 2 grup gen vardır; ilki onkogenler ve diğeri tümör süpresör genlerdir.

Onkogenler kanserleşmeyi sağlayan bu nedenle sağlıklı hücrede ekspresyonu az olan genlerdir. Kanser hücrelerinde ise ekspresyon oranları artar. Bu durum tümör süpresör genler

için tam tersi şekildedir. (Lee ve Muller 2010) Tümör süpresör genler kanserden korur bu nedenle sağlıklı hücrelerde ekspresyonları yüksek iken kanser hücresinde düşüktür. Onkogenler aktivasyonu sorun yaratan genlerdir. Bir genin onkogen olarak değerlendirilebilmesi için bazı şartları yerine getirmesi gerekir. Bunlar; Büyüme faktörlerinin ekspresyonunu sağlamak, hücre yüzeyi yada hücre içinde yer alan büyüme faktörü reseptörlerinin ekspresyonunu sağlayabilmek, hücre içi sinyal dönüştürücüleri eksprese edebilmek, hücre çekirdeğinde yer alan transkripsiyon faktörlerini eksprese edebilmek, hücre çekirdeğindeki hücre döngüsü kontrol proteinlerini eksprese edebilmek gibi özelliklerdir. Onkogenler özellikle kanser tedavisinde hedef olarak kullanılarak klinik pratiğe yansıtılmış moleküler parametrelerdir. En fazla bilinen onkogenler ve ilaç karşılığı çiftleri, BCR-ABL glevec, HER2 herceptin, EGFR ıressadır. Henüz RAS ve CDK5 ve siklinler için tanımlanmış bir tedavi ajanı yoktur. (Lee ve Muller 2010).

Tümör Süpresör Genler inhibisyonu sorun yaratan genlerdir. Tümör süpresör genlerin mutasyonel inaktivasyonu, gelişen bir neoplazmın ayırt edici özelliği olan doku homeostazının kaybına katkıda bulunur. Protoonkogenleri onkogenlere dönüştüren mutasyonlar, proteinlerin aktivitesini veya bolluğunu artıran tek nükleotit değişiklikleri, amplifikasyonları veya kromozomal düzenlemelerdir. Nonsinonim, çerçeve kayması ve ekleme (insersiyon) mutasyonları çoğu durumda protoonkogen aktivasyonuna yol açmaz. Bu mutasyonlar ile daha çok tümör baskılayıcı genler inaktive edilir; başka bir deyişle tarif edilen mutasyon spektrumu etkisizleştirici etkiye sahiptir. Tümör baskılayıcı genlerin açık okuma çerçeveleri yaygın olarak nonsinonim mutasyonlarla veya küçük eklemeler, silinmeler ve (stopgain) nonsense mutasyonlar tarafından değiştirilir. Büyük silinmeler eksonları ve hatta tüm genleri ortadan kaldırabilir. Tümör baskılayıcı genler, kodlanmış proteindeki fonksiyonel bölgeleri değiştiren tek baz değişiklikleri ile de etkisizleştirilebilir. En fazla bilinen tümör süpresör genler :

Rb : Hücre siklusunu regüle eden nükleer fosfoproteini kodlar

P53: Gen ekspresyonu sonucu oluşan ürün hücre siklusu sırasında çalışan genlerin regülasyonu ve aynı zamanda DNA hasarına yanıtta görevlidir.

APC: Genin ürünü beta-katenin ile etkileşerek sinyal iletimini düzenler

BRCA1 ve BRCA2: Gen ürünleri Rad 51 ile karşılıklı etkileşerek rekombinasyon onarımını (DNA onarımını) düzenler.

P16(9p21): p16 proteini cyclin D1/ CDK4 kompleksini inhibe eder bu yolla hücre siklusunu regüle eder. (Lee ve Muller 2010).

1.1.2 Çift Vuruş Hipotezi

Mutasyon iki şekilde edinilebilir. İlki kalıtılarak tüm DNA da *Germline* mutasyonlar, ikincisi ise sonradan kazanılan ve genellikle bir organ ya da sistemi etkileyen *Somatik* mutasyonlardır.

Germ line mutasyonlar bireyin önceki nesillerden kalıtım yolu ile edindiği ve sonraki nesile aktaracağı mutasyonlardır. Bu mutasyonlar germ hücrelerinde olur. Bu nedenle yumurta ve spermdeki mutasyonlar sonraki nesillere aktarılır. Sonuçta bu mutasyonlar doğum ile birlikte sahip olunan varyasyonlardır. Germ line varyasyonlar çocukların neden ailelerine benzediklerini ancak tıpatıp aynı olmadıklarını açıklar. Kanserin ailesel geçişinden söz edildiğinde sebebin büyük kısmını bu şekilde kalıtılan mutasyonlar oluşturur. Örneğin BRCA1/2 mutasyonuna kalıtsal olarak sahip olan bir kadında meme kanseri riskinde artış söz konusudur ya da CDH 1 mutasyonu bulunan bireylerde mide kanseri riski artmıştır. Burada önemli olan her BRCA1/2 mutasyonu kalıtın kadının meme kanseri olmayacağıdır. Bu noktada kanserin genomda zararlı varyasyonların birikmesi ile oluştuğu hipotezini hatırlamak gerekir. Kanser gelişimindeki en büyük risk faktörü yaşlanmaktır. Zaman geçtikçe ya random replikasyon hataları ya da karsinojenlerin sebep olduğu DNA hasarı sonucunda oluşan replikasyon hataları nedeniyle mutasyonlar birikir. İki vuruş hipotezi BRCA1/2 mutasyonuna sahip kadınların tamamının neden kanser olmadığını açıklar. Burada insan genlerinin (kromozomlarının) diploid olduğu ve her genin iki kopyasının olduğu hatırlanmalıdır. Bunun önemi, bir genin ya da allelin mutant olması durumunda diğer allelin işini yapan sağlam bir protein oluşturabilme potansiyelidir. Bir genin kanseri indükleyebilmesi için istisnai durumlar var olmakla birlikte çoğu zaman sırasıyla; her iki allelin etkilenmiş olması ve sonucunda gen ekspresyon ürününü değiştirmesi gerekir. Buna çift vuruş hipotezi denir.

Somatik mutasyonlar; vücuttaki yumurta ve sperm hücresi dışındaki tüm hücrelerin, bir diğer deyişle somatik hücrelerin sonradan edindiği ve hücre proliferasyonu sürecinde hücreler bölündükçe meydana gelen oğul hücrelere aktardığı mutasyonlardır. Buradaki önemli nokta mutasyonların bir sonraki nesile aktarılmıyor oluşudur.

Hücreler her zaman bölünür ve bölünme sırasında DNA sını replike etmek zorundadır ve bu süreçte yaklaşık her 10 milyar baz çiftinden birinde hata, mutasyon, oluşma olasılığı vardır. Aynı zamanda çevresel karsinojenlerin sebep olduğu DNA hasarlarında artış ve takip eden replikasyonlarda da hata oluşması mutasyon oluşmasına neden olabilir. Örneğin UV cilt kanserine, sigara akciğer kanserine, alkol karaciğer kanserine DNA da baz hasarlarına yol açarak sebep olurlar. (Stratton ve diğ 2009) Kanserdeki çift vuruş hipotezi aynı zamanda

heterozigosite kaybı analizine da gelir ve hem germline hemde somatik mutasyonlar için geçerlidir. Germline mutasyona sahip insanların kansere yakalanma yaşlarının nispeten genç olması da bu hipotez ile açıklanabilir. Bir allelde doğum ile sahip olunan mutasyon, diğer allelde de oluştuğunda ve bu son ürün olan protein ekspresyonunu etkilediğinde kanser meydana gelir. Somatik mutasyonlarda her iki allelde mutasyon oluşumu nispeten daha uzun zaman alabilir.

Kanserlerin çoğu farklı genler ve mutasyonlara ihtiyaç duyabilir. Bir kanser hücresinin hayatta kalabilmesi için; normalde var olan self-proliferasyon regülasyonunun üstesinden gelmeli, normal hücre yaşam döngüsünü bozmalı, normal hücresel iletişiminin üstesinden gelmelidir. Tarif ettiğimiz her bir süreç normal bir hücrede oldukça fazla sayıda farklı yolak ile sıkı bir düzenlenme altındadır. Bir hücrenin kanserleşebilmesi tüm bu yolaklarda multiple mutasyonları biriktirebilmesine ve fonksiyonel bir değişiklik yapabilecek kabiliyette olmasına bağlıdır. Kanser hücresinde sıklıkla en az 6-7 farklı gende patolojik etkiye sahip mutasyon tanımlandığını biliyoruz. Örneğin, hücrede bir mutasyon tümör süpresör bir geni inaktive ettiğinde proliferasyonun arttığı görülür; Henüz malignleşmeyen bu hücrede DNA onarım genlerini inaktive eden bir mutasyon daha oluşması ve üzerine onkogenlerden birini aktive eden bir mutasyon oluşması ,tümör süpresörleri inaktive edecek farklı mutasyonların da tabloya eklenmesi ile kümülatif bir mutasyon birikimi hücrenin kanser hücresine dönüşmesini indükler. (Stratton ve diğ 2009)

Ek olarak bilinmelidir ki kanser hücreleri büyük oranda genomik instabiliteye sahiptirler. Genomik instabilite kanser hücresinin normal hücrelere göre sahip olduğu mutasyon oranlarıyla nasıl hayatta kaldığını açıklamaya yarar. Normal hücrelerde DNA replikasyon hataları apoptozis ile sonuçlanır. Kanser hücresinde ise aynı DNA replikasyon hataları oluşur ancak hücreler bununla birlikte çoğalmaya devam eder. Oluşan yeni kanser hücreleri hem bu hataları içerir hem de zaman geçtikçe kümülatif olarak artarak biriktirir. Zamanla kanser hücresindeki mutasyon sıklığının artması ve DNA onarım yollarının etkilenmesi ile hücre apoptozise gitmez. Bu mutasyon oranındaki artış hücrenin heterojenitesi ve tedaviye direncinin temelini oluşturur. (Carson and Ribeiro 1993).

1.1.3 Kanser Hücresel Özellikleri

Ökaryotik hücre bölünerek çoğalabilen, insan vücudundaki fonksiyonel en küçük ünedir. Sıkı kontrol altında olan mitoz bölünme sürecinin ardından oğul hücreler meydana getirir. Bu hücreler dokuları, dokular organları oluşturur. Bu nedenle hücresel homeostaz hücre için olduğu kadar, doku ve organlar içinde çok önemlidir. Ökaryotik bir hücre farklı

birçok organelden meydana gelir. Çekidek, çekirdekçik, mitokondri, lizozom, sentrozom, golgi aygıtı, ribozom ve diğer organeller stoplazmada lokalizedir. Hücre siklusu hücrenin bölünmesi ile sonlanan DNA 'nın replikasyonu ve oğul hücrelerin oluşumu sürecidir. Hücre siklusu 3 periyotta incelenir. 1. İnterfaz, 2. Mitotik Faz ve 3. Sitokinezis. Hücrenin uygun ve doğru şekilde bölündüğünden emin olmak için Hücre siklusu boyunca çok önemli olan kontrol noktaları (check point) vardır. Bu kontrol noktaları G fazında (GAP fazı) bulunur. Hücre siklusu check pointleri bize kanser hücresi ile normal hücreyi ayırmamızı sağlayan ilk özelliği tariflemeye yol gösterir. Kanser hücresinin sahip olduğu bu ilk özellik **replikatif immortalitedir**. (Hanahan ve Weinberg 2011).

Replikatif İmmortalite :

Normal hücrelerin sınırlı bir mitoz yeteneği vardır. Bunun sebebi son çoğalma sorunu da denilebilecek **end replikasyon** sorunudur. Bu sorun büyük oranda kromozomların sonunda yer alan ve her mitozda kısalan telomerler nedeniyle oluşur. Hücreler bölünme yeteneklerini tamamen yitirdiğinde kromozomların sonunda yerleşmiş olan telomerler kısalır ve artık hücreler bölünemez, hücreler Hayflick limitine ulaşmış olarak kabul edilirler. Bir hücre Hayflick limitine ulaştıysa hücre siklusunun G0 fazına gider ve buna hücre yaşlılık denir. (Shay ve Wright 2000).

Kanser hücresinin ilk özelliği olan replikatif immortalite; Hayflick limitini ciddi oranda aşması ve bölünmeye devam etmesidir. Kanser hücresi Hayflick limitini Telomeraz olarak bilinen enzim sayesinde aşar. Telomeraz bir çeşit reverse transkriptaz enzimidir ve telomerin sonuna 3' zincirine AAUCCC bazlarını içeren diziyi ekler. Telomeraz ciddi oranda kısalmış telomerlerin alışılmadık biçimde uzayıp hücrenin proliferasyon yeteneğinin sürmesini sağlar. Telomeraz'ın farklı kanser tiplerinde yüksek oranda eksprese olduğu görülmüştür. (Shay and Wright 1996) Kanser hücresinin ilk özelliği olan replikatif immortalite; kanser hücresinin ölümsüz olmasını, kanser hücresinin sürekli bölünebilmesini ve kanser hücresinin mutant genleri oğul hücrelere aktarabilmesini sağlar.

Kanser hücresinin ikinci özelliği mutant genlerin aktarımı ile ilgili olan **Genomik İnstabilite** özelliğidir.

Genomik İnstabilite:

Normal ökaryotik hücre çekirdeğinde 22 somatik,1 seks kromozomu olmak üzere toplam 23 çift kromozom bulunur. Normal bir hücrede hücre siklusu içinde DNA sentezi sırasında mutasyon tespit edilirse hücre GAP fazına girer, hücre siklusunu durdurur ve mutasyonu onarır ardından tekrar hücre siklusunu başlatır. Hücrede replikasyon aşamasında mutasyon saptandığında siklusu durdurmaya çalışan genler tümör süpresör genlerdir. Bir

kanser hücresi normal bir hücreden nükleusta ulaştığı anormal miktardaki kromozomlarla ayırdedilebileceği gibi mevcut tabloda tümör süpresör genler bekleneni yapamadığı için mitozla gidebilme yeteneği ile de ayrılır. Kanserde mutasyona uğrayan ya da kaybedilen genler genom instabilitesini sağlar. Bu genler tümör süpresör genlerdir. Başka değiş ile mitozla gidiş yavaşlatan ya da durduran genlerdir.

Hücrede mitozu dolayısıyla proliferasyonu aktive etmekle görevli genler de vardır. Bu genlere protoonkogenlerdir. Bu genlerde oluşan mutasyonlar veya gen ürününün ekspresyonunun artması hücrede istenmeyen mitoz veya proliferasyona yol açtığıında onkogenler olarak adlandırılan aynı genler, kanserdeki kontrolsüz proliferasyonun tümör süpresör genler ile birlikte diğer nedenleridir.

Kanserde iki gen grubunda da benzer genetik farklılıklar; nokta mutasyonlar, kromozom delesyonları, heterozigotluk kaybı, diğer mutasyon ve modifikasyonlar, tümör süpresör genlerin inaktivasyonuna ,onkogenlerin ise aktivasyonuna sebep olurlar. Örneğin Kronik Myeloid Lösemi de karyotipleme yapıldığında 9. Kromozomlarda genomik yeniden düzenlemeler (genomic rearrangments) ve 22. Kromozomlarda da silinmeler görünür. Normal bir hücre bu durumda mitozla devam etmez ancak kanser hücresi bu durumu kabul eder, uyum sağlar ve biriken mutasyon yükü ile birlikte sürekli bölünmeye devam eder. (Negrini ve diğ 2010) Mutasyonlar sebebi ile oluşan genomik instabilite kanser hücresinin 3. özelliği olan büyüme süpresyonu yapan sinyallerden kaçınmasına zemin hazırlar.

Büyüme süpresyonu yapan sinyallerden kaçınmak:

Hücre siklusu sırasında normal bir ökaryotik hücrede mitoz süreci proliferatif ve non proliferatif sinyallerin kontrolü altındadır. Özellikle vital kontrol noktası (check point) olan hücre siklusunun G1 fazında büyüme karşıtı (anti- growth) sinyaller hücresel proliferasyonu baskılamak üzere etkili olurlar. Kanseri hücresinde bulunan genomik instabilite, birçok kanser hücresinde normal büyüme baskılayıcı, büyüme karşıtı sinyalin (anti-growth sinyal) G1 kontrol noktasında proliferasyonu kontrol etmesine engel olur. Kanseri hücresinin hücre proliferasyonunu engelleyen büyüme baskılayıcı sinyalleri durdurması için kullandığı mekanizmalardan biri tümör süpresör gen olan retinoblastoma (Rb) ile sağlanır. Rb geni hücrenin hücre siklusunun G1 fazındaki restriksiyon (kısıtlama) noktasındaki ilerlemesini etkin biçimde inhibe eder. Rb geni mutasyona uğramış kanser hücrelerinde bu bekçi basamak (gatekeeper) atlanır ve hücresel proliferasyon devam eder. Bir diğer tümör süpresör gen olan P53 pek çok kanserde hücrelerde kaybolur. Bu hücre siklusunun, DNA hasarı ya da diğer hücresel sterlere rağmen progresyonunun devam etmesini sağlar. Tümör süpresör genlerinin kaybı ya da mutasyonu durumunda kanser hücreleri proliferasyonu sürdürür ve

hücrenin ölmesine direnç gösterir. (Hanahan ve Weinberg,2011).

Hücrenin programlı ölümüne rezistans(Apoptosise Rezistans):

Normal hücreler DNA hasarı, mutasyonları ya da eksternal faktörlere bağlı diğer hücrel stres durumlarında tüm bunlara yanıt olarak apoptosisi, programlı hücre ölümünü başlatırlar.(Roos ve Kaina 2006). Hücrede apoptotik sürecin regülasyonu pro-apoptotik proteinler ve anti apoptotik etkili proteinler ile sağlanır. Kanser hücreleri hücrenin strese maruz kaldığı durumlarda hücre siklusunu sürdürebilme yeteneğine sahiptir. Kanser hücreleri aynı zamanda tüm bu sterslerin varlığında pro- survival (anti apoptotik etkili) proteinleri upregüle ederek hücre ölümüne direnç gösterebilirler. Bu pro survival proteine örnek olarak bazı kanser tiplerinde artmış ekspresyonu gösterilen Bcl2 Proteini verilebilir. (Brown ve Attardi 2005)

Proliferasyonu Sürdürebilmek:

Normal hücrelerde doku hemostazını sağlamak ve diğer hücrel fonksiyonların yerine getirilebilmesi için 'büyüme hormonu sinyali' (Growth hormon sinyali) sıkı kontrol altındadır. Kanser hücreleri ise, kanserin özellikleri göz önüne alındığında birçok tümör süpresör genin kaybı, aynı zamanda onkogenlerin over ekspresyonu gibi nedenlerle proliferasyon kabiliyetine sahiptir, ayrıca kanser hücreleri esansiyel büyüme faktörlerini sağlaması için kendini çevreleyen ve tümör mikroçevresi olarak anılan normal hücreleri uyarma yeteneğine sahiptir. Kanser araştırmalarında çalışılan ve iyi bilinen bir büyüme faktörü olan Epidermal Büyüme Faktörü (EGFR) kanser hücrelerinde eksprese olan reseptörlerine bağlanıp RAS onkogenini aktive edebilir. RAS kanser hücresinde proliferasyonu pozitif etkiler. (Hanahan ve Weinberg 2011).

Metabolizmayı Değiştirmek:

Kanser hücresinin hayatta kalıp mücadele edebilmesini ve konakta çoğalabilmesini sağlayan, onu normal hücreden ayıran özelliklerden biri de kanser hücresinin metabolizmasıdır. Kanser hücresinin sahip olduğu alternatif metabolizma ve normal hücrelerin kullanamayacağı alternatif kaynaklardan enerji elde edebilmesi çok önemlidir. Enerji metabolizmasını yeniden programlayabilmek, kanser hücresinde kontrolsüz proliferasyonu sürdürebilmek için enerji üretiminde değişiklikler yapmayı gerektirir. Kanser hücresi bunu alternatif kaynakları bulup, alternatif yolları kullanarak sağlar. Normal hücreler glikozu glikoliziz ile prövata çevirir ve hücre için ATP üretir. Bunun büyük çoğunluğu da mitokondride yapılır. Kanser hücresinde ise Oksijen dikkate alınmaksızın glikoz fermantasyona uğrar ve laktata çevrilir. Çalışmalar birçok aktive edici mutasyonun (onkogenlerde izlenen) ve enzimin bu prosesi daha da kötüleştirdiğini ortaya çıkardı. Bu

durum kanser hücrelerine oluşan metabolitleri mitoz gibi anabolik proseslerde kullanılabilme izni verilmesine yol açar. Normal bir hücre glikozu mitokondride crebs siklusu ile pirüvata indirirken 36 ATP üretir. Kanser hücresi ise anaerobik glikolize gidip hücre proliferasyonu ve biyokütle birleşmesi için önemli olan Laktat ve az miktarda ATP üretir. (Cantor ve Sabatini,2012). Klinisyenler bu metabolizmayı uzun zamandır Florodeoksiglikoz (FDG) tutulumu üzerinden tümörü nükleer yöntemlerle görüntülerken kullanmaktadır.

İmmun Yanıttan Kaçınma:

Bu özellik kanser hücresinin konakta daha sağlam şekilde hayatta kalmasını sağlar. Bu konuyu daha iyi anlamak için insan vücudu ve immün sistemine kısa bir göz atmak gerekir. İmmün sistem insan vücudunda oluşan hastalıklara karşı koruyan biyolojik yapı ve süreçleri içerir. Düzgün çalışan bir immün sistemin yabancı yapıyı virüsten parazite geniş bir yelpazede tanıyabilmesi, kendi sağlıklı hücresi ile yabancı ya da hastalıklı dokuyu ayırdedebilmesi gerekir. Timus, lenf nodları, dalak, apendiks, kemik iliği ve lenfatik damarlar immün sistem organlarıdır. Bu organlar tarafından üretilen immün sistem hücreleri vardır. T hücreleri lenf nodlarında üretilip timusta matüre olurlar. Vücudun tüm organlarında üretilen myeloid hücreler makrofajlara dönüşürler. Dentritik hücreler ve B hücreleri antikor üretilip sitokin salgılayarak diğer tüm hücreler gibi konağı yabancı istilacılardan korurlar. T hücreleri, B hücreleri, NK ve makrofajlar yabancı istilacıları yutar ve yok ederler. Ancak kanser hücreleri kendilerini T hücrelerinin ve diğerlerinin ataklarından koruyabilmek için 'Programlı Ölüm Ligandı ' (PDL1 ve PDL2) isimli proteinlerin upregülasyonunu sağlarlar. Bu proteinler ekstraselüler ve intraselüler komponentleri olan transmembran proteinleridir. Özellikle immün sistemin; gebelik, doku allografları, otoimmün hastalıklar ve hepatit gibi hastalıklarda, süprese edilmesinde büyük rol oynarlar. Normalde immün sistem yabancı antijen ya da yabancı hücelere karşı reaksiyonda CD8+T hücrelerinin proliferasyonunu başlatır. Otoimmüniteyi önlemek için kontrol ihtiyacı olan T hücreler, PD 1 eksprese ederler. Hücre yüzeylerinde yer alan PDL1 ligandına bu proteinler bağlanınca T hücrelerine proliferasyonu durdurma komutu gider. Bu mekanizma otoimmüniteyi azaltmayı hedefler.

Kanser hücreleri PDL1 reseptör proteini upregülasyonu yapar, T hücrelerinin PD1 ini bağlarlar ve T hücrelerinin atağını durdurular. Bu kanser hücrelerinin immün sistemi nasıl atlattığının anahtar yollarından biridir. (Sharpe 2017).Bu konuda ABD Gıda ve İlaç Kurumunun (FDA) onay verdiği T hücrelerinin yüzeyinde bulunan PD1 i antagonize eden ilaçlarla ilgili çalışmalar hızla yapılmaktadır. Bu antagonistik etki sayesinde T hücrelerinin tümör hücrelerini tanıma ve immün cevap etkinliğinin artması söz konusudur. (Topalian

2017).

Tümörün İnflamasyonu uyarması:

Kanserin bu özelliği inflamasyonun tümör büyüme ve gelişmesine nasıl yardım ettiğini ve sonrasında tümör hareketi ve metastaza nasıl yönlendirdiğini kapsamaktadır. Tümör mikroçevresi normal dokularda görülen inflamatuvar durumlardakine benzer tümör hücrelerini destekleyen adaptif immun hücreler tarafından infiltre edilmiştir. Birçok araştırma tümör ile ilgili inflamasyonun tümör büyümesine yardım ettiğini söylemektedir. (Coussens and Werb 2002). Ek olarak bazı neoplastik hastalıkların erken evrelerinde inflamasyona rastlanmıştır. Erken evrede izlenen inflamasyonun bazı kimyasalların salınarak tümör mikroçevresinde mutasyonların oluşmasına ve hücrelerin tümör formasyonu kazanmasını hızlandırmasına yol açabileceği öne sürülmüştür. (Mantovani ve diğ A 2008) Ayrıca inflamasyonun etkisi ile hücrelerde epitelden mezenkimale dönüşme (EMT) ve saldırganlaşma özelliği kazanılabilir. (Brabletz ve diğ 2018). Ayrıca immün sistem hücreleri farklı gerekçelerle uyarılmaları halinde sitokin salgırlar ve bu sitokinler immün hücre proliferasyonu ve birikimini regüle eder. Ek olarak proteaz sekrete ederek, özellikle ekstraselüler matriks proteinlerini yıkan enzimleri de grede ederler. Kanser hücreleri de immün hücrelere yönelik kemokinler sekrete edebilir ve immün hücrelerde farklı kemokinleri kanser hücrelerine karşı sekrete edebilir. (Katsuno ve diğ 2013). Bu durum selüler motiliteyi arttırabilir. Hücre hareketi, hücrenin hayatta kalmasını ve anjiogenezisi arttırmaya yol açabilir. Tüm bu özellikler tümör hücrelerinin büyümesini, hayatta kalmasını ve saldırganlaşmasını sağlar.

Anjiogenezisin indüklenmesi:

Tüm kanser hücreleri büyüebilmek için kanlanmaya, beslemeye ihtiyaç duyarlar. Tümör etrafında kan damarı oluşumu, tümör hücrelerinde aktive olmuş endotelial hücrelere büyümeleri için uyarı veren ve yeni kan damarları yapılmasını sağlayan Vazoendotelial Growth Faktör gibi (VEGF) pro-anjiogenik faktörler aracılığı ile gerçekleşebilir. Daha önceki özelliklerde immün sistemin hücrelerin tümör gelişimi ve kansere yardımlarından bahsedildiği gibi immün infiltran hücrelerden olan makrofajlarda VEGF sekrete ederek anjiogenezisi indükleyebilir. Belli bir hıza sahip anjiogenezis (engellenmemiş, tüm hızıyla devam edebilen anjiogenezis) tümör büyümesi ve gelişimine olanak sağlayacak O₂, nutrientler ve growth faktörlerinin üretilmesi ve iletilmesi yoluyla, lokal invazyonu indükleyerek tümör hücrelerine fayda sağlar. (Finneyve diğ 2009). Tümör hücreleri normal hücrelere göre çok hızlı büyürler bu nedenle daha fazla O₂ ye ve nütriente ihtiyaç duyarlar. Tümör hücreleri normal hücrelere göre kan damarlarından biraz uzak yerleşimlidirler. Yeni

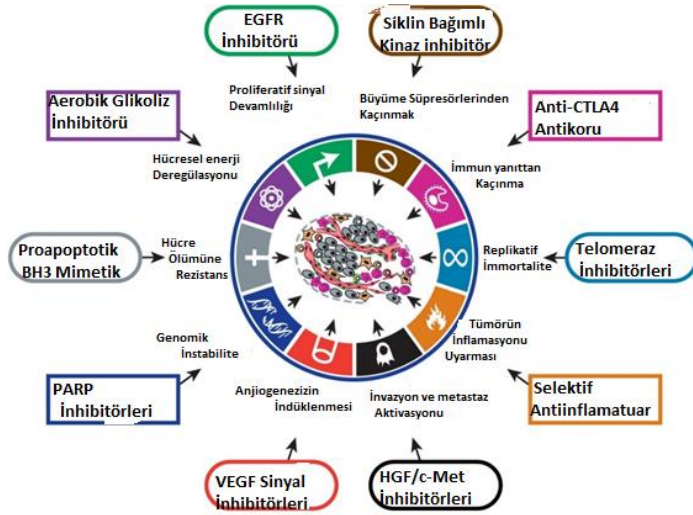
kan damarları önceden var olan damarlardan kaynak alarak tümör hücrelerine ulaşır. Bu durum tümör büyüdüğü sürece devam eder. Bu sürecin doğal olmaması sebebiyle oluşan yeni kan damarları güçlü bir bütünlüğe sahip değildir ve kanı dışarıya sızdırır. Bu nedenle kanser hücrelerinin bu damarların içine girmesi ya da çıkması kolaylaşır. Yeni oluşan damarlardaki bu permeabilite hızlı büyüme ve çoğalma sebebiyle büyük bir yoğunluk oluşturan kanser hücrelerine kan akımına katılmak üzere bir çıkış yolu sağlar. (Wittekind ve Neid 2005) Böylece kan dolaşımına ve lenfatiklere ulaşarak uzak bölgelere metastaz yaparlar. Bu tablo bizi bir diğer özelliğe İnvazyonun aktivasyonu ve metastaz özelliğine götürür.

İnvazyon Aktivasyonu ve Metastaz:

Birçok kanser tipinde metastatik lezyonun oluşabilmesi için bazı basamakların tamamlanması gerekir. Bu basamaklardan ilki hücre-hücre, hücre- ekstrasellüler matrix etkileşimlerinin değişmesidir. İkinci basamağı invazyon, üçüncü basamağı ise kanser hücresinin sistemik dolaşımında hayatta kalmayı başarabilmek için yeterince güçlü olması sağlar. (Wittekind ve Neid 2005)

Ekstrasellüler matrikste hücreleri bağlayan integrinler ve diğer adhezyon proteinleri gibi yapısal proteinlerin değişmesi ya da kaybı, metastaz süpresör genler olarak tariflenen genlerin kaybı ya da mutasyonları metastaz dokularında tespit edilir. Bunlar tümör supressör genlerden farklıdır. Tümör süpresör kaybı tümör gelişimi sağlarken, metastaz süpresör gen kaybı ise metastaz oluşumunu sağlar. (Yoshida ve diğ 2000) Ayrıca daha önce bahsedilen immün hücrelerin mevcudiyeti, epitelden mezenşimal yapıya geçişin meydana gelmesine yol açar. “Epitelyal-mesenkimal geçiş” (EMT) epitel hücresinin orijinal epitel özelliklerini ve kutupsal düzenlemesini kaybettiği ve mezenkimal fenotipe geçiş yaptığı süreçtir. (Brabletz ve diğ 2018) Tümör metastaz süreci boyunca, tümör hücresi, yapışma karakteristiği, protein hidrolizinin ve aktivitesinin artırılması gibi mezenkimal hücrenin bazı özelliklerini sergiler; Bu durum tümör hücresinin hem primer tümörden uzaklaşabilmesini hem de uzak alanda metastatik odaklanmasını sağlar. Metastaz sürecini bir örnekle açıklamak gerekirse; Normal hücreler küboidal şekilli, sabit, ekstraselüler matrikse integrinler ve diğer adhezyon molekülleri ile bağlı yapılardır. Aynı şekilde hücreler birbirlerine de E-cadherin ya da diğer hücre-hücre junctionları aracılığı ile bağlıdır. Zaman içinde bu proteinler kaybedilirse (kansere hücrelerinde olduğu gibi) mezenşimal proteinlerde artış olur. (Brabletz ve diğ 2018) Bazı çalışmalarda Nöro Cadherin gibi proteinlerin bu hücrelerde arttığı gösterilmiştir. Sonrasında integrinlerin ekstrasellüler matrikse adhezyonunda değişimlere yol açtıkları süreçler izlenir. Bunun sonucunda ise kanser

hücreleri gergin ve birbirinden uzak ve normal hücre fonksiyonlarını büyük ölçüde değiştirmiş olacaktır. (Bendas ve Borsig 2012) Böylece bu hücreler invazivleşir ve çevre dokulara invazyon ve ilerleme, hareket kabiliyeti kazanır. İnvazyonun ilk basamağında lokal doku invazyonu olarak da bilinen ekstrasellüler matrice ulaşmak ve orada varlık göstermek vardır. Kanser hücresi daha agresiv, daha mobil ve motil olduğu için protektif ekstrasellüler matriksi geçmeyi sağlayacak hücresel özellikler kazanır. Anjiogenezis sayesinde oluşmuş yeni kan damarlarına ulaşırlar. Burada şunu bilmek gerekir ki hücrenin hareket kazanması ile invazyon yeteneği arasında fark vardır. Hareket yeteneği tutunma kaybı ve yer değiştirebilmeyi temsil ederken, ciddi mesafe katederek histolojik açıdan farklı katmanlara ulaşmak invazyondur. Yani invazyon kanserin şiddetini üst düzeye taşır. Kanser hücreleri aktif olarak vasküler endotelial hücrelere doğru yönelebileceği gibi pasif olarak yeni oluşan damarların yapısal hatalarından da faydalanarak sızıntı alanlarından da ilerleyerek intravaze olur. (Sahai 2005) Sirkülasyonda hücrelerin hayatta kalabilmesi ve metastaz yapacağı uzak organa ulaşabilmesindeki hayatta kalma yeteneğini açıklayacak somut veriler henüz netleşmemiştir. Ancak kanser hücresinin tamamlaması gereken adımlar şu şekilde tarif edilebilir. (Chaffer ve Weinberg 2011) Tümör hücreleri arasındaki yapışma kuvvetinin azalması sonucu tümör hücreleri tarafından salgılanan ekstraselüler matriksi bozan çeşitli enzimlerin etkisiyle, tümör hücrelerinin kan damarı endotel ve bazal membranından geçerek kan dolaşımına girdiği görülür. Tümör hücreleri dolaşımında hayatta kalır. Metastatik potansiyeli yüksek hücre alt grupları metastazın gerçekleşeceği organda metastatik bir odak oluşturmak için damar duvarından dışarı çıkmadan önce endotel hücresine veya subendotelial bazal membran ve kılcal yatağa yapışır ve en nihayetinde ekstravaze olur ve böylece tümör hücreleri yeni bir mikro ortamda çoğalır ve büyür. (Chaffer ve Weinberg 2011) Burada 2019 yılında yapılan bir yaygın kanser hücresinin metastaz yapacağı organı üzerinde taşıdığı reseptörler aracılığı ile seçtiğini, reseptörler aracılığı ile reseptör ligandı taşıyan organlarda çoğalabildiğini göstermiştir. (Lee ve diğ 2019). Kanser hücresel özelliklerini anlamak hem karsinogenezi anlamayı hem de tüm bu faktörler üzerinden tedavi seçenekleri geliştirebilmeyi sağlamaktadır. (Çizim 1.1)



Çizim 1.1 Kanserın Hücresel Özellikleri ve Terapötik Yanıtları (Hanahan ve Weinberg 2011'den alınmıştır.)

Kanserin biyolojik hikayesinin anlaşılması ve her bir basamak için erken tanı ve tedavi arayışları geliştirilmesi günümüzün güncel konusudur. Bu alanda kullanılan yöntemlerden biri de genomik değişimleri incelemek ve anlamlandırmak üzere kurgulanmış genomik veri üretimi ve değerlendirmeleri iş koludur.

1.2. YENİ NESİL DİZİLEME TEKNOLOJİSİ: GENOMİK VERİ OLUŞTURMADA KULLANILAN YÜKSEK VERİMLİ YÖNTEM

21. yüzyılın tıbbi kişiye özel uygulamaları önelemektedir. (Issa 2007) Aslında tıbbi uygulamada tarihsel bir gerçeklik olan 'hastalık yoktur hasta vardır' felsefesi bugün ileri teknoloji sayesinde bilimsel bir gerçekliğe genomik değerlendirmeler sayesinde ulaşmaktadır.

Genomik uygulamaları insan genomu, mikrobiyoma ve besin olarak tüketilen genomik yapıların incelenmesi olarak düşünmek gerekir. Bu alanda dünyada son 10 yılda ciddi insiyatifler oluşturulmuştur. (Buttigieg ve diğ 2013). Ayrıca yaşadığımız alan, solduğumuz hava ve giydiğimiz giysiler ve onların bizim ekosistemimize olan etkileri tüm bu genomik ifadesinin bütün halinde tahlil edilmesini sağlayacaktır.

Günümüzde genomik bilgiyi ortaya koymanın çeşitli yöntemleri bulunmaktadır. Bunlardan biri olan yeni nesil genom dizileme tekniği bu alanda çığır açan gelişmelere yol açmıştır.

Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri ve Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknolojisi birarada kullanılarak genom analizi, metilasyon analizi ve transkripsiyonel

profilleme olanağı sağlanmıştır. (Schuster 2007) RNA, DNA, proteinler ve lipidler dahil olmak üzere her bir biyomoleküler sınıf, farklı omik yaklaşımlarıyla değerlendirilmeye başlanmıştır. (Morozova and Marra, M. A.2008). Bu alandaki gelişmeler kansere bağlı tüm genomik anormalliklerin belirlenmesi, tümörlerin spesifik imzaları aracılığıyla değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır. Dünyada bu adımlar ilk olarak 2005 yılında İnsan genom projesinin ardından başlatılan Kanser Genom Atlası (TCGA) çalışması ile başlamıştır. (Tomczak ve diğ., 2015). Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) ve Amerikan Ulusal İnsan Genomu Araştırma Enstitüsü (NHGRI) ortaklığıyla oluşan bu girişim kanserle ilgili moleküler sapmaların tanımlanması yoluyla kanserin teşhisini, tedavisini ve önlenmesini geliştirmek için oluşturulmuştur. Büyük ölçekli genom dizilimi de dahil olmak üzere genom analiz teknolojilerinin uygulanması yoluyla kanserin moleküler temelini anlamak amacıyla başlatılmıştır. 11.000'den fazla hasta örneği ve 33 tümör tipi TCGA veritabanına dahil edilmiştir. 2012 yılı sonunda farklı kanser türlerine ait genetik profiller literatürde yerini almaya başlamıştır. (Weinstein ve diğ 2013)

Kanserin epigenetik özellikleri, başka bir büyük projenin, asıl amacı NGS teknolojileri sayesinde kamuya açık bir insan epigenomik veritabanı oluşturmak olan Epigenetik Haritalama Konsorsiyumunun kurulmasını sağlamıştır. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, RNA transkriptleri ve kromatin erişilebilirliği çalışması, kanser hücrelerinde epigenetik ile karşılaştırıldığında ilgili farklılıkların tanımlanmasına yardımcı olabilecek normal epigenomların referansını vermeyi amaçlamaktadır. (Bernstein ve diğ,2010) Bu çalışma, kanser oluşumunda rol oynayan ana genlerin ve yolakların ve onkojenik özelliklere sahip moleküler olayların tanımlanmasına yol açmıştır. Aynı zamanda histolojik olarak benzer tümörler arasında bile tümör heterojenitesinin tüm karmaşıklığını ortaya koymuştur. Ardından amacı araştırma topluluğu için farklı kanser türlerinden tümörlerdeki somatik mutasyonlar, genlerin anormal ekspresyonu ve epigenetik modifikasyonlar dahil genomik anormallikler hakkında veri üretmek olan Uluslararası Kanser Genom Konsorsiyumu (ICGC) kurulmuştur. ICGC veri portalı halihazırda kanser projelerinin yüksek hesaplama hacimleri, yüksek karmaşıklık ve yüksek heterojenlik verisi ile araştırmaların sürdüğü büyük bir platformdur. (Alexandrov ve diğ 2013).

Genomik verinin oluşturulabilmesi için yüksek verimli DNA dizileme platformlarına ihtiyaç vardır. Hesaplamalı ve algoritmik biyoinformatik alandaki gelişmeler ile birlikte, omik verilerine erişimde muazzam ilerleme sağlamıştır. Yeni nesil dizleme (NGS) teknolojileri, genomik ve transkriptomik seviyelerde tümörlerin pan-genomik profillerinin doğru analizlerini sağlar ve kişiselleştirilmiş tedaviler için büyük bir fırsat yaratır. (Schuster

2007) İnsanda genomik değerlendirme için gerekli olan DNA sıralama teknolojilerinin ilk örneği olan 1987'de piyasaya sürülen ilk otomatik genom dizileme makinesi aynı anda 96 baz ,günde 500.000 baz tespit edebiliyorken 2013 yılında piyasaya sürülen yeni teknoloji dizileme cihaz ile genom bazlı testlerin geliştirilmesinin önü açılmıştır. Tüm genom dizilimi, tüm ekzom dizilimi, transkriptom dizilimi ve hedefli panel dizilimi dahil olmak üzere birçok NGS dizileme tekniği o zamandan beri kullanılmaktadır. NGS zaman içinde daha güvenilir, daha ucuz ve daha hızlı veri üretebilme kapasitesi ile nanoteknolojideki ilerlemeler ve biyoinformatikteki gelişmelerin de katkısıyla önemli somatik mutasyonların belirlenmesine olanak sağlamıştır (Morozova and Marra 2008).

Tüm genom dizilimi, bir organizmanın bütün genomunu dizilerken, tüm ekzom dizilimi, protein kodlayan genleri diziler. Kansere bağlı gen panellerinin oluşturulabilmesini ve kolay değerlendirme süreçlerini geliştirebilmek için tüm ekzom ve hatta tüm genom verisinin iyi anlaşılması, hedeflerin doğru belirlenmesi gerekir. Kanser panelleri büyük veri aracılığıyla seçilen genlerin belirli bölgelerinin, tekrarlayan mutasyonlara sahip kanser geni hedef bölgelerinin dizilenmesidir. Tüm NGS tabanlı araştırmaların ortak hedefi, tümörleri sınıflandırmak ve sonuçları tahmin edebilmek için kullanılacak genomik ve transkriptomik seviyelerde potansiyel terapötik hedefleri tanımlayarak hemen hemen her türlü analizi gerçekleştirebilmektir. (Weinstein ve diğ 2013).

Tümörler biyolojik olarak çeşitlidir ve karmaşık genetik değişiklikler içerir. Bir kanser türünde ya da diğerinde sıklıkla mutasyona uğramış 100'den fazla gen tespit edilebilirken, çok sayıda kanser geninin, hangisinin hastalığa neden olduğu veya hangilerinin varlığının yeterli olduğunu saptamak için araştırmalar hala devam etmektedir.

Kanser genomları, translokasyonlar, inversiyonlar, füzyonlar ve kopya numarası değişiklikleri dahil olmak üzere birçok büyük ölçekli mutasyonla birlikte yüksek oranda yeniden düzenlenir (Weinstein ve diğ 2013) Bu bakımdan, NGS haritalama soruların yanıtını kısmen verebilir. Elde edilecek veri görece büyük ve çok farklı parametrelerle ilişkilendirilmesi gereken bir veridir. NGS verilerini işlemek için özel araçlar tasarlanmıştır. Bazı haritalama yazılımı programları, tümör ve normal genom çiftlerinin eşzamanlı olarak analiz edilmesine izin verir, böylece germline ve somatik mutasyonlar ayırt edilebilir. (Ghoneim ve diğ 2014). NGS verileri, depolama, iletim, manipülasyon ve analiz gibi büyük biyoenformatik zorluklar yaratır ve günümüzde bu verilerin işlenmesi hala ciddi bir mesai ve araştırma alanıdır.

Yeni nesil dizileme teknolojilerini kullanabilmek için birtakım basamakların

multidispliner olarak tamamlanması gerekir. Bu süreç numunenin doğru toplanması ve patolojik değerlendirmesinin yapılması ve raporlanması, ardından genomik materyalin izolasyonu ve izole edilen ürünün kalite kontrolünün yapılması, dizileme prosedürü için gerekli kütüphanenin oluşturulması, dizilemenin yapılması, cihazdan alınan verinin biyoinformatik değerlendirmesinin yapılması ve son olarak klinik veriler ve genomik verilerin birlikte değerlendirilerek sürecin raporlanmasıdır.

NGS daha düşük maliyetli, daha yüksek verimli genom dizilimi sağlarken elde edilen veri kanserde bulunan çok sayıda ve çeşitli genetik sapmalar, analitik zorluklar yaratır. Bununla birlikte, üretilen bilginin yoğunluğu kanser tedavisi ile ilgili kararları karmaşıklştırabilse de, genom dizilimi, sürücü mutasyonlarının tanımlanması yoluyla yeni terapötik hedeflerin gelişmesini sağlamıştır. (Tamborero ve diğ 2013). Bir kanser çeşidine özel tespit edilen mutasyonların önemi ve terapötik karşılıkları kişiselleştirilmiş tedavilerin temelini oluşturacak biyobelirteç araştırma süreçleri ve klinik araştırmaları için çok kıymetlidir. Nihai amaç, fonksiyonel etkileri ile ilişki kurulabilen ve terapötik etkilere sahip olan harekete geçirilebilir genlerde değişikliklerin tanımlanmasıdır. (Hou ve Ma 2014).

Kanser tanısında patolojik değerlendirme altın standarttır, ancak günümüzde özellikle evreleme ve tedavi seçeneklerini belirlemede genetik tanı büyük önem kazanmıştır. (Kamps ve diğ 2017) Nörolojik kanserlerden Glioblastoma buna iyi bir örnektir. Yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak yapılan genom ve transkriptom analizleri bu tümörlerin pronöral, nöral, klasik ve mezenkimal alt tiplere sınıflandırılmasını sağlamıştır. Ayrıca, glioblastomların %70'inden fazlasında 130 genlik bir panel potansiyel tedavi hedeflerini tanımlamada kullanılır hale gelmiştir. (Kim ve diğ 2013). Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin %5 inde yine NGS teknolojisi kullanılarak tespit edilen EML4-ALK translokasyonları crizotinib gibi yeni ilaçların faydalı olacağı hasta gruplarını belirlemede kullanılmaktadır. (Gridelli ve diğ 2014). Ayrıca EGFR mutasyonları, MET amplifikasyonu ve ROS1 füzyonu gibi değişiklikleri hedef alan tedaviler de akciğer adenokarsinomlarında çalışılmıştır. (Thomas ve diğ 2015). Malign Melanomda sürücü mutasyonlar araştırılmış ve melanomların% 50'sinde bulunan BRAF V600 mutasyonlarında tirozin kinaz inhibitörü olan vemurafenib gibi RAF inhibitörlerinin klinik etkinliği gösterilmiştir. (Marzuka ve diğ2015). Kolorektal kanser başta olmak üzere anti-EGFR tedavisine direnç ile ilişkili KRAS, NRAS ve BRAF'ta mutasyonların tanımlanması hastalara uygun tedavilerin seçilmesi yönündeki güzel örneklerden biridir. (Bardelli ve diğ 2013), (Misale ve diğ 2012).

Genomik verinin ilaç dirençleri ve farmakogenetik öngörülere tespit edebilmek için kullanıldığı diğer örnekler; vemurafenib direnci ile ilişkili MEK mutasyonlarının

belirlenmesi (Misale ve diğ 2014), benzer şekilde, NRAS, GNAQ ve GNA11 gibi diğ er sürücü onkogenlerdeki mutasyonların keşfi ve Mikrosatellit instabilite ile CTLA4 veya PDL1 inhibitörleriyle immünoterapinin kullanılıp kullanılmayacağına karar verilebilmesi olarak sayılabilir. (Chang ve diğ 2018).

Genetik imzanın önemi günümüzde özellikle meme kanseri hastalarının kemoterapiye yanıtlarını öngörme kabiliyeti olan prediktif genetik testler sayesinde ispatlanmış ve Amerika Birliş ik Devletleri Gıda ve İlaç kurumundan onay alarak tedavi rehberlerinde yer bulmuştur. Oncotype isimli 21 gen lik mutasyon ve ekspresyon profillerini değ erlendiren test hastaların adjuvan kemoterapiye yanıt verip vermeyeceğine dair ciddi bir öngörü sağlar. Bu test sayesinde erken evre meme kanseri tanısı alan östrojen ve progesteron reseptörü pozitif, Her2 negatif her 4 hastadan biri kemoterapiden potansiyel fayda göreceğ i konusunda belirlenir ve geride kalan 3 hasta tedaviden fayda görmeyeceğ i öngörülerek, konvansiyonel kemoterapötik ilaçların yan etki ve maliyetinden korunmuş olur. (Carlson ve Roth 2013). Benzer çalışmalar kolorektal kanser için de devam etmektedir, ancak henüz meme kanserindeki başarı bu alanda kazanılamamıştır. (You ve diğ 2015).

Bu alanda yapılan çalışmaların başka bir devrimsel niteliğ i ise kanserin ortaya çıktığı dokuda tanımlanması ve tedavi arayışlarının bu doğrultuda yapılması kuralını değ iştirmesidir. (Cunanan ve diğ 2017) Hastalığın nerede ortaya çıktığından ziyade nasıl bir genetik profil içerdiğ ini önceleyen ve farklı organlardaki kanserlerde aynı terapötik hedeflere yönelik ilaçları araştıran klinik çalışmalara basket çalışmaları ismi verildi (Redig ve Jänne 2015) Bugün özellikle uluslararası basket çalışmaları gösterdi ki kanser tanısı almış hastaların yaklaşık %75 inde daha önce tanımlanmış ve tedavi ile ilişkilendirilebilecek mutasyonlar tespit edilmektedir.(Cunanan ve diğ 2017)

Özellikle bir tümörün özelliklerine uyarlanmış yeni terapötik hedeflerin asıl amacının yanı sıra, omik teknolojilerinin bir diğ er önemli amacı, agresif olmaktan ziyade yakın izlemeye ihtiyaç duyan hastaları belirlemek için moleküler imzalar bularak, konvansiyonel kemoterapi dışı yardımcı stratejileri yeniden incelemektir. (Carlson ve Roth 2013).

Ayrıca nüks riskini, uzak metastaz riskini veya spesifik tedavilere yanıt riskini öngören bazı gen imzaları tanımlanmıştır. MammaPrint imzası ve 76-gen Rotterdam imzası şu anda beş yıl içinde uzak metastaz gelişme riski yüksek hastaları meme kanseri için öngörebilmeyi hedeflemektedir. (Martei ve Matro 2015).

Genomik verilerin kullanıldığı diğ er araştırma alanları içinde ; kanser hastalarının mutasyonlarının doğru şekilde izlenmesi; tedavi stratejilerinin etkinliğ i ve toleransını ve

tedavi sonrasında meydana gelen yeni değişikliklerin taranması ve böylece edinilmiş direnç mekanizmalarının ortaya çıkarılması; metastatik yayılım riski yüksek olan kanser hasta gruplarının tespiti; erken nüks veya rezidüel kanseri saptamak için dolaşımdaki tümör hücrelerinin veya serbest plazma DNA'sının değerlendirilmesi; histolojik tanımlamanın yüksek hassasiyet ve özgüllük analizi ile zorlaştığı durumlarda tümörün kökeninin belirlenmesi çalışmaları sayılır. (Alix-Panabières ve Pantel 2013)

Bu alandaki klinik araştırmalarla birlikte halen geniş kapsamlı genomik araştırmalarda devam etmektedir. İnsan genomunun sadece %2 lik kodlayan alanına dair çalışmaların bu derece etkili sonuçlarının olması özellikle epigenetik ve diğer düzenleyici mekanizmaların da araştırmalarda yerini alması gerektiğini açıkça ortaya çıkarmaktadır

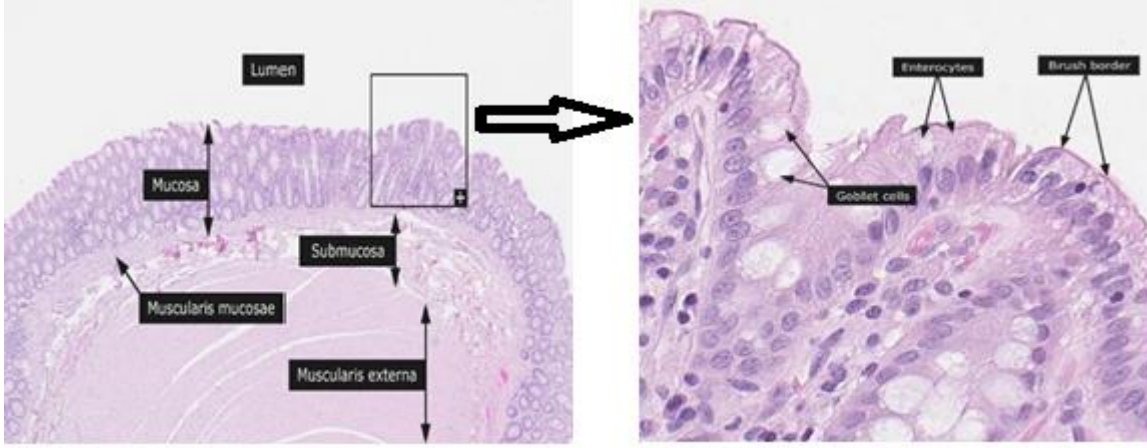
1.3. KOLOREKTAL KANSER ve KOLOREKTAL KANSER KARACİĞER METASTAZI OLUŞUMUNDAKİ MOLEKÜLER MEKANİZMALAR, ROL OYNAYAN GENLER VE PATOFİZYOLOJİK ETKİLERİ

Kolorektal kanser (CRC) insidans oranları beslenme ve yaşam tarzı ile ilişkilidir ve göçmenlerde yapılan çalışmaların sonuçları çevresel faktörlerin önemini güçlendirmektedir Kolon ve rektum epitelinde ortaya çıkan tümörler özellikle sanayi toplumunda çok sık görülür. En yaygın histolojik tip, epitelyal ve glandüler hücrelerden kaynaklanan adenokarsinomdur. Birçok tümör tipinden farklı olarak, kolon ve rektumdaki tümörlere endoskopi kullanılarak erişilebilir ve tümörler büyümenin farklı aşamalarında araştırma fırsatı sunar. Ayrıca hastaya histolojik tanı anında yapılan biyopsilerden genomik bilgi elde edilebilir ve hastalık sürecinin her aşamasında tümör oluşumunda katkıda bulunan genleri incelemek için eşsiz bir fırsat sağlar. (Marzouk ve Schofield 2011).

1980'lerde ve 1990'larda yapılan çalışmalarda, Bert Vogelstein, Kenneth Kinzler ve Eric Fearon kanser genlerinin tümör oluşumuna nasıl katkıda bulunduğunu anlamak için bir paradigma oluşturdular. Bu yapı üzerine kurgulanan kolorektal kanser patofizyolojisinde genetik mekanizmaların ve yolakların rolleri gün geçtikçe daha fazla çalışıldı ve sadece tanı değil tedavi aşamasında da kullanılan belirteçlere dönüşmesi sağlandı..

Patofizyolojik süreçleri tanımlamaya geçmeden önce histolojik olarak kolon ve rektumun yapısından bahsetmek uygun olacaktır. Gastrointestinal sistem, hali hazırda tanımlanmış doku bölümlerinden oluşur. Bu katmanların en önemlisi belki de mukozadır. Hem koruyucu hem de fonksiyonel farklı özellikleri bir arada barındıran mukozası, müküler tabakası ve serozası ile kolorektal doku klasik gastrointestinal sistem yapısını içerir. Gastrointestinal kanal özefagus, mide, duodenum, jejunum, ileum, kolon, rektum ve anal

kanaldan oluşur. Ana fonksiyon dış dünyayla olan direk temasın sağlandığı bir sistem olmanın yanında, vücuda su, elektrolit ve alınan yiyeceklerden besin sağlamaktır. (Denbow 2015). Klasik sindirim sistemi biçimindeki tanımlamaya bugün modern tıbbın bilgisiyle, mikrobiyata, immun sistem ile olan ilişkiler eklenebilir(. Burkey ve diğ 2009). Bu konudaki en büyük bilgi kaynağını gastrointestinal sistem histolojisi sağlamaktadır. GI-kanalın genel yapısını dıştan içe doğru seroza, subseroza, tunika muskularis, submukoza, mukoza katmanları oluşturmaktadır.

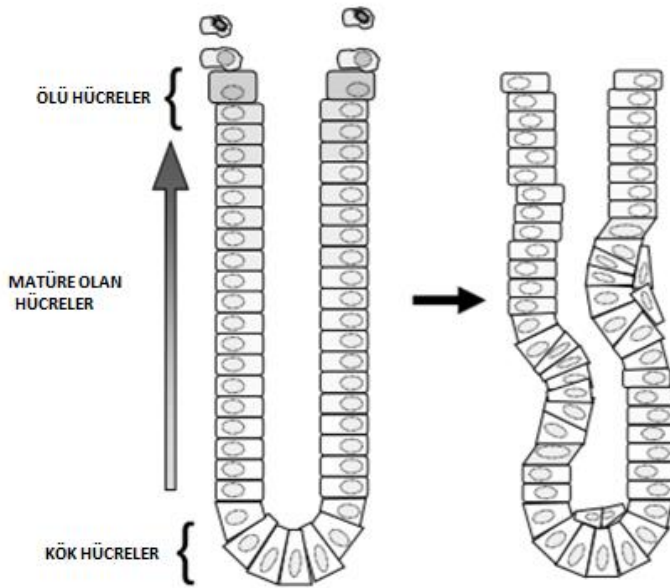


Çizim 1.2 Kolon histolojisi (Human Histology Atlas'dan alınmıştır.)

Yukarıda bahsi geçen katmanlar gastrointestinal sistemin geneline hakimken kalın bağırsakta plika sirkularis veya villus olmadığı için mukoza pürüzsüzdür. (Çizim1.2a)Basit tübüler intestinal bezler (Lieberkuhn'in kriptaları), mukozanın tüm kalınlığı boyunca uzanır. Kolon yüzeyi kolumnar epitel ve kripleri kaplayan oval bazal çekirdekleri ve apikal fırça kenarları olan mikrovillüslerin mikroskobik hali olan enterositlerden oluşur. Ayrıca yüzeyde büyük bir mukoz globülü içermesi ile ayırd edilen ve mukus sekrete eden goblet (kadeh) hücreleri vardır. (Çizim1.2b) Bağ dokusu ve enflamatuar hücrelerden oluşan lamina propriya, kripleri çevrelemektedir. İnce bir düz kas tabaka olan lamina muscularis mukoza, mukoza ile submukoza arasındaki sınırı belirler. Submukoza, damarlar ve sinirlerle birlikte gevşek bağ dokusundan oluşur. Bazı soliter lenf folikülleri de submukoza da görülür. Musküler tabaka (muscularis eksterna), gastrointestinal sistemin geri kalan kısmındaki gibi sürekli değildir. Taenia coli adı verilen üç kalınlaşmış kas grubuna ayrılmıştır.

Kolonun normal mukozal yüzeyi, kalın bağırsağın yüzey alanını maksimize etme işlevi gören kripler olarak bilinen yayılmalardan oluşur. (Çizim1.3) Bu kriptalar, üç farklı tipte epitel hücre tabakası ile kaplanmıştır; bunlar emici hücreler, mukus salgılayan kadeh hücreleri ve nöroepitel hücreleridir. (Denbow 2015) Her kript tabanında, kript olgun

hücrelerine dönüşen 4-6 kök hücre bulunur. Bu proliferatif hücreler ağırlıklı olarak crypt'in alt üçte birinde çoğalır, üst üçte ikisinde farklılaşır ve sonunda crypt'in tepesinde ortamdan çekilir ve böylece lümen içinde kaybolur. Bir kriptin epitel hücreleri, bu nedenle, başta kendi kendini yenileyici bir kök hücre popülasyonundan türetilen bir klonal popülasyondur. Kolonik kriptler, hücrelerin doğdukları, olgunlaştığı, işlev gördükleri ve doğrusal uzayda öldükleri iyi tanımlanmış bir hücresel bölmedir. (Çizim1.4) Kolorektal mukozada mikroskopi veya metilen mavisi ile boyanarak gözlenebilen en küçük kolorektal neoplazm, anormal kript odağıdır. (Brabletz ve diğ 2009). Anormal bir crypt odağı, bir hücre içindeki hücre doğum, olgunlaşma ve ölüm arasındaki hassas dengenin bozulduğunun en erken göstergesidir. Bu bozulma uzun vadede intestinal fonksiyonları etkileyecek, günümüzde üzerine fonksiyonel anlamda çalışmalar sürdürülen intestinal permeabilitenin bozulmasına yol açabilecektir.



Çizim 1.3 Kolon kriptinde kök hücre artışı ve hücre ölümü: Kolorektal epitelin kript olarak bilinen yapısal komponentinin invajinasyon görüntüsü. Bu resim hücre sayısının artması ya da hücre ölümünün azalması durumunda hiperselüleritenin artıp ,doku organizasyonun bozulması dolayısıyla intestinal epitelin fonksiyonel ve anatomik zarar görmesi anlamına gelmektedir.(Çizim Genetic Basis of Cancer'dan alınmıştır.)

Kolorektal bir tümörün brüt olarak gözlenebilen en erken görüntüsü, bağırsak duvarına ve bağırsak lümenine uzanan hücrelerin büyümesi olan polip yapısıdır. Polipler iki histolojik

sınıfa ayrılır: displastik olmayan (hiperplastik) ve displastik (adenomatoz) polipler.

Displastik olmayan polipler normal kriplere benzeyen düzenli bir epitel yapıya sahiptir. Bu tümörler iyi huyludur ve kanserleşme eğiliminin düşük olduğu düşünülmektedir.

Buna karşılık, adenomatoz polipler, altta yatan bir hücrel bozukluğu gösteren histolojik bir özellik olan önemli derecede displaziye sahiptir. Epitel hücreleri, çoklu katmanlar halinde sıralanabilir ve sıklıkla hücre içindeki atipik yerlerde büyütülmüş çekirdeklere sahiptir. Daha büyük adenomlar sıklıkla, bir 'villus' morfolojisi olarak bilinen görüntüyü veren displastik kript projeksiyonları içerir.

Adenomlar büyüdükçe displastik olurlar. Büyüklükleriyle, aynı zamanda çevre dokuları istila etme olasılığı artar, bu noktada malign olarak tanımlanırlar. Tümör büyümesi süresiz olabilir. Örneğin, küçük bir polip yıllarca, hatta on yıllarca hareketsiz kalabilir. Fakat polip hücresinde farklı bir mutasyon meydana geldiğinde, yeni bir proliferasyon dalgası ortaya çıkabilir. Adenomların küçük fakat anlamlı bir kısmı ilerler ve kötü huylu tümörler haline gelir. Bir adenomun büyüklüğü malign potansiyelinin güvenilir bir göstergesidir. İyi huylu polipler genellikle kolonoskopi sırasında rezeke edilebilir, ancak malign tümörler daha kapsamlı bir ameliyat gerektirir. (Townsend ve diğ 2016).

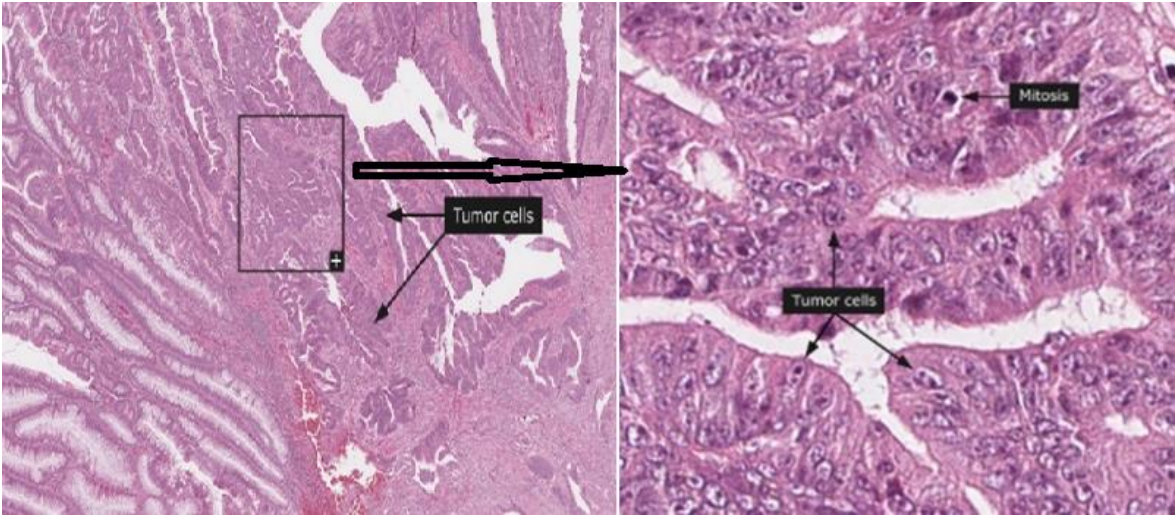
1.3.1 Kolorektal kanser paradigması

Kolorektal Kanser Patolojisi:

Kolorektal kanserin (KRK) adenom olarak adlandırılan prekürsör lezyonlarda gelişen, normal kolon epitelinden kaynaklanan çok adımlı bir süreçle geliştiği düşünülmektedir. Adenomlar daha sonra metastatik potansiyeli olan istilacı KRK'e ilerleyebilir (Çizim 1.4)CRC'nin yayılması, bağırsak duvarı boyunca ve lenfatik ve venöz kanalların istilasından doğrudan büyüme ile oluşur. Metastazlar için en yaygın bölgeler bölgesel lenf düğümleridir ve lenf düğümü metastazlarının sayısı prognozu etkiler. Kolorektal kanserde karaciğer ana metastatik hedefidir. (Townsend ve diğ 2016).

KRK'in büyük çoğunluğu adenokarsinomlardır ve kanserlerin %10'undan azı, bol miktarda musin salgılanması ile ayırt edilir. Tümörler, morfolojik farklılaşma derecesine göre, iyi, orta ve kötü diferansiye olarak sınıflandırılır. Yaklaşık%80'i, bağırsak duvarının farklı katmanlarında mevcut olan düzensiz glandüler yapılar oluşturan tümör hücrelerinden oluşan bir büyüme modeliyle iyi veya orta derecede diferansiyasyon gösterir. Kötü diferansiye KRK, hiçbir glandüler oluşum göstermez. Yaygın bir infiltratif büyüme paterni ile genel olarak kötü diferansiyasyon morfolojik özelliklere dayanan sınıflandırma sistemlerinin eksik olmasına rağmen kötü prognoz ile ilişkilidir.

Adenokarsinomlara ek olarak, kolorektal mukozada endokrin tümörler de ortaya çıkabilir. Skuamöz ve adenoskuamöz tümörler oldukça nadirdir. Bir tümör numunesinin mikroskopik incelemesine dayanan tanı prosedürüne ek olarak, bir metastazın kolorektal kökenini belirlemek veya tümör hücrelerinin etrafındaki dokulardaki yayılmasını görselleştirmek için immünohistokimya kullanılabilir. Kolorektal kökenli tümörler için yüksek hassasiyet ve özgüllük sergileyen antikorlar arasında Cytokeratin 20, CDX-2, SATB2 ve Cadherin-17 'dir. Kromogranin-A antikorları, bağırsaktaki endokrin tümörleri ortak adenokarsinomlardan ayırmak için kullanılabilir.(De Leon ve diğ 2001)



Çizim 1.4 Kolorektal Kanser immunohistokimyasal boyama altında (Human Pathology Atlas'dan alınmıştır.)

Kolorektal Kanser Genetiği:

Kolorektal kanserlerin yaklaşık %20 si kalıtsal iken, %80'i sporadiktir.

Kalıtsal kolorektal kanser tanılı hastaların yaklaşık % 5'i altta yatan bilinen bir germline mutasyona sahiptir. Kalıtsal hastalıklarda kanser sürecini sağlayan ya da hızlandıran farklı mekanizmalar mevcuttur. Örneğin Familial Adenomatöz Polipozisde (FAP) germline mutasyonlara eşlik eden ,kolonda mevcut yüzün üzerinde polip , kolon kanseri sonunu mutlak hale getirir. Oysaki Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser vakaları(HNPCC) için için ise durum biraz farklıdır HNPCC de polip sayısı az olmasına rağmen uygunsuz DNA Onarım genlerindeki bozukluklar poliplerde karsinogenezi indükler.

Sporadik kanserler genetik açıdan iki gruba ayrılabilir. İlki %85 lik oran ile kromozomal instabilite kapsar ve bu grupta kopya sayısı değişimlerinin büyük ölçüde sebep olduğu kromozomal instabilite vardır Mitoz sırasında düzenlenen kromozomal ayrışma, kromozomların mikrotübüllere uygun bağlanmalarını gerektirir. Kolorektal tümörlerde

kromozom ayrışma bozuklukları kromozom sayısında azalma veya artış ile sonuçlanabilir. Bu yolla ortaya çıkan kromozomal instabilite, tümör hücresinin kendi genomunu yaratması ve normal hücre yaşam döngüsünde görülmeyen varyasyonların ve süreçlerin yaşanması anlamını taşır. Geriye kalan %15 de ise belirgin ölçüde Uygunsuz DNA Onarım genlerindeki (MMR gen) defektler sorumludur. Bu tabloda mikrosatellit instabilite (MSI) yola açar. Bir diğer genetik mekanizma epigenetik modifikasyonlardır. KRK'lerin yaklaşık %20'si CpG ada metilasyon fenotipini (CIMP) barındırır, bu da artan DNA promoter metilasyon oranları ile karakterize edilir.

Kolon ve rektum kanseri ile ilgili yapılan genetik araştırmaların en kapsamlılarından biri 2012 yılında yayınlandı. TCGA tarafından yapılan yayında Kolon ve rektum dokularındaki genomik değişikliklerin paterni, kolon veya rektum içindeki anatomik konum veya orijin ne olursa olsun aynı olarak tespit edildiği için bu iki kanser tipinin Kanser Genom Atlası (TCGA) 'na göre tek grup olarak gruplanabileceği sonucuna varıldı. Bu klinikte özellikle tanı ve tedavideki prensiplerin de tekrar bu gözle değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koydu. Örneğin rektum kanserinde sağkalımı ve nüksü doğrudan etkilediği ispatlanan tedavideki total mezorektal eksizyon tekniğindeki anatomik diseksiyon prensiplerinin günümüzde kolon kanseri içinde tartışılmaya başlanmasına bir gerekçe oldu. Yapılan araştırmada özellikle kanserin agresifliği ve invazyon yeteneği DNA onarım mekanizmalarının bozukluğuna ve mutasyon oranının anormal derece yüksek olduğu hipermutasyon fenomenine bağlandı. Kanserle ilişkilendirilen tümör süpresör ve protoonkogenlerden oluşan APC, P53, KRAS, SMAD4, PIK3CA gibi bilinen 24 genin dışında kolon çalışması özelinde 3 yeni genin etkisi tariflendi Bunlar: ARID1A, SOX9 ve FAM123B / WTX genlerindeki mutasyonlardı. Kolorektal kanser ile ilişkili TCGA datasının literatüre kazandırdığı bir diğer bilgi ERBB2 ve IGF2 genlerinin aşırı ekspresyonuydu. Bu genler hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynadıklarından, bu bulgu bu genlerin ürünlerini inhibe etmenin tedavide kullanılabileceğini gösterdi.

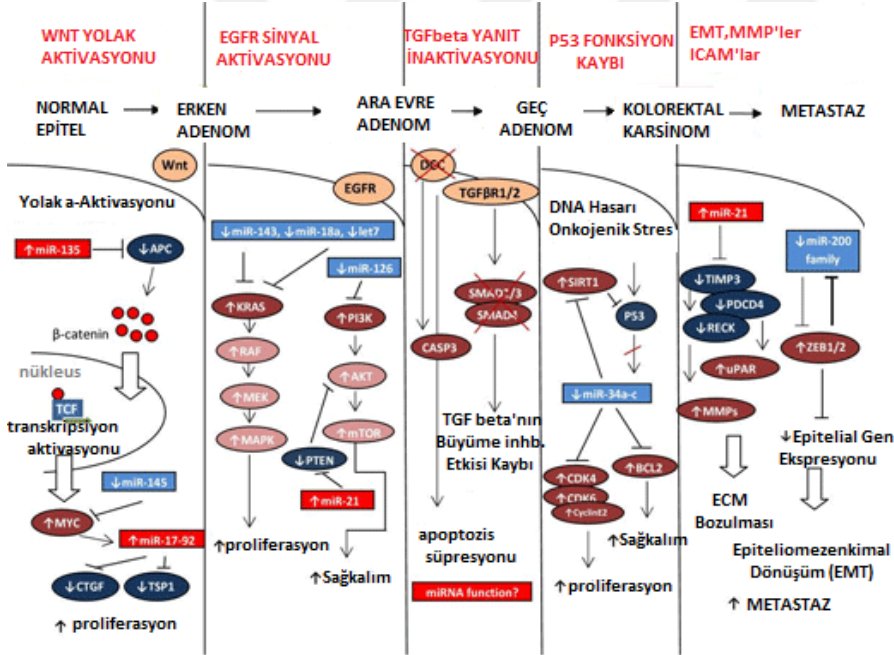
Hipermutasyon durumunda genetik mutasyon yüksekliği ile baş edemeyen DNA onarım mekanizmalarının bozulduğu düşünülmektedir. TCGA Kolorektal kanser araştırmasında örneklerin %16 sının hipermutasyona sahip olduğu ve bu vakaların $\frac{3}{4}$ ünün mikrosatellit kararsızlık sergilediği görüldü. Mikrosatellitler genomda tekrarlayan DNA bölümleridir. Genomun bu bölümlerinin korunmasından sorumlu genlerde hatalar meydana gelirse mikrosatellitlerde uzama veya kısalma yada yanlış yerleşme gibi hatalar oluşabilir ve bu duruma mikrosatellit instabilite denir. TCGA Kolorektal kanser çalışması WNT sinyal yoloğında vakalarda farklılıklar gösteren onlarca varyasyon belirledi ve bu yaklaşımın

tedavide anlamlı olacağını öngördü. WNT sinyal yolunu incelemenin yanı sıra, RTK / RAS ve AKT-PI3K'yı, kolorektal kanser için tedavileri hedeflemede önemli bir mekanizmalar olarak tariflediler.

Kolorektal kanserde serrated polipler aracılığıyla hastaların yaklaşık %20'sinde görülen CpG ada metilasyon fenotipinin sebebi uygunsuz DNA metilasyonudur. Hipermetilasyon uygunsuz DNA Onarım genlerinin ekspresyonu durdurur ve Mikrosatellit instabiliteye yol açar. Ayrıca O-6 methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) DNA onarım geninin promoter bölgesinin hipermetilasyonu da bir diğer epigenetik sorumlu mekanizmadır. MGMT metilasyonuna serrated adenokarsinomların %50'sinde rastlanmaktadır. Serrated poliplerin, klasik adenom-karsinom sürecinden farklı olarak, hipermetilasyon ve mikrosatellit instabilite üzerinden BRAF mutasyonu karsinogenizin alternatif epigenetik yolağıdır. Kolorektal kanser etyolojisindeki bir diğer epigenetik modifikasyon epitelyal hücre adezyon molekülünde (EPCAM) meydana gelen bir delesyonunun, aynı kromozomda bulunan MSH2 geninin promoter bölgesinin hipermetilasyonu yolu ile mikrosatellit instabiliteye yol açmasıdır. MMR genler normal olsa dahi EPCAM delesyonu yolu ile yada kanser kök hücresi aracılı artmış EPCAM ekspresyonu mikrosatellit instabiliteye neden olacaktır. (Okugawa ve diğ 2015). Bir diğer epigenetik mekanizma baskılanmış olması gereken gen bölgesinin aktifleşmesi (loss of imprinting-LOI) allel baskı kaybıdır. Böylece normalde epigenetik olarak susturulmuş olan bir alel aktifleşir. Bir onkogenin ya da büyüme ve proliferasyonu indükleyen bir genin ekspresyonu bu yolla artabilir. Buna en güzel örnek olarak kolorektal kanserde IGF2'nin (İnsülin büyüme faktörü) epigenetik olarak baskılanmış bir alelindeki baskının kalkması ile gen ekspresyonunun artması ve fosfotidil 3 kinaz ve Akt yolağını aktifleştirmesi verilebilir.

Kolorektal kanserde meydana gelen moleküler mekanizmalar genlerde meydana gelen mutasyonlar, silinmeler ve amplifikasyonlar vb tüm değişimler çeşitli sinyal yollarını regüle ederek farklı transkripsiyon ürünleri ve birbirleriyle olan ilişkileri üzerinden bu süreci yönetmektedir. Aslında tek başına ne bir mutasyon ne de endojen bir hormon bu etkiden sorumlu tutulamayacağı gibi, genel anlamda epigenetik modifikasyonlar, mikrobiyata ve mikrobiyatanın ürettiği transkripsiyon ürünleri ile kanserojen olarak nitelendirilen çevresel biyolojik ya da kimyasal ajanalar süreci bir bütün halinde regüle ediyor olmalıdır. Tüm basamaklar sonuçta kanser mekanizmasının ortaya çıkmasını ve sürdürülmesini sağlayan sinyal iletim yolları üzerinden bu etkiyi başlatıyor ve sürdürüyor. Bu sinyal mekanizmalarını kimi zaman bir endojen hormon, kimi zaman bir radyoaktif madde kimi zaman ise mikrobiyal transkripsiyon ürünü, adı ve kaynağı ne olursa olsun kanserogenesisi harekete

geçirmeyi başarıyorsa, bilim dünyasının da bu faktörleri tamamını bir bütün halinde çapraz etkileri de hesaplayarak bir öngörü ile ortaya koyması gerekir. Çoğu zaman tedavide hedeflenen bu yollar süreçte görevli genlerde meydana gelen mutasyon nedeniyle bağımsız basamaklar edindiği için tedaviye yanıtınlığı veya direncin sebebi olmaktadır. Bu duruma örnek olarak VEGF reseptörlerinin MAPK sinyal yolağını durdurmak üzere hedeflenmesi ancak KRAS veya NRAS mutasyonu durumunda VEGF reseptöründen bağımsız yolağın devam edebilmesi ve proliferasyonun durdurulamaması verilebilir. Bu nedenle bugünkü literatür bilimize dayanarak hem genler hem de sinyal yollarının bilinen tarihçesini anmak gerekiyor. Hem Kromozomal instabilite hem de mikrosatellit instabilite kolorektal kanserlerde, beş farklı anahtar sinyal yolağının sıralı serbest bırakılması yoluyla hastalığın ilerlemesini sağlar: Wnt, MAPK, p53, TGFβ ve PI3K (Çizim 1.5). Kolorektal kanser karaciğer metastazları ise özellikle Ekstraselüler Matriks, Metalloproteinaz sistemi, ve hücre adhezyon moleküllerinin redükte ettikleri mekanizmalar üzerinden tariflenmektedir.



Çizim 1.5 Kolon kanseri sinyal yolları ve metastaz mekanizması

Normal bir hücreden metastatik kansere kadar giden ve sürekli ek bozukluklarla belirginleşen adenom-kanser sürecini başlatan kritik ilk basamak, genellikle adenomatoz polipozis (APC) genindeki mutasyondur (Çizim 1.5). Kalıtsal kanser sendromlarında da sorumlu olan bu gen kaybı tablosu genelde her iki allelde silinme olması ile kendini gösterir. Burada Kolorektal karsinomun patogenezinde başlatıcı durumda görünen ve vakaların %90'

ında etkin olan Wnt Sinyal yolağından bahsetmek gerekir. Glikolize lipoprotein yapısındaki Wnt, hedef hücre zarında bulunan, Frizzled (Fz) ve LRP5/6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein) reseptörlerine bağlanır. Bu reseptörler G protein üzerinden fosforilasyon işlemleri başlatıp β -katenin'in hücre stoplazmasında yıkımından sorumlu kompleksi inaktif hale getirerek β -katenin hücre içinde birikmesini ve hücre çekirdeğine taşınmasına sebep olurlar. Hücre çekirdeğine giren β -katenin transkripsiyon faktörlerini aktifleyerek proliferasyon, apoptosisin engellenmesi gibi kanserojen etkilere sebep olur. β -kateninin yıkımından sorumlu yıkıcı kompleks 'axin, GSK3 β ve adenomatöz poliposis koli (APC)'den meydana gelmiştir. Bu kompleks wnt sinyal yolu üzerinden inaktif hale gelmediği ve kendi içinde de mutasyonlara sahip olmadığı sürece β -kateninin hücre çekirdeğine gitmesini engeller. Ancak wnt sinyal yolağından bağımsız olarak bu kompleks üyeleri üzerindeki genetik ya da epigenetik modifikasyonlar ya da bu kompleksin başka bir etki ile fosforilasyonu kompleksi inaktif hale getirip β -katenin yıkılamaması nedeniyle stoplazmadan hücre çekirdeğine giderek etkisini ortaya çıkartabilir. Hücre içi β -katenin birikimi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve sonrasında K-Ras mutasyonu eklenmesi ardından kromozom 18q DCC, SMAD4 VE SMAD6 heterozigosite kayıpları ve takiben 17p kromozomunda bulunan TP53 gen mutasyonu hastaların %80 ininde saptanır. Tp53 proteini normalde büyümeyi baskılayan genlerin transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla, anormal kromozomal yapıya sahip hücrelerin G1-S fazında kalmasını, sorunun giderilmesini sağlar ancak sorun giderilemezse hücreler apoptoza gider. TP53 gen mutasyonu sonucunda anormal kromozomal yapıya ve sayıya sahip hücreler apoptosisten kurtulur ve çoğalmaya devam eder.

1.4. KOLOREKTAL KANSERLERDE KARACİĞER METASTAZI:

Kolorektal kanserin metastatik odağının oluşumu, tümör hücrelerinin biyolojik özellikleri, insan vücudunun bağışıklık durumu ve organların mikro-çevresi ile yakından ilişkilidir. Ancak uygun koşullar ve kombinasyonlar oluşursa kanser hücresi metastatik bir odağa yerleşebilir.

Solid tümörlerin metastaz yapabilmesi için iki yol bilinmektedir. İlk yol hematojen diğeri ise lenfojen yayılımdır. Hematojen yayılım invaziv kaser hücrelerinin neovaskülarizasyon sonrası yeni oluşan ancak sağlam olmayan geçirgen damar duvarlarına tutunup intravaze olarak kan dolaşımına ulaşması ve bu yolla dolaşımda hayatta kalıp metastatik uygun odakta tutunarak yerleşmesi olarak tarif edilir. Hayvan deneyleri dolaşıma çıkan tümör hücrelerinin ancak %0,1 inin hayatta kalabildiğini ve metastaz oluşturabildiğini

gösterdi. Tümör metastazı, metastaz yapabilme özelliğine sahip seçilmiş, farklı hücrelerin çoğalması ile mümkündür. Burada bahsettiğimiz seçilmiş hücreler kanser kök hücreleridir. Kanser kök hücreleri hem tümörün büyümesi ve hayatta kalması için hem de metastaz kabiliyeti edinebilmesi farklı sitokinler ve kemokinler ekspresyone ederek mikroçevrede ve tümörde yeniden yapılanma sağlayabilen hem de farklı hücelere diferansiyasyon olarak metastaz ve tümörün hayatta kalması için uygun hücre reseptörlerini ekspresyone edebilen bu hikayedeki en önemli hücrelerdir. Metastazda konağın immun sisteminin organizasyonu çok önemlidir. Bir insanda tümör ile karşılaşan immun sistem hücreleri hücreler ve humoral bağışıklık yoluyla tümör hücreleriyle mücadele etmeye çalışır, ancak buradaki kilit nokta tümör hücrelerinin immun yanıtı hücre yüzeyindeki reseptörler aracılığı ile atlatılması ve hatta başka bir teori ile kendini uzak organlara götüreceği bir taşıyıcı sistem gibi kullanabilmesidir.

Son olarak metastaz oluşumu tümör hücrelerinin hayatta kalma yeteneği ve hedef organa ulaşabilme kabiliyeti kadar ,metastazın oluşacağı organın kendi yapısal ve metabolik süreçleri ile de ilgilidir. Burada iki önemli yapı vardır, ilki tümörün geliştiği mikroçevre diğeri ise metastazın gelişmesine olanak sağlayacak mikro çevre yapısıdır. Bu yapı hem tümörün geliştiği primer organda hem de metastazın geliştiği organdaki yaşamsal organizasyonun temelidir.

Mikroçevre, tümör hücrelerinin stabilitesini etkiler ve hücrelerin büyüme ve metastaz yapabilme fonksiyonlarını regüle edebilir. 1889'da Paget "tohum ve toprak" teorisini öne sürdüğünde metastatik odağın oluşması ve büyümesini, bazı tümör hücreleri ve belirli organlar arasındaki karşılıklı biyolojik uyuma bağlar. Sadece tohum ve toprak birbiriyle eşleştğinde metastaz başarıyla oluşturulabilir. Paget'i destekleyen araştırma 2019 yılında yayınlandı ve mesane kanserinin akciğer metastazı yapabilmesi için tümör hücrelerinin taşıdığı kolajen alt tipine uygun reseptör barındıran akciğer bronş dokusuna metastaz yapabildiğini gösterdi. Ayrıca son zamanlarda tümör hücrelerinin, hedef organa önceden ulaşmak için kemik iliği hücrelerini harekete geçirip ya da hedef organın mikroçevresini değiştirmek için bazı faktörleri salgılayabileceği, bu çabanın tümör progresyonu sağlayabileceği iddia edildi. Örneğin VEGF reseptörü taşıyan kemik iliği hücrelerinin farelere enjekte edilmesi sonrasında tümör metastazının ortaya çıkmasının kolaylaştığı görüldü.

Kolorektal kanser metastazının oluşması ve büyümesi, metastazın oluştuğu organa ulaşan ve metastazı başlatan hücrelerin özel bir fenotipe sahip olması ile mümkündür. Bu fenotip . çoklu moleküler olayları regüle edebilecek kabiliyette olmalıdır. Aşağıda

metastazın oluşabilmesi için gerekli organizasyon maddeler halinde sıralanmıştır. Bunların ilki hücre adezyonudur. Hücre adezyonu, metastazda çok önemli bir rol oynar. Bir yandan, tümör hücrelerindeki adezyon moleküllerinin ifadesindeki değişiklik, hücreler arasındaki yapışmayı zayıflatabilir, böylece tümör hücreleri komşu hücrelerden ayrılır; öte yandan, tümör hücresi bazı adezyon moleküllerinin ekspresyonunun artması kana giren tümör hücrelerinin kan damarı endotel hücrelerine veya metastatik hedef organın bazı hücrelerine yapışmasını sağlar ve hematogen metastaz yolu ile metastatik odak oluşumunu hızlandırır. Her şeyden önce tümör hücrelerinin metastatik işlemi, alternatif yapışma ve ayrılma işlemidir. Bu süreçte, etkisi bilinen adezyon molekülleridir.

1.4.1 Adezyon Molekülleri:

Kadherin-Katenin Sistemi:

Kadherin, kalsiyum bağımlı hücreler arasında yapışmadan sorumlu bir tür transmembran glikoproteinidir. Hücreler arası etkileşimde görevlidir. Selektif hücre yapışmasında, dokunun farklı gelişim aşamalarında yer alır. Kadherinin sitoplazmik fonksiyon alanı, katenin ile bağlantılıdır. Kadherinin devre dışı bırakılması, hücre-hücre yapışmasına zarar verirken aşırı ifadesi daha yakın hücre-hücre temasına neden olur. Sürekli ekspresyon ve fonksiyonel aktiviteye sahip olan E-kadherin (ECAD), epitelde hücre entegrasyonunu sürdürmede rol oynar. Kolon kanserinde, E-kadherin ve a-katenin ekspresyonu azaltılmaya çalışılır. Primer kolon kanserinin yaklaşık %80'inde, alfa ve β -katenin ekspresyonu azalır. Alfa-katenin ekspresyonundaki belirgin azalma, kötü diferansiyasyon, yüksek metastatik potansiyel ve kötü prognoz ile ilişkilidir .

Karsinoembriyonik Antijen (CEA)

CEA kolorektal kanserin dedifferansiyasyon prosesindeki ekspresyonu gösteren en önemli biyobelirteçtir. Kolorektal kanserin hepatik metastazında özellikle tedavi sonrası takip sürecinde kullanılır. Karaciğerde CEA Kupffer hücresi üzerindeki reseptörüne bağlanarak, Kupffer hücrelerinin karaciğerde tümör yapışmasını ve tutulmasını artıran IL-1a, IL-1 β , IL-6, TNF α gibi sitokinleri salgılamasını sağlar. Bu sitokinler hepatik endotel hücrelerinde yapışma moleküllerinin ekspresyonunu sağlar.

CD44

CD44, endotelial hücreye yapışmaya aracılık eden bir tür transmembran hyaluronik asit reseptörüdür. Anormal CD44v6 ve CD44v8-10'un yüksek ekspresyonu, kolorektal kanserin hepatik metastazı ile yakından ilişkili olarak kabul edilir. Bu yapışma molekülünün

ilgili ligand ile durdurulması belki de kolorektal kanserin hepatik metastazı oluşumunu engelleyebilir. CD44 anormal splicing işlemi, tümör hücresinin göçünü ve hareket kabiliyetini etkileyebilecek, tümör hücresinin hücre iskeleti proteinlerinin kümelenmesini ve dağılımını etkileyebilir. Birçok yönden bu ikili etki, tümör metastazı oluşumuna neden olur. CD44'ün tümör hücresindeki anormal ekspresyonu yeniden yapılanmadan kaçabilir ve metastatik süreçte konakçı bağışıklık sisteminden de korunabilir.

İntegrinler

İntegrinler, bir bütün oluşturmak üzere hücre içi iskeleti ve hücre dışı matrisi birleştirir. Aynı zamanda integrinler, hücreler arası edhezyonda da rol alır. İmmünohistokimyasal deney sonuçları hepatik metastazlı kolorektal kanserin %58'inin (11/19) doku integrin α VLA3 boyamasının, metastazı olmayan (%0) dokununkinden anlamlı olarak daha yüksek olduğunu gösterdi. Kolorektal kanserin hepatik metastaz dokusunda integrin $\alpha 3\beta 1$ 'in ekspresyon seviyesi de primer dokununkinden anlamlı derecede yüksektir. Ayrıca, integrin, MMP2 ve uPAR ın eşlik ettiği durumlar da invazyon için çok önemlidir.

1.4.2 Hareket ve İnvazyon

Kolon kanseri hücrelerinin hareketinde ve invazyonunda karaciğer tarafından üretilen büyüme faktörü olan hepatik büyüme faktörünün (HGF) önemli bir rolü vardır. HGF c-met reseptörünün aşırı ekspresyonu, kolorektal kanser progresyonunda, tümör hücresi göçünü indükleyen önemli bir rol oynar. Son yıllarda, birçok kanıt HGF'nin kolorektal kanserin hepatik metastazı oluşumu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Hepatik metastatik odakta c-met reseptör seviyesi nispeten yüksektir. C-met reseptörünün aşırı ekspresyonu sadece primer tümörün % 50'sinde meydana gelirken, hepatik metastatik odakların yaklaşık % 70'inde c-met reseptör seviyesi yüksektir. Tüm bu sonuçlar c-met' reseptörünün aşırı ekspresyonunun, tümör hücrelerinin göçünde ve uzak metastaz oluşumunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Transforming büyüme faktörü (TGF) normal bir kolon epitelinde hücre büyümesi inhibitörüdür ve aynı zamanda kolon kanserinde tümör hücrelerinin hareketinin ve göçünün artması ile de ilişkilidir. Metastatik tümörlerdeki TGF ekspresyonunun primer tümördekinden daha yüksek olduğunu gösteren çalışmalar vardır. TGF- $\beta 1$ tümör oluşumunun erken evresinde tümör metastazını inhibe edebilmektedir. Ekspresyon seviyesinin azalması tümör büyümesini destekleyebilir, tümör hücreleri arasındaki yapışmayı azaltabilir, bazal membran bozulmasına ve tümör anjiyogenezine katkı sağlıyor olabilir. Fakat ileri evrede tümörün genişlemesini teşvik edebilir.

1.4.3 Ekstraselüler Matriksin Bozulması

İnvazyon ve metastaz sırasında tümör hücrelerinin hücreler arası matriks ,bazal membran (BM) hücre dışı matriksine (ECM) zarar vermesi gerekir. ECM ve BM; kollajen, laminin, protein polisakaritler,epitel hücreleri, matris hücreleri ve tümör hücrelerinin ürettiği çeşitli moleküllerden oluşur. Bu sürece katılabilecek proteinler esas olarak matris bozucu Matris metaloproteinazlar (MMP'ler), serin proteinaz, elastaz, aspartaz ve sistein proteaz, vb. içerir(Brabletz ve diğ 2018).

1.4.4 Matris Bozucu Metalloproteinazlar (MMP)

Hem tümör hem de bağ dokusu hücreleri, dört alt familyaya, yani kollajenlere, jelatinlere, stromelisinlere ve metalolastazlara bölünmüş MMP'leri salgılayabilir. MMP ailesindeki MMP1 ve MMP13, kanser ve kanser proliferasyonu ve infiltrasyonunun periferik mezenkimalarına zarar verir. MMP2, MMP3, MMP7 ve MMP9, bazal membranı oluşturan ve kanser hücrelerini kan damarı içine girmeye teşvik eden tip IV kollajenaza zarar verebilir. Aynı zamanda, metaloproteinazların doku inhibitörü (TIMP'ler) olarak adlandırılan üç tür MMP'ye özgü inhibitör vardır. MMP'ler ve TMP'ler arasındaki denge, tümör istilasını ve fenotipi etkiler .

1.4.5 Plazminojen / Fibrinaz Sistemi

Plazminojen aktivatörü (PA) ve plazminojen aktivatörü inhibitör (PAI) sistemi, tümör metastazı ile ilgili diğer önemli proteinaz sistemleridir. Başlangıçta kan dolaşımında keşfedilen PA, ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA) ve doku tipi plazminojen aktivatörü (tPA) olarak bölünebilir. Bunlar serin proteinaz familyasına aittir ve ECM'nin parçalanmasında ve proteinazların aktivasyonunda sinerjik bir rol oynayarak ve proteinazların aktivasyonunu teşvik ederek plazminojeni fibrinaz'a dönüştürebilir.

1.4.6 Tümör Damarının Oluşumu

Folkman, tümörün kan damarı oluşumuna bağlı olarak büyüdüğü fenomenini keşfettiğinden, damar endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi kan damarı oluşumunu olumlu ve olumsuz olarak düzenleyen büyüme faktörü (TGF), interlökin-8 (IL-8), matris metaloproteinaz (MMP), kan trombosit aktive edici faktör ve benzerleri gibi birçok faktör keşfedilmiştir. Tümör sağkalımı ve metastazı, tümör anjiyojenezi ile sonuçlanma eğiliminde

olan pozitif ve negatif düzenleyici faktörlerin kapsamlı sonuçlarına dayanır. VEGF, endotel hücrelerine özel mitogenetik bir faktördür. Bu etkiyi esas olarak endotel hücreindeki üç reseptör, yani flk, fl1 ve flt4 ile sağlar. VEGF, tümör hücresi tarafından salgılanabilir. VEGF'nin yüksek ekspresyon seviyesi sadece hipoksi gibi stimülasyon sinyalinin etkisi ile değil, aynı zamanda IL-1, IL-6, IL-8, TGF, trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) gibi faktörler ile de düzenlenmiştir. VEGF aktivitesinin, VEGF reseptörüne bağlanan antikorlar veya VEGF reseptörünün etkisini bloke eden spesifik tirozin kinaz inhibitörü ile bloke edilmesi, farelerin kolon kanseri modelinin hepatik metastatik odaklarının miktarını, boyutunu ve damar yoğunluğunu azaltabilir.

Sialil-Lewis x (sLex) antijeni, hepatik kan damarı endotel hücrelerinin yüzeyindeki E-selektin reseptörü ligandı olarak, kolorektal kanserin hepatik metastazında önemli bir rol oynar. Yüksek derecede sLex antijenini ekspresyon eden tümör hücresi birincil odaktan ayrılır, kan damarı içine girer, hepatik kan damarı endoteline yapışır ve hepatik bir metastatik tümör oluşturmak üzere büyür. Yüksek ekspresyonlu sLex antijen hücrelerinin, bazal zara sızması daha kolaydır ve hepatik metastazı oluşturmak üzere aktive edilmiş insan kan damarı endotel hücrelerine yapışır. Bunun nedeni, kılcal damar endotel hücrelerinin yüzeyinde E-selektin ligandı olarak görev yapan tümör hücresi yüzeyindeki sLex antijeninin, tümör hücrelerinin, hedef organın kan damar endotel hücrelerine yapışmasına aracılık etmesi ve yönsel kemotaktik hareketi teşvik etmesidir. Böylece tümör hücrelerinin metastaz yapması sağlanır. Ayrıca birçok çalışma kolorektal kanserin metastatik odağında sLex antijeninin ekspresyonunun birincil odaktakinden daha güçlü olduğunu doğrulamaktadır.

1.5. KOLOREKTAL KANSERDE KLİNİK GENETİK SINIFLAMA

Tüm bu mekanizmaları çalışılan bilimsel araştırmaları hastalığı tanımak ve onunla baş edebilmek hedefine yöneliktir. Özellikle moleküler tanıyı geliştirmek, tedaviye yanıtta daha etkin sonuçlara ulaşmayı sağlayacak alt grupları tanımlamak gerekmektedir. Kolorektal kanserin genetik alt grupları oluşturulması ve tedavi planlarında öngörüsünden faydalanılacak bir sistem kurulması için bir konsensüs oluşturuldu. Kolorektal kanserlerin moleküler alt tiplerini belirlemek, mutasyon spektrumu ile hastanın prognozu ve tedaviye yanıtını arttırmayı hedefleyen bu konsensüs kolorektal kanserleri dört konsensüs moleküler alt gruba (CMS 1-4) sınıflandırmıştır. Alt gruplardan CMS1 iyi, CMS4 kötü, CMS2 ve CMS3 orta prognoza sahiptir. Altgruplar; mikrosatellit instabilite ve CpG ada metilasyon fenotipi CMS1 alt grubunda belirgin iken , CMS2 alt grubu, Wnt hedef genlerinin yüksek ekspresyonuna sahip kolorektal kanserleri; CMS3, KRAS mutant tümörleri ve CMS4 ise

yüksek stromal içerikli ve TGF β sinyalleşmesi olan tümörleri büyük oranda barındırır. CMS sınıflamasının ardından aynı konsensüs tarafından tümörler mutasyon yüküne göre değerlendirilmiştir. Özellikle mutasyon oranı yüksek hipermutasyon sayılarına sahip grup ile artmış ve normal mutasyon sayılarına sahip şekilde alt gruplar da oluşturulmuştur. Buradaki belki en önemli nokta mikrosatellit instabilite ile mutasyon yükü arasındaki pozitif korelasyondur. Ancak bu sınıflama tam olarak beklentileri karşılamamaktadır. Özellikle tanımlanan özelliklerin birkaçının ortak olması sınıflamanın gelişmeye devam edeceğinin ve yüksek verimli genomik yaklaşımlarla değişebileceğinin kanıtıdır. Mikrosatellit instabilitesi yüksek tümörlerin erken evre rezeksiyonundan sonra belirgin derecede daha düşük nüks oranlarına sahip olması, metastatik ortamda KRAS mutasyonlarını barındıran tümörlerin EGFR hedefli tedavilere büyük ölçüde dirençli olması gibi örnekler üzerinden düşünüldüğünde genomik çalışmaların temel bilim perspektifi dışında klinik araştırmaların da temel konusu olması gerekliliği ortaya çıkar.

Çeşitli gen grupları ile yapılan çalışmalar; evre 2-3 CRC'in adjuvan tedavisinde prognostik ve prediktif bilgi sağlayabilmek amacıyla geliştirilmiştir. Oncotype-DX colon cancer assay, 7 rekürrens riski ile ilişkilendirdiği geni ve 5 referans geni kullanarak tümör örneklerini rekürrens riski açısından düşük- orta ve yüksek olarak sınıflamaktadır. Testin klinik validasyonu, Quasar ve NSABP C-07 çalışmalarındaki evre 2 ve 3 kolon kanser hastalarında yapılmış; rekürrens skorunun rekürrens, hastalıksız sağ kalım ve genel sağkalım açısından prognostik olduğu gösterilmiş fakat adjuvan tedaviden fayda görecektir grubu predikte edememiştir. Düşük, orta ve yüksek riskli gruplarda 3 yıllık rekürrens sırasıyla %12, %18 ve %22 bulunmuştur. Çok değişkenli analizde rekürrens skorunun TNM evresi, MMR durumu, tümör grade ve değerlendirilen nod sayısından bağımsız olduğu görülmüştür. Coloprint testi ise, prognostik sınıflayıcı olarak 18 gene bakmaktadır, rekürrens riski düşük veya yüksek olarak tanımlanmaktadır. Evre 1-3 CRC li 206 hastada, 5 yıllık hastalıksız sağkalım Coloprint ile düşük ve yüksek riskli tanımlanan hastalarda sırasıyla % 87.6 ve %67.2 olarak bulunmuştur. Özellikle evre 2 subgrupta yüksek ve düşük riskli hastalar arasında rekürrens açısından fark hesaplanabilmiştir.. Coloprint testi de Oncotype-DX gibi tümör evresi, nod durumu ve grade gibi faktörlerden bağımsız olarak rekürrensi predikte edebilmektedir. ColDx mikroarray bazlı multigen analizidir. Evre 2 kolon kanserinde yüksek riskli grubu tanımlamakta kullanılmaktadır. C9581 çalışması hasta kohortu üzerinde yapılan çalışmada ColDx ile yüksek riskli olarak tanımlanan hastalarda hastalıksız sağkalım, düşük riskli tanımlananlardan daha kısa bulunmuştur.

2. AMAÇ

Yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak, tüm ekzom dizileme yöntemi ile elde edilen büyük veri ile hastalığın moleküler patofizyolojisinde etkin olabilecek mekanizmaları; farklı doku örneklerinde ortak varyasyonları tespit ederek, karsinogenez ve metastaz sürecinde primer tümör, tümörün yerleştiği mikroçevre ve metastaz genomik profillerinin rolü yolu ile araştırmak hedeflenmiştir. İkinci çıkarım ise birbirinden farklı genetik profillere sahip hastalarda, aynı hastalığın ortaya çıkmasında bilinen kanserle ilişkilendirilmiş mutasyonların dışında, bu mutasyonların izlendiği genlerin farklı bölgelerinde izlenen farklı fonksiyonlara sahip varyasyonların da varlığını ve olası rolünü tespit etmektir. Bu iki hedef ile varılmak istenen nokta kolorektal kanserin metastatik potansiyelini tahmin edebilecek, hastanın sağ kalım oranlarını iyileştirmeye yardımcı olacak genomik bilgi sağlamaktır.

3. YÖNTEM:

2012 – 2014 yılları arasında Marmara Üniversitesi Pendik EAH’de kolon kanseri tanısı alan 5 hasta aydınlatılmış onamları alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Hastaların tanı sırasında karaciğer metastazı mevcut olan, neoadjuvan kemoterapi/ radyoterapi almamış, aynı seansta hem primer kolon kanseri hem de karaciğer metastazına yönelik eksizyonların yapıldığı ameliyatlar geçirmiş olmaları çalışmaya alınma kriterlerini oluşturmuştur. Hastaların operasyon sırasında eksize edilen kolon ve karaciğer spesimenlerinden patoloğ tarafından örneklenen kolon primer tümörü, kolon tümör mikroçevresi ve karaciğer metastaz dokuları ile bir hastada kolonda tümörden ayrı lokalizasyonda izlenen polip örnekleri taze doku şeklinde -80 buzdolabında saklanmıştır. Tüm doku örnekleri aynı seansta ıslak ve kuru laboratuvar süreçleri aşağıdaki sıra ile uygulanarak yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak dokulardan elde edilen DNA’ların tüm ekzom dizi analizi yapılmıştır.

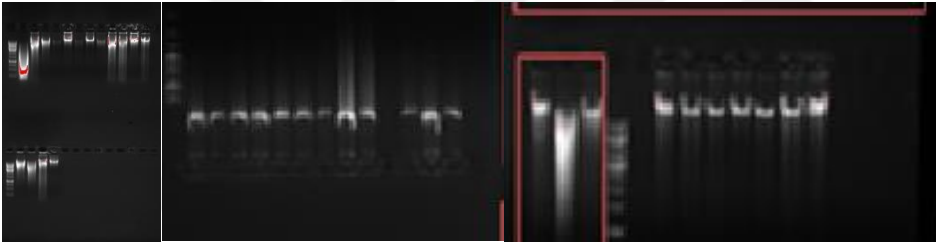
3.1 Kolorektal Kanser Doku Toplanması ve -80 ‘C de saklanması:

Ameliyatlar sırasında uygulanan eksizyon yöntemleri ile çıkarılan karaciğer ve kolon dokuları patoloğ eşliğinde gerekli frozen uygulamaları ile doğrulanarak örneklendi. Hastaların kolon spesimenlerinden cerrahi sınıra yakın tümöral lezyondan en az 5 cm mesafeden örnekler alındı, ve tümör hücresi içermeyen bu dokular normal kolon dokusu olarak etiketlendi. Tümör dokusu örnekleri frozen ile doğrulanarak etiketlendi. Kolon kanseri tanılı tümöral lezyonun sınırda 2 cm lik alanı frozende tümör hücresi içermeyen alanlar örneklenecek mikroçevre olarak etiketlendi. Her örnek farklı ependorflarda toplamda

3 er kopya şeklinde toplandı. Örnekler cerrahi eksizyonu takiben 20 dakika içerisinde yukarıda tariflenen prosedürün ardından -80 derin dondurucuda saklandı.

3.2 Taze Donmuş Dokulardan DNA İzolasyonu Yapılması:

Taze doku örnekleri homojenize edildikten sonra 'Purelink Genomik DNA Kits' kullanılarak manuel DNA izolasyonu yapıldı. Öncelikle hasta doku örneklerinden izole edilen genomik DNA'nın kalite parametreleri belirlendi. Nanodrop spektrometre yardımı ile A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranlarına bakıldı ve tüm örneklerin her iki oranı 1.8 den büyük olarak ölçüldü. Ardından örnekler 1% agaroz jel elektroforez ile koşularak DNA'nın sağlamlığına karar verilir. (Çizim 3.1) Yüksek kaliteli DNA örnekleri tek bir bant halinde görüntülendi ve sonrasında her hasta için kriterleri tamamlayan örnekler seçildi. Etkin olmayan hasta örnekleri çalışma dışı bırakıldı. Yeniden hastaya ait farklı örneklerden yeniden izolasyonlar yapıldı.



Çizim 3.1 DNA izolasyonu sonrası DNA kalite analizleri; %1 Agaroz Jel

3.3 Yeni Nesil Dizileme Adaptörlü Kütüphane hazırlığı:

Örneklerin konsantrasyon ölçümü QUBIT florometre ile yapıldıktan sonra, 1 µg 50 ul olacak şekilde hazırlanan örnekler, DNA Covaris S220 cihazı kullanılarak, ses dalgası teknolojisi ile 300 bp olacak şekilde kırıldı. Kırılan örnekler çalışılacak plate düzenine aktarıldı. Kırmanın ardından T4 DNA polimerase ve T4 polynucleotide kinase blunt end ile DNA uçları tamir edilerek düz bir hale getirildi. Sonrasında uçlarına bir Adenin bazı eklenen fragmentler, Illumina tarafından dizayn edilmiş adaptörler ile ligazlandı ve yine illumina tarafından temin edilen primerler kullanılarak PCR yapıldı. Herbir aşamanın sonunda örnekler protokol gereği Magnetic AMPure XP beads (Beckman Coulter) kullanılarak yıkandı. Bu aşamaya kadarki tüm işlemler laboratuvarında Illumina platformları için KAPA kütüphane hazırlama kiti kullanılarak yapılmıştır. PCR'ın ardından QUBIT florometresi kullanılarak örneklerin miktarı tayin edildi ve 300 ngdan yüksek DNA örnekleri ile yakalama (capture) aşamasına geçildi.

Egzom yakalama:

Herbiri miktarca eşit şekilde hesaplanan örnekler (12 adet, herbiri farklı ve uygun adaptörlü olarak) aynı tüpte birleştirildi. Cot-1 DNA ve custom adapter blocking oligos (IDT) eklenerek uçurma işlemi uygulandı. Tamamen kurutulan örnekli karışım Roche/Nimblegen protokolüne uygun olarak biotinylated DNA problemlerine (Nimblegen SeqCap EZ version 2) tutturularak 47°C de 72 saat boyunca termal cycler’da bekletildi. Sonrasında streptavidin beadleri ile farklı stringencylerdeki solüsyonlar yardımı ile yıkanan karışım, yapılan son bir PCR işleminin ardından tekrar AMPure XP beadler ile temizlenip son haline getirildi. En doğru miktar tayini Realtime PCR ile mümkün olduğundan; kullanılan universal adaptörlere uyumlu KAPA Biosystems’in quantitasyon kiti kullanılarak ViiA™ 7 Real-Time PCR Sistemi kullanılarak miktarı tayini yapıldı. Ayrıca eşzamanlı olarak Bioanalyzer çipli elektroforez sistemde fragmanların uzunluğu ve homojenliği görüntülendi. Havuzdaki kütüphanenin uzunluğu (~400 bp) ve miktarı(≥5 nM) olduğunda dizilemeye alındı. Hazırlanan kütüphane Illumina Hi-seq dizileme cihazı (Çizim 3.2) ile dizilendi. Bu dizileme işlemi sonrası elde edilen ham veriler FASTQ dosya formatında saklandı.



Çizim 3.2 Illumina Hi-seq Dizileme Cihazı

3.4 Biyoinformatik Çalışma Süreci

FASTQ dosyaları tekrar eden dört satırlık sekans bilgilerinden oluşmaktadır. Genel olarak içerisinde okunan sekans ve okuma (read) ile alakalı bazı bilgiler yer almaktadır. Bu dizilerin işlenebilmesi belirli biyoinformatik iş akışı süreçlerinden geçmesi gerekmektedir. Süreç genel hatlarıyla beş aşamada özetlenebilir:

- 1- Okumaların kalite kontrollerinin yapılması ve DNA’ya eklenen adaptörleri okumalar içerisinde ayıklanması
- 2- Okumaların bir referans genoma hizalanması (mapping)
- 3- Hizalanmış okumaların (**BAM** dosyaları) ön işleme adımlarından geçmesi (pre-processing)

- 4- BAM dosyaları üzerinden varyant keşfi yapılması (variant calling)
- 5- Varyant keşfi yapılmış dosyaların (VCF) anlamlandırılması ve raporlanması

Yukarıda bahsedilen aşamalar genel olarak Yeni Nesil Dizileme (YND) verilerinin işlenmesi için standart olarak belirlenmiş bir prosedürdür. Bu aşamalar farklı algoritmalar ve araçlar ile gerçekleştirilebilir. Bütün iş akışı, kullanılan değişik açık kaynak kodların birbirine bağlandığı bir boruhattı (pipeline) kurularak optimize edildi. Python programlama dilinde yazılan bu boruhattına ise gerekli görülen birçok yerde ise Python ve R başta olmak üzere farklı dillerde yazılan kodlar ile eklemeler yapıldı.

DNA kütüphanesi hazırlama aşamasında eklenen adaptörleri ayıklamak için **Fastp** aracı kullanıldı. Daha sonra kalite kontrolü **Fastqc** ile yapılan okumalar, referans genomu (hg38) göre hizalandı. Bu hizalama aşaması için **BWA** ve **Bowtie2** algoritmaları ayrı ayrı kullanılarak iki farklı alternatif oluşturuldu. Oluşan BAM dosyaları, FASTQ dosyalarından farklı olarak okumaların genom üzerinde hizalandığı yeri ve okuma kalite skoru gibi bilgileri de içermektedir. Oluşturulan bu BAM dosyaları ve kullanılan Roche Ekzom dizileme kiti üzerinden kapsam (**coverage**) hesaplanması yapıldı. **Qualimap** aracı ile yapılan bu kapsam analizinde elimizdeki ekzom verisinin ortalama 60x kapsamda olduğu görüldü. (Kapsam, hedeflenen bölgelere ortalama kaç okuma düştüğünü gösterir).

Ön-işleme adımları için ise Broad Institute tarafından sunulan Best-Practice adımları izlendi. Tekrarlı okumaların işaretlenmesi ve baz rekaliibrasyonundan oluşan bu iki adımda yine Broad Institute tarafından geliştirilen **Genome Analysis ToolKit** yardımıyla tamamlandı. Bu aşamaların amacı düşük kalitedeki skorları eleyip, örnek hazırlanması aşamasında oluşabilecek duplikasyonları elimine etmektir.

Ön-işleme adımı sona erdikten sonra, aynı hizalama aşamasında olduğu gibi iki alternatif varyant keşfi algoritması ile varyant keşfi yapıldı. Bu aşamada kullanılan iki algoritma **Mutect2** ve **Varscan2** algoritmalarıdır. Bunlar tümör-normal örnekleri üzerinden çalışan ve somatik varyantları bulmaya yarayan algoritmalarıdır. Bu aşama sonunda VCF dosyası oluşturuldu. Bu dosya mutasyonun lokasyonu, frekansı, genotipi gibi bilgileri içermektedir. Somatik mutasyonlardan ayrı olarak germline mutasyonlar da analiz edildi. Varscan2 algoritması Germline okumaları otomatik ayıklarken, Mutect2 için böyle bir opsiyon bulunmadığı için yine aynı kurum (Broad Institute) tarafından germline-spesifik çalışmalar için geliştirilen **HaplotypeCaller** algoritması ile ayrıca bir de germline varyant keşfi yapıldı.

Oluşturulan VCF dosyalarının anotasyonu ise **Annovar** ile yapıldı. Annovar ile

beraber oluşturulan yeni dosyalarda VCF dosyası içerisinde bulunan bilgilere ek olarak gen ismi, varyantın klinik önemi, mutasyon tipi, ekzonik fonksiyonu gibi bilgiler de eklendi.

İki hizalama, iki de varyant keşfi algoritması ile çalışmalar yapıldığı için toplamda dört farklı kombinasyon ile sonuçlar üretildi. Ancak hastaların tümör örneklerinin yapılarını daha yakından inceleyebilmek için her hasta için tümör örneklerinin varyantlarından oluşan filogenetik ağaç , açık kaynak kodlu **Treomics** aracından yararlanılarak ağaç BWA-VarScan2 ile bulunan sonuçlar üzerinden çıkartıldı. Bu nedenle araştırmada temel olarak BWA-VarScan 2 araçları ile oluşturulan veri esas alınmıştır.

Ayrıca hizalanan okumaların bulunduğu dosyalar (BAM) üzerinden kopya sayısı varyantları tespiti yapılmıştır. Bu amaç içinse **CNVkit** uygulaması kullanılmıştır.

Son olarak bulunan varyantların görselleştirilmesi için ısı haritaları çıkartılmıştır. Bu haritalarda sürücü genler (driver gene) seçilerek hastaların her bir örneğinde bu genlerde mutasyon olup olmadığına bakılmıştır. Ayrıca aynı görsel daha detaylı olarak ise mutasyon frekansları baz alınarak da çıkartılmıştır. Sonrasında ise her hastanın farklı örneklerinin birbirlerine ne kadar benzediğini gösteren bir benzerlik matrisi oluşturulmuştur.

4. BULGULAR

Demografik verileri ve hastalık evreleri açısından benzer olan 2013-2014 yılları arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Kliniği'ne karaciğere metastatik kolorektal kanser hastalığı nedeniyle başvuran neoadjuvan kemoterapi ve radyoterapi almamış beş farklı hastanın ameliyatta çıkartılan spesimeninden eş zamanlı alınmış normal kolon dokusu, kolorektal kanser dokusu, kolon tümör mikroçevresi ve karaciğer metastaz dokusu örneklerine ve ek olarak bir hastadan alınan kolon polip dokusu örneğine tüm ekzom dizileme yöntemi ile mutasyon analizleri yapıldı. Aynı hastaların farklı doku örneklerindeki benzerlik ve özgünlükleri araştırılıp, hastalığın patofizyolojik sürecine moleküler bir bakış açısı ile yaklaşıldı. Çalışmaya alınan hastaların demografik verileri Çizelge 4.1 de, hastalık takip süreçleri Çizelge 4.2 de özetlenmiştir.

Yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak ortalama 60X kapsama ile yapılan ekzom dizileme analizleri sonucunda hastaların farklı dokularındaki varyasyonlar normal dokularda germline, kolon kanseri, kolon kanser dokusu mikroçevresi ve karaciğer metastazı ve bir hastada polip dokusunda somatik varyasyonlar başlıkları altında incelendi. (Çizelge 4.3)

Çizelge 4.1 Hastaların Demografik Verileri

	<i>Hasta1</i>	<i>Hasta2</i>	<i>Hasta3</i>	<i>Hasta4</i>	<i>Hasta7</i>
<i>Doğum tarihi</i>	1955	1942	1942	1939	1940
<i>Tanı Yaşı</i>	58	72	71	74	71
<i>Cinsiyet</i>	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek
<i>Boy(cm)</i>	168	169	174	165	178
<i>Kilo(kg)</i>	74	76	73	69	85
<i>BMI</i>	26.2	26.6	24.1	25.3	26.8
<i>Kan Grubu</i>	A Rh (+)	B Rh (+)	A Rh (+)	A Rh (+)	A Rh (+)
<i>Ameliyat Tarihi</i>	Ekim 2013	Ocak 2014	Aralık 2013	Kasım 2013	Nisan 2012
<i>Ölüm Tarihi</i>	-	1.01.2018	-	5.03.2018	-
<i>Nüks</i>	Yok	Var	Yok	Var	Yok

Çizelge 4.2 Hastaların Hastalık Süreci Bilgileri

<i>Hasta no</i>	<i>Hasta1</i>	<i>Hasta2</i>	<i>Hasta3</i>	<i>Hasta4</i>	<i>Hasta7</i>
<i>Tanı Yaşı</i>	58	72	71	74	71
<i>Cinsiyet</i>	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek
<i>Nüks</i>	Yok	Var	Yok	Var	
<i>Hastaliksız Sağ Kalım (Ay)</i>	Halen	6	Halen	7	Halen
<i>İlk Tanı</i>	Splenik fleksura + KC S 4,5,6,8 metastazı	Sol kolon + Kc S 6,7 metastazı	Sigmoid kolon Kc S 2,5,6,7,8 metastazı	Cekum + KC S 2 metastazı	Sigmoid kolon+ KC S 2,8 metastaz
<i>Adenokarsinom Evre</i>	T3N1aM1	T4aN2bM1	T3N0M1	T3N1aM1	T4aN0M1
<i>CEA Değeri(Tanı Sırasında)</i>	4	3	6	422	2.01
<i>CA19-9(Tanı Sırasında)</i>	9.6	11.19	14.2	28.4	19.13
<i>Pozitiflenf Nodu Sayısı(Patoloji)</i>	1	7	0	1	1
<i>Maksimum Metastaz Çapı(mm)(Patoloji)</i>	96	35	25	42	25
<i>Primer Tm Lokalizasyonu</i>	Sol kolon	Sol kolon	Sigmoid kolon	Sağ kolon+çekum	Sigmoid kolon
<i>Simültane Rezeksiyon Yapıldıysa</i>	Önce kolon	Önce kolon	Önce kolon	Önce kolon	Önce kolon
<i>Yapılan Ameliyat Tipi</i>	Sol hemikolektomi	Sol hemikolektomi	Subtotal kolektomi	Sağ hemikolektomi	Sigmoid kolektomi
<i>ASA skoru</i>	2	2	2	3	2

Çizelge 4.3 Örneklerin Ortalama Kapsam Bilgileri

4.1 GERMLİNE VARYASYONLAR

Örnek Çeşidi	Coverages-Bwa	Coverages-Bowtie2
1.hasta Normal Doku Germline	70,73	70,71
1.hasta Mikroçevre Somatik Analiz	69,8	69,73
1.hasta Tümör Somatik Analiz	60,09	60,08
1.hasta Metastaz Somatik Analiz	59,89	59,87
1.hasta Polip Somatik Analiz	68,86	68,84
2.hasta Normal Germline Analiz	57,6	57,58
2.hasta Mikroçevre Somatik Analiz	68,78	79,95
2.hasta Tümör Somatik Analiz	46,45	46,44
2.hasta Metastaz Somatik Analiz	62,03	62,03
3.hasta Normal Germline Analiz	64,5	64,47
3.hasta Mikroçevre Somatik Analiz	68,22	78,25
3.hasta Tümör Somatik Analiz	59,87	67,63
3.hasta Metastaz Somatik Analiz	48,54	48,46
4.hasta Normal Germline Analiz	51,37	51,36
4.hasta Mikroçevre Somatik Analiz	55,46	55,45
4.hasta Tümör Somatik Analiz	69,82	69,8
4.hasta Metastaz Somatik Analiz	54,27	54,23
5.hasta Normal Germline Analiz	43,06	43,04
5.hasta Mikroçevre Somatik Analiz	70,4	70,39
5.hasta Tümör Somatik Analiz	56,6	56,49
5.hasta Metastaz Somatik Analiz	58,8	58,78

Germline mutasyon analizleri sonucunda 5 hastada toplam 20 milyon varyasyon tespit edildi. Literatürde tanımlanan kanser ile ilişkilendirilmiş 600 geni içerecek şekilde germline tüm ekzom dizileme verisine filtre uygulandı. Ortaya çıkan verinin varyasyon sayısının yüksekliği nedeniyle somatik mutasyonlar içinde tespit edilen genler ve özellikle kanserin moleküler sınıflamasında öncü olan; tümör süpresör, onkogen ve mikrosatellit instabilite ile

İlgili genler germline verisinde sırayla filtreler olarak kullanıldı.

Hastaların somatik verisinde tespit edilen farklı bölgelerinde mutasyonların devam ettiği genlerin filtrelendiği germline veri setinde 5 hastada ortak olarak toplam 955 farklı varyasyonun izlendiği 162 gen tespit edilmiştir. Gnom ve Exac veri tabanlarına göre nadir görülen, allel frekansı 0,05'den küçük **2 varyasyon** tespit edilmiştir. (Çizelge 4.4)

Çizelge 4.4 Germline Nadir İzlenen Ortak Ekzonik Varyasyonlar

GEN	Krozom/Yer/ Değişim	Eksonik,refGene	1. hasta	2. hasta	3. hasta	4. hasta	5. hasta
PRAMEF10	Chr1:12893335 (T)-(G)	Nonsinonim SNV	0/1:371,192:563*	1/1:23,416:439	0/1:565,159:724	0/1:23,218:241	0/1:195,204:399
SLC9B1	Chr4:102901326 (AC)- (...)	Çerçeve kayması	0/1:84,22:106	0/1:163,31:194	0/1:243,26:269	0/1:55,9:64	0/1:173,37:210

Birinci Hasta

Birinci hastaya ait normal kolon dokusu örneği Germline verisine tümör süpresör olarak bilinen (APC, ARID1A, CTNNB1, FBXW7, PTEN, RET, SMAD4, TP53) genleri içeren filtre uygulandığında ilk hastada toplam 91 varyasyon izlendi. Bu varyasyonların 14 tanesi ekzonik varyasyonlardı. (Çizelge 4.5.a) Tespit edilen varyasyonlar çizelge 4.5.b'de özetlenmiştir. Protoonkogen olarak bilinen (BRAF, ERBB2, GNAS, KRAS, NRAS, PIK3CA) genleri içeren filtre ile toplam 51 varyasyon izlendi. Bu varyasyonların 5 tanesi ekzonik varyasyonlardı. (Çizelge 4.6.a) Tespit edilen varyasyonlar çizelge 4.6.b'de özetlenmiştir. Mikrosatellit instabilite ile ilişkilendirilen Uygun DNA Onarım (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) gen filtresi sonucunda toplam 43 varyasyon izlendi. Bu varyasyonların 5 tanesi ekzonik varyasyonlardı. (Çizelge 4.7.a) Tespit edilen varyasyonlar Çizelge 4.7.b'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.5.a Birinci Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyant Çeşitleri

Genler	ekzonik	intronik	splicing	upstream	UTR3	UTR5	Genel Toplam
APC	8	13			2	2	25
ARID1A	2	1				1	4
CTNNB1		2			1		3
FBXW7		5			1		6
PTEN	1	2	1		1		5
RET	2	27		1	4		34
SMAD4		3			1		4
TP53	1	6				3	10
Genel Toplam	14	59	1	1	10	6	91

Çizelge 4.5.b Birinci Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyantları

Kromozom/Lokus	Ref	Değişim	Fonksiyon	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frekans
chr5-112841474-112841474	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6497
chr5-112841059-112841059	T	A	ekzonik	APC	nonsinonim SNV	0,7938
chr5-112840862-112840862	T	G	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6513
chr5-112840859-112840859	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,0045
chr5-112840628-112840628	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6524
chr5-112840073-112840073	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6496
chr5-112839543-112839543	G	C	ekzonik	APC	nonsinonim SNV	0,0043
chr5-112828864-112828864	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6493
chr5-112827541-112827541	-	T	intronik	APC	.	.
chr5-112818834-112818834	-	T	intronik	APC	.	.
chr5-112815854-112815854	G	T	intronik	APC	.	.
chr5-112815623-112815623	A	G	intronik	APC	.	0,0037
chr5-112804799-112804799	A	C	intronik	APC	.	.
chr5-112784317-112784317	C	G	intronik	APC	.	.
chr5-112780681-112780681	T	C	intronik	APC	.	.
chr5-112775373-112775373	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112766096-112766096	C	A	intronik	APC	.	.
chr5-112754780-112754780	T	C	intronik	APC	.	.
chr5-112745165-112745165	-	GTCCAAGAT	intronik	APC	.	.
chr5-112740752-112740752	G	C	intronik	APC	.	.
chr5-112712230-112712230	A	G	intronik	APC	.	.
chr5-112844531-112844531	-	A	UTR3	APC	.	.
chr5-112844504-112844504	-	A	UTR3	APC	.	.
chr5-112707687-112707687	T	G	UTR5	APC	.	0,0883
chr5-112707585-112707585	C	G	UTR5	APC	.	.
chr1-26697162-26697162	C	G	ekzonik	ARID1A	sinonim SNV	0,0003
chr1-26696944-26696944	C	T	ekzonik	ARID1A	sinonim SNV	1E-05
chr1-26710494-26710494	-	ACACACACAC	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26696377-26696377	C	T	UTR5	ARID1A	.	0,0054
chr3-41237949-41237949	A	G	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41233273-41233273	C	A	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41239921-41239921	-	TT	UTR3	CTNNB1	.	.
chr4-152511417-152511417	T	-	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152467281-152467281	T	-	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152434959-152434959	C	-	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152346816-152346816	A	G	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152327994-152327994	T	C	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152322325-152322325	A	-	UTR3	FBXW7	.	.
chr10-87864144-87864144	G	C	ekzonik	PTEN	nonsinonim SNV	.
chr10-87927020-87927020	C	A	intronik	PTEN	.	.
chr10-87884944-87884944	C	A	intronik	PTEN	.	.
chr10-87864104-87864104	T	-	splicing	PTEN	.	.

chr10-87966988-87966988	T	C	UTR3	PTEN	.	.
chr10-43118395-43118395	G	T	ekzonik	RET	sinonim SNV	0,7392
chr10-43100520-43100520	A	G	ekzonik	RET	sinonim SNV	0,7309
chr10-43126264-43126264	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43125103-43125103	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43121656-43121656	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43118782-43118782	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43116778-43116778	C	T	intronik	RET	.	0,2076
chr10-43116417-43116417	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43116260-43116260	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43115007-43115007	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43114918-43114918	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43112312-43112312	C	-	intronik	RET	.	.
chr10-43112308-43112308	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43109502-43109502	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43108942-43108942	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43108700-43108700	A	C	intronik	RET	.	.
chr10-43107564-43107564	C	G	intronik	RET	.	.
chr10-43106301-43106301	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43105416-43105416	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43100390-43100390	T	-	intronik	RET	.	.
chr10-43100389-43100390	TT	-	intronik	RET	.	.
chr10-43100333-43100333	G	T	intronik	RET	.	.
chr10-43099005-43099005	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43092933-43092933	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43090426-43090426	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43088591-43088591	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43084776-43084776	C	A	intronik	RET	.	.
chr10-43084767-43084767	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43081011-43081011	T	G	intronik	RET	.	.
chr10-43077059-43077059	A	G	upstream	RET	.	.
chr10-43129775-43129775	G	A	UTR3	RET	.	.
chr10-43128869-43128869	A	T	UTR3	RET	.	.
chr10-43126920-43126920	T	A	UTR3	RET	.	.
chr10-43126769-43126769	T	C	UTR3	RET	.	0,7909
chr18-51065211-51065211	A	G	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51058485-51058485	-	T	intronik	SMAD4	.	0,1703
chr18-51053276-51053276	G	A	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51079646-51079646	T	C	UTR3	SMAD4	.	.
chr17-7676154-7676154	G	C	ekzonik	TP53	nonsinonim SNV	0,6686
chr17-7676939-7676939	T	-	intronik	TP53	.	.
chr17-7676326-7676341	CCCCAGCCCTCCAGGT	-	intronik	TP53	.	.
chr17-7675519-7675519	A	G	intronik	TP53	.	.
chr17-7674797-7674797	T	C	intronik	TP53	.	0,8634
chr17-7673125-7673125	-	A	intronik	TP53	.	.
chr17-7669739-7669739	G	A	intronik	TP53	.	0,0111

chr17-7676483-7676483	G	C	UTR5	TP53	.	0,6738
chr17-7675394-7675396	TTT	-	UTR5	TP53	.	.
chr17-7675327-7675327	C	T	UTR5	TP53	.	.

Çizelge 4.6.a Birinci Hasta Germline Protoonkogen Varyant Çeşitleri

Genler	exonic	intronic	UTR3	UTR5	Genel Toplam
BRAF		5		5	
ERBB2	2	5		7	
GNAS	2	10		1	13
KRAS		2	11		13
MYC	1			1	
NRAS		3		3	
PIK3CA		9		9	
Genel Toplam	5	34	11	1	51

Çizelge 4.6.b Birinci Hasta Germline Protoonkogen Varyantları

Kromozom/Lokus	Ref	Değişim	Fonksiyon	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frekans
chr7-140795773-140795773	T	C	İntronik	BRAF	.	.
chr7-140763357-140763357	C	T	İntronik	BRAF	.	.
chr7-140762247-140762247	A	G	İntronik	BRAF	.	.
chr7-140758462-140758462	T	-	İntronik	BRAF	.	.
chr7-140734797-140734797	-	A	İntronik	BRAF	.	.
chr17-39727784-39727784	C	G	ekzonik	ERBB2	nonsinonim SNV	0,6118
chr17-39699581-39699581	C	A	Ekzonik	ERBB2	nonsinonim SNV	0,1082
chr17-39723509-39723509	G	A	İntronik	ERBB2	.	0,612
chr17-39720582-39720582	A	G	İntronik	ERBB2	.	.
chr17-39712462-39712462	C	T	İntronik	ERBB2	.	0,6079
chr17-39709752-39709752	C	T	İntronik	ERBB2	.	.
chr17-39705465-39705465	T	C	İntronik	ERBB2	.	.
chr20-58903752-58903752	C	T	Ekzonik	GNAS	sinonim SNV	0,5416
chr20-58853893-58853893	G	C	Ekzonik	GNAS	nonsinonim SNV	0,0013
chr20-58910556-58910556	T	C	İntronik	GNAS	.	.
chr20-58909879-58909879	C	T	İntronik	GNAS	.	.
chr20-58909030-58909030	T	C	İntronik	GNAS	.	.
chr20-58908893-58908893	G	A	İntronik	GNAS	.	.
chr20-58906093-58906093	A	G	İntronik	GNAS	.	.
chr20-58903393-58903393	A	T	İntronik	GNAS	.	.
chr20-58901978-58901978	T	C	İntronik	GNAS	.	.
chr20-58891240-58891240	-	GCCGCC	İntronik	GNAS	.	.
chr20-58859981-58859981	-	AGATA	İntronik	GNAS	.	.
chr20-58855422-58855422	C	G	İntronik	GNAS	.	.
chr20-58889222-58889222	-	CGGCG	UTR5	GNAS	.	0,6772
chr12-25221999-25221999	T	A	İntronik	KRAS	.	.

chr12-25212516-25212516	G	A	İntronik	KRAS	.	.
chr12-25209618-25209618	A	C	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25209531-25209531	G	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25209283-25209283	A	G	UTR3	KRAS	.	0,5799
chr12-25208167-25208167	-	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25208157-25208157	T	C	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206531-25206531	A	-	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206418-25206418	G	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206394-25206394	A	T	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25205894-25205894	T	G	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25205729-25205730	TT	-	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25205716-25205716	A	T	UTR3	KRAS	.	.
chr8-127738955-127738955	G	A	Ekzonik	MYC	sinonim SNV	0,0374
chr1-114714048-114714048	G	A	İntronik	NRAS	.	.
chr1-114711063-114711063	A	G	İntronik	NRAS	.	.
chr1-114709988-114709988	G	C	İntronik	NRAS	.	.
chr3-179226199-179226199	-	ACTTG	İntronik	PIK3CA	.	.
chr3-179224643-179224643	C	G	İntronik	PIK3CA	.	.
chr3-179220959-179220959	A	T	İntronik	PIK3CA	.	0,2148
chr3-179204486-179204486	C	A	İntronik	PIK3CA	.	0,5551
chr3-179201610-179201611	TT	-	İntronik	PIK3CA	.	.
chr3-179201118-179201118	C	T	İntronik	PIK3CA	.	.
chr3-179200057-179200057	A	-	İntronik	PIK3CA	.	.
chr3-179168337-179168337	T	C	İntronik	PIK3CA	.	.
chr3-179152324-179152324	C	G	intronik	PIK3CA	.	.

Çizelge 4.7.a Birinci Hasta Germline Uygunuz DNA Onarım Genleri Varyant Çeşitleri

Genler	ekzonik	intronik	Genel Toplam
MLH1	1	12	13
MSH2		7	7
MSH6	3	16	19
PMS2	1	3	4
Genel Toplam	5	38	43

Çizelge 4.7.b Birinci Hasta Germline Uygunuz DNA Onarım Genleri Varyantları

Kromozom/Lokus	Ref	Değişim	Fonksiyon	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frekans
chr3-37012077-37012077	A	G	Ekzonik	MLH1	nonsinonim SNV	0,2338
chr3-37048783-37048783	C	T	intronik	MLH1	.	.
chr3-37048350-37048350	T	-	İntronik	MLH1	.	.
chr3-37042249-37042249	A	G	İntronik	MLH1	.	0,3711
chr3-37038243-37038243	C	T	İntronik	MLH1	.	.
chr3-37028615-37028615	C	T	İntronik	MLH1	.	.
chr3-37026766-37026766	C	T	İntronik	MLH1	.	.

chr3-37026139-37026139	G	T	İntronik	MLH1	.	.
chr3-37025559-37025559	A	G	İntronik	MLH1	.	.
chr3-37020549-37020549	T	C	İntronik	MLH1	.	.
chr3-37017018-37017018	A	G	İntronik	MLH1	.	.
chr3-37007142-37007142	A	G	İntronik	MLH1	.	.
chr3-36994827-36994827	T	G	İntronik	MLH1	.	.
chr2-47482668-47482668	T	A	İntronik	MSH2	.	.
chr2-47476240-47476240	C	T	İntronik	MSH2	.	.
chr2-47466898-47466898	T	C	İntronik	MSH2	.	.
chr2-47430058-47430058	T	-	İntronik	MSH2	.	.
chr2-47417435-47417435	A	G	İntronik	MSH2	.	.
chr2-47412707-47412707	-	T	İntronik	MSH2	.	.
chr2-47408385-47408385	T	-	İntronik	MSH2	.	0,1433
chr2-47795976-47795976	T	C	Ekzonik	MSH6	sinonim SNV	0,2138
chr2-47790942-47790942	A	G	Ekzonik	MSH6	sinonim SNV	0,1348
chr2-47783419-47783419	C	A	Ekzonik	MSH6	sinonim SNV	0,1439
chr2-47806412-47806412	C	G	İntronik	MSH6	.	0,7333
chr2-47805798-47805798	T	C	İntronik	MSH6	.	.
chr2-47805736-47805739	CTAT	-	İntronik	MSH6	.	0,6841
chr2-47805601-47805601	-	T	İntronik	MSH6	.	0,2939
chr2-47805474-47805474	G	A	İntronik	MSH6	.	.
chr2-47805183-47805183	-	T	İntronik	MSH6	.	.
chr2-47805173-47805173	G	A	İntronik	MSH6	.	.
chr2-47803699-47803699	A	T	İntronik	MSH6	.	0,4111
chr2-47803319-47803319	G	C	İntronik	MSH6	.	.
chr2-47795761-47795761	A	G	İntronik	MSH6	.	.
chr2-47791175-47791175	T	A	İntronik	MSH6	.	.
chr2-47789214-47789214	G	A	İntronik	MSH6	.	.
chr2-47789175-47789175	T	C	İntronik	MSH6	.	.
chr2-47786523-47786523	-	G	İntronik	MSH6	.	.
chr2-47786509-47786509	G	A	İntronik	MSH6	.	.
chr2-47783515-47783515	C	G	İntronik	MSH6	.	0,1362
chr7-5987144-5987144	T	C	Ekzonik	PMS2	nonsinonim SNV	0,8407
chr7-6008103-6008103	C	G	İntronik	PMS2	.	.
chr7-5997427-5997427	A	-	İntronik	PMS2	.	0,431
chr7-5997217-5997217	A	-	intronik	PMS2	.	.

İkinci Hasta

İkinci hastaya ait normal kolon dokusu örneği Germline verisinde tümör süpresör olarak bilinen (APC, ARID1A, CTNNB1, FBXW7, PTEN, RET, SMAD4, TP53) genlerini içeren filtre uygulandığında İkinci hastada toplam 115 varyasyon izlendi. Bu varyasyonların 13 tanesi ekzonik varyasyonlardı (Çizelge 4.8.a) Tespit edilen varyasyonlar Çizelge 4.8.b'de özetlenmiştir. Protoonkogen olarak bilinen (BRAF, ERBB2, GNAS, KRAS, NRAS, PIK3CA) genleri içeren filtre ile toplam 49 varyasyon izlendi. Bu varyasyonların 1 tanesi

ekzonik varyasyondur. (Çizelge 4.9.a). Tespit edilen varyasyonlar Çizelge 4.9.b’de özetlenmiştir. Mikrosatellit instabilite ile ilişkilendirilen Uygunsuz DNA Onarım Genleri (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) gen filtresi sonucunda toplam 80 varyasyon izlendi. Bu varyasyonların 8 tanesi ekzonik varyasyonlardı (Çizelge 4.10.a) Tespit edilen varyasyonlar **Çizelge 4.10.b**’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.8.a İkinci Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyant Çeşitleri

Genler	downstream	ekzonik	intronik	splicing	upstream	UTR3	UTR5	Genel Toplam
APC		7	19			2		28
ARID1A			9			1		10
CTNNB1			8			3		11
FBXW7			13			1	1	15
PTEN		1	1	1		1		4
RET		3	21		1	3		28
SMAD4	1		4					5
TP53		2	10				2	14
Genel Toplam	1	13	85	1	1	11	3	115

Çizelge 4.8.b İkinci Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyantları

Kromozom / Lokasyon	Ref	Değ	Fonk.refGene	Gen .refGene	Ekzonik Fonk.	gnomAD
chr5-112841474-112841474	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,5369
chr5-112841059-112841059	T	A	ekzonik	APC	nonsinonim SNV	0,9595
chr5-112840862-112840862	T	G	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,534
chr5-112840628-112840628	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,5352
chr5-112840073-112840073	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,533
chr5-112828864-112828864	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,5317
chr5-112827157-112827157	T	C	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,1944
chr5-112837409-112837409	-	AGAA	intronik	APC	.	.
chr5-112834661-112834661	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112833030-112833030	T	-	intronik	APC	.	.
chr5-112829165-112829165	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112828541-112828541	C	T	intronik	APC	.	.
chr5-112803037-112803037	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112794389-112794389	C	A	intronik	APC	.	.
chr5-112781076-112781076	A	G	intronik	APC	.	.
chr5-112778075-112778075	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112778063-112778063	T	C	intronik	APC	.	.
chr5-112778038-112778038	C	T	intronik	APC	.	.
chr5-112777830-112777830	A	T	intronik	APC	.	.
chr5-112775613-112775613	A	-	intronik	APC	.	0,2639
chr5-112766096-112766096	C	A	intronik	APC	.	.
chr5-112760097-112760097	C	T	intronik	APC	.	.
chr5-112744185-112744185	T	G	intronik	APC	.	.

chr5-112725751-112725751	C	G	intronik	APC	.	.
chr5-112722713-112722713	C	G	intronik	APC	.	.
chr5-112710134-112710134	T	C	intronik	APC	.	.
chr5-112845224-112845224	T	C	UTR3	APC	.	.
chr5-112844531-112844531	-	A	UTR3	APC	.	.
chr1-26771024-26771024	A	G	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26770420-26770420	G	A	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26767665-26767665	A	G	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26762055-26762055	A	T	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26759058-26759058	A	-	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26755373-26755373	T	G	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26746176-26746176	T	-	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26720875-26720875	-	A	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26718775-26718775	T	A	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26781460-26781460	A	-	UTR3	ARID1A	.	.
chr3-41237949-41237949	A	G	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41235549-41235549	C	T	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41233273-41233273	C	A	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41232837-41232837	G	A	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41232779-41232779	A	T	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41226034-41226034	A	G	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41220953-41220953	T	C	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41204313-41204313	T	C	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41240109-41240109	-	TAAT	UTR3	CTNNB1	.	.
chr3-41239922-41239922	T	A	UTR3	CTNNB1	.	.
chr3-41239897-41239897	T	G	UTR3	CTNNB1	.	.
chr4-152519036-152519036	T	C	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152517181-152517181	C	G	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152513993-152513993	T	C	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152489238-152489238	C	A	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152473837-152473837	G	T	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152473836-152473836	G	A	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152459161-152459161	A	T	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152411948-152411948	T	A	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152346816-152346816	A	G	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152342776-152342776	G	T	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152331387-152331387	G	T	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152330909-152330909	A	G	intronik	FBXW7	.	0,6621
chr4-152327994-152327994	T	C	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152322325-152322329	AAAAA	-	UTR3	FBXW7	.	.
chr4-152535197-152535197	C	T	UTR5	FBXW7	.	.
chr10-87864144-87864144	G	C	eksonik	PTEN	nonsinonim SNV	.
chr10-87961337-87961337	C	T	intronik	PTEN	.	.
chr10-87864104-87864104	T	-	splicing	PTEN	.	.
chr10-87966988-87966988	T	C	UTR3	PTEN	.	.
chr10-43118395-43118395	G	T	eksonik	RET	sinonim.SNV	0,886

chr10-43111239-43111239	A	G	eksonik	RET	sinonim SNV	0,864
chr10-43100520-43100520	A	G	eksonik	RET	sinonim SNV	0,9538
chr10-43118782-43118782	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43116417-43116417	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43116260-43116260	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43115110-43115110	C	T	intronik	RET	.	.
chr10-43115007-43115007	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43113195-43113195	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43112312-43112312	C	-	intronik	RET	.	.
chr10-43112308-43112308	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43109502-43109502	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43108942-43108942	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43106301-43106301	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43105877-43105877	-	C	intronik	RET	.	.
chr10-43105416-43105416	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43096756-43096756	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43096710-43096710	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43092933-43092933	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43091488-43091488	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43088591-43088591	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43087715-43087715	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43087702-43087702	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43081462-43081462	G	T	intronik	RET	.	.
chr10-43076540-43076540	T	C	upstream	RET	.	.
chr10-43129775-43129775	G	A	UTR3	RET	.	.
chr10-43128869-43128869	A	T	UTR3	RET	.	.
chr10-43126769-43126769	T	C	UTR3	RET	.	0,9186
chr18-51085743-51085743	G	T	downstream	SMAD4	.	.
chr18-51066763-51066763	G	A	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51065211-51065211	A	G	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51050279-51050279	A	T	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51046899-51046899	T	-	intronik	SMAD4	.	.
chr17-7676154-7676154	G	C	eksonik	TP53	nonsinonim SNV	0,3788
chr17-7675134-7675134	T	C	eksonik	TP53	nonsinonim SNV	0
chr17-7685993-7685993	G	C	intronik	TP53	.	.
chr17-7677182-7677182	C	T	intronik	TP53	.	.
chr17-7676326-7676341	CCCCAGCCCTCCAGGT	-	intronik	TP53	.	.
chr17-7675519-7675519	A	G	intronik	TP53	.	.
chr17-7674797-7674797	T	C	intronik	TP53	.	0,7139
chr17-7674109-7674109	G	A	intronik	TP53	.	.
chr17-7674089-7674089	A	C	intronik	TP53	.	.
chr17-7673183-7673183	G	A	intronik	TP53	.	0,0095
chr17-7672415-7672415	A	G	intronik	TP53	.	.
chr17-7672246-7672246	T	C	intronik	TP53	.	.
chr17-7676483-7676483	G	C	UTR5	TP53	.	0,5149
chr17-7675327-7675327	C	T	UTR5	TP53	.	.

Çizelge 4.9.a İkinci Hasta Germline Protoonkogen Varyant Çeşitleri

Genler	ekzonik	intronik	UTR3	UTR5	Genel Toplam
BRAF		6			6
ERBB2		2			2
GNAS	1	9	1	1	12
KRAS		11	11		22
NRAS		1	1		2
PIK3CA		5			5
Genel Toplam	1	34	13	1	49

Çizelge 4.9.b İkinci Hasta Germline Protoonkogen Varyantları

Kromozom / Lokasyon	Ref	Değ	Fonk.refGene	Gen .refGene	Ekzonik Fonk.	gnomAD
chr7-140888570-140888570	C	A	intronik	BRAF	.	.
chr7-140878397-140878397	-	A	intronik	BRAF	.	.
chr7-140831365-140831365	G	A	intronik	BRAF	.	.
chr7-140827152-140827152	A	G	intronik	BRAF	.	.
chr7-140805751-140805751	G	T	intronik	BRAF	.	.
chr7-140753138-140753138	A	G	intronik	BRAF	.	.
chr17-39698157-39698157	C	A	intronik	ERBB2	.	.
chr17-39690883-39690883	G	A	intronik	ERBB2	.	.
chr20-58903752-58903752	C	T	ekzonik	GNAS	sinonim SNV	0,5416
chr20-58909308-58909308	G	A	intronik	GNAS	.	0,0168
chr20-58898508-58898508	T	A	intronik	GNAS	.	.
chr20-58895462-58895462	G	A	intronik	GNAS	.	.
chr20-58892182-58892182	C	T	intronik	GNAS	.	.
chr20-58860477-58860477	C	T	intronik	GNAS	.	.
chr20-58859981-58859981	-	AGATA	intronik	GNAS	.	.
chr20-58856110-58856110	T	C	intronik	GNAS	.	.
chr20-58855422-58855422	C	G	intronik	GNAS	.	.
chr20-58852077-58852077	T	C	intronik	GNAS	.	.
chr20-58900136-58900136	A	G	UTR3	GNAS	.	.
chr20-58889222-58889222	-	CGGCG	UTR5	GNAS	.	0,6772
chr12-25245084-25245084	T	A	intronik	KRAS	.	.
chr12-25244768-25244768	C	T	intronik	KRAS	.	.
chr12-25242078-25242078	C	A	intronik	KRAS	.	.
chr12-25236573-25236573	A	G	intronik	KRAS	.	.
chr12-25228419-25228419	C	G	intronik	KRAS	.	.
chr12-25225290-25225290	A	T	intronik	KRAS	.	.
chr12-25221999-25221999	T	A	intronik	KRAS	.	.
chr12-25217525-25217529	TCTTA	-	intronik	KRAS	.	.

chr12-25217492-25217492	C	T	intronik	KRAS	.	.
chr12-25215150-25215150	T	C	intronik	KRAS	.	.
chr12-25214904-25214904	A	C	intronik	KRAS	.	.
chr12-25209618-25209618	A	C	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25209531-25209531	G	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25209283-25209283	A	G	UTR3	KRAS	.	0,5799
chr12-25208167-25208167	-	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25208157-25208157	T	C	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206531-25206531	A	-	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206418-25206418	G	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206394-25206394	A	T	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25205729-25205730	TT	-	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25205716-25205716	A	T	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25205099-25205099	T	A	UTR3	KRAS	.	.
chr1-114714048-114714048	G	A	intronik	NRAS	.	.
chr1-114707684-114707684	-	A	UTR3	NRAS	.	.
chr3-179226199-179226199	-	ACTTG	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179224643-179224643	C	G	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179198731-179198731	T	C	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179195234-179195234	G	A	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179170822-179170822	A	G	intronik	PIK3CA	.	.

Çizelge 4.10.a İkinci Hasta Germline Uygunsuz DNA Onarım Genleri Varyant Çeşitleri

Genler	ekzonik	intronik	UTR5	Genel Toplam
MLH1		16	1	17
MSH2		28		28
MSH6	4	13		17
PMS2	4	14		18
Genel Toplam	8	71	1	80

Çizelge 4.10.b İkinci Hasta Germline Uygunsuz DNA Onarım Genleri Varyantları

Kromozom / Lokasyon	Ref	Değ	Fonk.refGene	Gen .refGene	Ekzonik Fonk.	gnomAD
chr3-37048783-37048783	C	T	intronik	MLH1	.	.
chr3-37048350-37048350	T	-	intronik	MLH1	.	.
chr3-37042249-37042249	A	G	intronik	MLH1	.	0,3711
chr3-37032877-37032877	C	G	intronik	MLH1	.	.
chr3-37028615-37028615	C	T	intronik	MLH1	.	.
chr3-37026841-37026849	AATAATAAT	-	intronik	MLH1	.	.
chr3-37025585-37025590	TATATA	-	intronik	MLH1	.	.
chr3-37025559-37025559	A	G	intronik	MLH1	.	.
chr3-37022237-37022237	G	A	intronik	MLH1	.	.

chr3-37020549-37020549	T	C	intronik	MLH1	.	.
chr3-37018830-37018830	C	T	intronik	MLH1	.	.
chr3-37017018-37017018	A	G	intronik	MLH1	.	.
chr3-37015499-37015499	C	A	intronik	MLH1	.	.
chr3-37014221-37014221	-	GGGA	intronik	MLH1	.	.
chr3-37007142-37007142	A	G	intronik	MLH1	.	.
chr3-37005942-37005942	G	A	intronik	MLH1	.	.
chr3-36993455-36993455	G	A	UTR5	MLH1	.	.
chr2-47476845-47476845	T	G	intronik	MSH2	.	.
chr2-47476240-47476240	C	T	intronik	MSH2	.	.
chr2-47476102-47476102	A	G	intronik	MSH2	.	.
chr2-47474566-47474566	C	T	intronik	MSH2	.	.
chr2-47471245-47471245	G	A	intronik	MSH2	.	.
chr2-47471169-47471169	A	G	intronik	MSH2	.	.
chr2-47466820-47466820	G	A	intronik	MSH2	.	0,3426
chr2-47466567-47466567	G	T	intronik	MSH2	.	.
chr2-47465493-47465493	T	C	intronik	MSH2	.	.
chr2-47463272-47463272	T	C	intronik	MSH2	.	.
chr2-47463269-47463269	A	G	intronik	MSH2	.	.
chr2-47463265-47463265	T	C	intronik	MSH2	.	.
chr2-47461880-47461880	C	T	intronik	MSH2	.	.
chr2-47458571-47458571	C	T	intronik	MSH2	.	.
chr2-47449694-47449694	A	G	intronik	MSH2	.	.
chr2-47445430-47445430	G	A	intronik	MSH2	.	.
chr2-47445336-47445336	T	A	intronik	MSH2	.	.
chr2-47442314-47442321	TATGTATA	-	intronik	MSH2	.	.
chr2-47439253-47439253	T	C	intronik	MSH2	.	.
chr2-47429662-47429662	G	A	intronik	MSH2	.	.
chr2-47425175-47425175	A	C	intronik	MSH2	.	.
chr2-47425000-47425002	CTT	-	intronik	MSH2	.	.
chr2-47422176-47422176	C	G	intronik	MSH2	.	.
chr2-47416608-47416608	T	-	intronik	MSH2	.	.
chr2-47416052-47416052	C	G	intronik	MSH2	.	.
chr2-47408384-47408384	-	T	intronik	MSH2	.	0,1994
chr2-47403500-47403500	T	C	intronik	MSH2	.	.
chr2-47403411-47403411	C	G	intronik	MSH2	.	0,4736
chr2-47800165-47800165	A	G	ekzonik	MSH6	nonsinonim SNV	.
chr2-47795976-47795976	T	C	ekzonik	MSH6	sinonim SNV	0,2138
chr2-47790942-47790942	A	G	ekzonik	MSH6	sinonim SNV	0,1348
chr2-47783419-47783419	C	A	ekzonik	MSH6	sinonim SNV	0,1439
chr2-47806690-47806690	C	G	intronik	MSH6	.	0,0011
chr2-47806412-47806412	C	G	intronik	MSH6	.	0,7333
chr2-47805798-47805798	T	C	intronik	MSH6	.	.
chr2-47805736-47805739	CTAT	-	intronik	MSH6	.	0,6841
chr2-47805602-47805602	T	-	intronik	MSH6	.	0,1034
chr2-47805474-47805474	G	A	intronik	MSH6	.	.

chr2-47803699-47803699	A	T	intronik	MSH6	.	0,4111
chr2-47803319-47803319	G	C	intronik	MSH6	.	.
chr2-47797737-47797737	C	T	intronik	MSH6	.	.
chr2-47795761-47795761	A	G	intronik	MSH6	.	.
chr2-47791175-47791175	T	A	intronik	MSH6	.	.
chr2-47789214-47789214	G	A	intronik	MSH6	.	.
chr2-47789175-47789175	T	C	intronik	MSH6	.	.
chr7-5997349-5997349	G	C	ekzonik	PMS2	sinonim SNV	0,8015
chr7-5987357-5987357	G	A	ekzonik	PMS2	nonsinonim SNV	0,3879
chr7-5987144-5987144	T	C	ekzonik	PMS2	nonsinonim SNV	0,8407
chr7-5986899-5986899	C	T	ekzonik	PMS2	nonsinonim SNV	0,0165
chr7-6005754-6005754	T	C	intronik	PMS2	.	.
chr7-6003481-6003481	C	T	intronik	PMS2	.	.
chr7-6003307-6003308	AT	-	intronik	PMS2	.	.
chr7-6002891-6002891	C	T	intronik	PMS2	.	.
chr7-6002205-6002205	T	A	intronik	PMS2	.	.
chr7-6002187-6002187	G	A	intronik	PMS2	.	.
chr7-6001000-6001000	A	C	intronik	PMS2	.	.
chr7-5999498-5999498	T	C	intronik	PMS2	.	.
chr7-5999091-5999091	T	C	intronik	PMS2	.	0,3684
chr7-5998990-5998990	A	-	intronik	PMS2	.	.
chr7-5997427-5997428	AA	-	intronik	PMS2	.	0,1049
chr7-5995797-5995797	A	C	intronik	PMS2	.	.
chr7-5990117-5990117	C	T	intronik	PMS2	.	.
chr7-5990059-5990059	-	T	intronik	PMS2	.	.

Üçüncü Hasta

Üçüncü hastaya ait normal kolon dokusu örneği Germline verisinde tümör süpresör olarak bilinen (APC, ARID1A, CTNNB1, FBXW7, PTEN, RET, SMAD4, TP53) genlerini içeren filtre uygulandığında Üçüncü hastada toplam 161 varyasyon izlendi. Bu varyasyonların 16 tanesi ekzonik varyasyonlardı. (Çizim 4.11.a) Tespit edilen varyasyonlar Çizelge 4.11.b’de özetlenmiştir. Protoonkogen olarak bilinen (BRAF, ERBB2, GNAS, KRAS, NRAS, PIK3CA) genleri içeren filtre ile toplam 90 varyasyon izlendi. Bu varyasyonların 5 tanesi ekzonik varyasyonlardı.(Çizelge 4.12.a) Tespit edilen varyasyonlar Çizelge 4.12.b’de özetlenmiştir. Mikrosatellit instabilite ile ilişkilendirilen Uygunsuz DNA Onarım Genleri (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) gen filtresi sonucunda toplam 70 varyasyon izlendi. Bu varyasyonların 9 tanesi ekzonik varyasyonlardı. (Çizelge 4.13.a) Tespit edilen varyasyonlar Çizelge 4.13.b’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.11.a Üçüncü Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyant Çeşitleri

Genler	downstream	ekzonik	intronic	splicein	upstream	UTR 3	UTR 5	Genel Toplam
APC		9	40			2		51
ARID1A			5					5
CTNNB1			4			3		7
FBXW7	1		9					10
PTEN		1	3	1		2		7
RET		5	56		1	5		67
SMAD4			8			1		9
TP53		1	3				1	5
Genel Toplam	1	16	128	1	1	13	1	161

Çizelge 4. 11.b Üçüncü Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyantları

Kromozom / Lokasyon	Ref	Değ	Fonk.refGene	Gen .refGene	Ekzonik Fonk.	gnomAD
chr5-112843098-112843098	G	A	ekzonik	APC	nonsinonim SNV	0,02
chr5-112841474-112841474	G	A	ekzonik	APC	Sinonim SNV	0,6497
chr5-112841059-112841059	T	A	ekzonik	APC	nonsinonim SNV	0,7938
chr5-112840862-112840862	T	G	ekzonik	APC	Sinonim SNV	0,6513
chr5-112840628-112840628	G	A	ekzonik	APC	Sinonim SNV V	0,6524
chr5-112840073-112840073	G	A	ekzonik	APC	Sinonim SNV NV	0,6496
chr5-112838980-112838980	T	C	ekzonik	APC	nonsinonim SNV	0,0019
chr5-112828864-112828864	G	A	ekzonik	APC	Sinonim SNV	0,6493
chr5-112827157-112827157	T	C	ekzonik	APC	Sinonim SNV	0,5854
chr5-112837409-112837409	-	AGAA	intronik	APC	.	.
chr5-112831890-112831890	T	C	intronik	APC	.	.
chr5-112829165-112829165	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112828541-112828541	C	T	intronik	APC	.	.
chr5-112818874-112818874	G	C	intronik	APC	.	.
chr5-112818834-112818834	G	T	intronik	APC	.	.
chr5-112817079-112817079	A	T	intronik	APC	.	.
chr5-112815854-112815854	G	T	intronik	APC	.	.
chr5-112811402-112811402	A	G	intronik	APC	.	.
chr5-112803191-112803191	G	C	intronik	APC	.	.
chr5-112797441-112797441	A	G	intronik	APC	.	.
chr5-112794389-112794389	C	A	intronik	APC	.	.
chr5-112783259-112783259	C	T	intronik	APC	.	.
chr5-112781076-112781076	A	G	intronik	APC	.	.
chr5-112778075-112778075	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112778063-112778063	T	C	intronik	APC	.	.
chr5-112778038-112778038	C	T	intronik	APC	.	.

chr5-112777830-112777830	A	T	intronik	APC	.	.
chr5-112776169-112776169	G	C	intronik	APC	.	.
chr5-112775612-112775612	-	A	intronik	APC	.	0,0394
chr5-112775373-112775373	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112766534-112766534	C	G	intronik	APC	.	.
chr5-112766096-112766096	C	A	intronik	APC	.	.
chr5-112764898-112764898	A	C	intronik	APC	.	.
chr5-112763964-112763964	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112760929-112760929	C	T	intronik	APC	.	.
chr5-112745548-112745548	-	TTA	intronik	APC	.	.
chr5-112744185-112744185	T	G	intronik	APC	.	.
chr5-112742073-112742073	A	G	intronik	APC	.	.
chr5-112741750-112741750	T	A	intronik	APC	.	.
chr5-112740752-112740752	G	C	intronik	APC	.	.
chr5-112738572-112738572	A	G	intronik	APC	.	.
chr5-112726977-112726977	A	T	intronik	APC	.	.
chr5-112726541-112726541	G	-	intronik	APC	.	.
chr5-112724927-112724927	T	C	intronik	APC	.	.
chr5-112724724-112724724	G	T	intronik	APC	.	.
chr5-112720663-112720663	G	T	intronik	APC	.	.
chr5-112718389-112718389	C	T	intronik	APC	.	.
chr5-112714425-112714425	A	G	intronik	APC	.	.
chr5-112709435-112709435	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112845224-112845224	T	C	UTR3	APC	.	.
chr5-112844531-112844531	-	A	UTR3	APC	.	.
chr1-26765983-26765983	A	G	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26763539-26763539	A	C	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26753686-26753686	G	C	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26742530-26742530	G	T	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26710494-26710494	-	ACACACACAC	intronik	ARID1A	.	.
chr3-41237949-41237949	A	G	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41235549-41235549	C	T	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41233273-41233273	C	A	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41227661-41227661	A	T	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41240109-41240109	-	TAAT	UTR3	CTNNB1	.	.
chr3-41239922-41239922	T	A	UTR3	CTNNB1	.	.
chr3-41239897-41239897	T	G	UTR3	CTNNB1	.	.
chr4-152320475-152320475	-	TG	downstream	FBXW7	.	.
chr4-152519300-152519303	AAAT	-	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152478539-152478539	T	C	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152449830-152449830	A	G	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152422082-152422082	G	T	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152412788-152412788	A	T	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152392220-152392220	T	C	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152388386-152388386	T	C	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152346816-152346816	A	G	intronik	FBXW7	.	.

chr4-152327994-152327994	T	C	intronik	FBXW7	.	.
chr10-87864144-87864144	G	C	ekzonik	PTEN	nonsynonymous SNV	.
chr10-87961337-87961337	C	T	intronik	PTEN	.	.
chr10-87960877-87960877	T	-	intronik	PTEN	.	0,2756
chr10-87905079-87905079	T	C	intronik	PTEN	.	.
chr10-87864104-87864104	T	-	splicing	PTEN	.	.
chr10-87966988-87966988	T	C	UTR3	PTEN	.	.
chr10-87965537-87965537	T	-	UTR3	PTEN	.	.
chr10-43120185-43120185	C	G	ekzonik	RET	synonymous SNV	0,212
chr10-43118395-43118395	G	T	ekzonik	RET	synonymous SNV	0,7392
chr10-43114671-43114671	G	A	ekzonik	RET	nonsynonymous SNV	0,211
chr10-43111239-43111239	A	G	ekzonik	RET	synonymous SNV	0,6956
chr10-43100520-43100520	A	G	ekzonik	RET	synonymous SNV	0,7309
chr10-43121656-43121656	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43121303-43121303	C	A	intronik	RET	.	.
chr10-43120877-43120877	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43119934-43119934	C	T	intronik	RET	.	.
chr10-43119012-43119012	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43118782-43118782	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43117161-43117161	C	T	intronik	RET	.	.
chr10-43116778-43116778	C	T	intronik	RET	.	0,2076
chr10-43116417-43116417	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43116260-43116260	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43115007-43115007	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43114918-43114918	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43112312-43112312	C	-	intronik	RET	.	.
chr10-43112308-43112308	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43110412-43110412	T	G	intronik	RET	.	.
chr10-43108942-43108942	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43108700-43108700	A	C	intronik	RET	.	.
chr10-43106301-43106301	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43105877-43105877	-	C	intronik	RET	.	.
chr10-43105241-43105241	A	G	intronik	RET	.	0,4288
chr10-43104877-43104877	CC	-	intronik	RET	.	.
chr10-43102747-43102747	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43100859-43100859	G	T	intronik	RET	.	.
chr10-43100731-43100731	G	A	intronik	RET	.	0,2583
chr10-43099746-43099746	C	G	intronik	RET	.	.
chr10-43099169-43099169	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43099097-43099097	C	T	intronik	RET	.	.
chr10-43096756-43096756	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43096710-43096710	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43095955-43095955	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43094065-43094065	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43093608-43093608	G	T	intronik	RET	.	.
chr10-43092981-43092981	C	T	intronik	RET	.	.

chr10-43092933-43092933	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43092865-43092865	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43090441-43090441	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43090426-43090426	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43090173-43090173	T	G	intronik	RET	.	.
chr10-43088968-43088968	C	T	intronik	RET	.	.
chr10-43088808-43088808	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43088144-43088144	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43086825-43086825	A	C	intronik	RET	.	.
chr10-43086472-43086472	C	G	intronik	RET	.	.
chr10-43084567-43084567	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43084144-43084144	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43084088-43084088	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43084082-43084082	C	T	intronik	RET	.	.
chr10-43083331-43083331	A	C	intronik	RET	.	.
chr10-43082992-43082992	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43082605-43082606	CT	-	intronik	RET	.	.
chr10-43081306-43081306	-	TAATAGTAACAA	intronik	RET	.	.
chr10-43080435-43080435	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43080151-43080151	C	T	intronik	RET	.	.
chr10-43077503-43077503	A	C	intronik	RET	.	.
chr10-43077502-43077502	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43077384-43077384	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43076540-43076540	T	C	upstream	RET	.	.
chr10-43129775-43129775	G	A	UTR3	RET	.	.
chr10-43128869-43128869	A	T	UTR3	RET	.	.
chr10-43128657-43128657	G	A	UTR3	RET	.	.
chr10-43126920-43126920	T	A	UTR3	RET	.	.
chr10-43126769-43126769	T	C	UTR3	RET	.	0,7909
chr18-51076041-51076041	G	A	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51068382-51068382	A	G	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51066763-51066763	G	A	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51051972-51051972	T	-	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51049560-51049560	A	-	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51049019-51049019	T	C	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51046270-51046270	C	T	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51039183-51039183	C	T	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51084328-51084332	AAGAA	-	UTR3	SMAD4	.	.
chr17-7676261-7676261	C	T	ekzonik	TP53	synonymous SNV	0,0132
chr17-7673523-7673523	A	G	intronik	TP53	.	0,011
chr17-7671618-7671618	C	T	intronik	TP53	.	.
chr17-7669911-7669911	C	T	intronik	TP53	.	.
chr17-7675322-7675322	A	G	UTR5	TP53	.	.

Çizelge 4.12.a Üçüncü Hasta Germline Protoonkogen Varyant Çeşitleri

Genler	downstream	ekzonik	intronik	UTR3	UTR5	Genel Toplam
BRAF			2			2
ERBB2		3	10			13
GNAS		1	8	1	1	11
KRAS			9	15		24
MYC	1	1	1			3
NRAS			2			2
PIK3CA			33	1	1	35
Genel Toplam	1	5	65	17	2	90

Çizelge 4.12.b Üçüncü Hasta Germline Protoonkogen Varyantları

Kromozom / Lokasyon	Ref	Değ	Fonk.refGene	Gen .refGene	Ekzonik Fonk.	gnomAD
chr7-140844383-140844383	C	A	intronik	BRAF	.	.
chr7-140771960-140771960	T	G	intronik	BRAF	.	.
chr17-39727784-39727784	C	G	ekzonik	ERBB2	nonsinonim SNV	0,6118
chr17-39723335-39723335	A	G	ekzonik	ERBB2	nonsinonim SNV	0,1976
chr17-39723332-39723332	A	G	ekzonik	ERBB2	nonsinonim SNV	0,0049
chr17-39723509-39723509	G	A	intronik	ERBB2	.	0,612
chr17-39721159-39721159	G	A	intronik	ERBB2	.	.
chr17-39720582-39720582	A	G	intronik	ERBB2	.	.
chr17-39717295-39717295	C	A	intronik	ERBB2	.	0,0001
chr17-39712462-39712462	C	T	intronik	ERBB2	.	0,6079
chr17-39709752-39709752	C	T	intronik	ERBB2	.	.
chr17-39702425-39702425	A	G	intronik	ERBB2	.	.
chr17-39696865-39696865	A	G	intronik	ERBB2	.	.
chr17-39696844-39696844	C	T	intronik	ERBB2	.	.
chr17-39696795-39696795	C	T	intronik	ERBB2	.	.
chr20-58903752-58903752	C	T	ekzonik	GNAS	sinonim SNV	0,5416
chr20-58902156-58902156	A	G	intronik	GNAS	.	.
chr20-58902123-58902123	C	-	intronik	GNAS	.	.
chr20-58900528-58900528	G	T	intronik	GNAS	.	.
chr20-58899666-58899667	CA	-	intronik	GNAS	.	.
chr20-58890991-58890991	G	C	intronik	GNAS	.	.
chr20-58890516-58890516	G	A	intronik	GNAS	.	.
chr20-58888938-58888938	C	T	intronik	GNAS	.	.
chr20-58851252-58851252	G	A	intronik	GNAS	.	.
chr20-58900136-58900136	A	G	UTR3	GNAS	.	.
chr20-58889222-58889222	-	CGGCG	UTR5	GNAS	.	0,6772
chr12-25246187-25246187	A	C	intronik	KRAS	.	.
chr12-25241845-25241845	C	T	intronik	KRAS	.	.
chr12-25235356-25235356	G	T	intronik	KRAS	.	.
chr12-25233129-25233129	C	A	intronik	KRAS	.	.

chr12-25228419-25228419	C	G	intronik	KRAS	.	.
chr12-25226703-25226703	T	C	intronik	KRAS	.	.
chr12-25217140-25217140	C	T	intronik	KRAS	.	.
chr12-25215150-25215150	T	C	intronik	KRAS	.	.
chr12-25214735-25214735	G	A	intronik	KRAS	.	.
chr12-25209618-25209618	A	C	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25209531-25209531	G	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25209283-25209283	A	G	UTR3	KRAS	.	0,5799
chr12-25208822-25208822	C	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25208167-25208167	-	AA	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25208167-25208167	-	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25208157-25208157	T	C	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206531-25206531	A	-	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206418-25206418	G	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206394-25206394	A	T	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206035-25206035	T	G	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206009-25206009	T	C	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25205894-25205894	T	G	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25205729-25205730	TT	-	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25205716-25205716	A	T	UTR3	KRAS	.	.
chr8-127742001-127742001	T	C	downstream	MYC	.	.
chr8-127740678-127740678	C	T	ekzonik	MYC	nonsinonim SNV	0,0017
chr8-127738167-127738167	C	G	intronik	MYC	.	.
chr1-114714048-114714048	G	A	intronik	NRAS	.	.
chr1-114711063-114711063	A	G	intronik	NRAS	.	.
chr3-179233891-179233891	A	C	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179233159-179233159	G	A	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179230597-179230597	A	T	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179226199-179226199	-	ACTTG	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179224643-179224643	C	G	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179224482-179224484	TAT	-	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179224480-179224480	T	-	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179220959-179220959	A	T	intronik	PIK3CA	.	0,2148
chr3-179220766-179220766	A	T	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179220089-179220089	A	G	intronik	PIK3CA	.	0,0795
chr3-179218439-179218439	T	G	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179218011-179218011	T	C	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179216278-179216278	C	G	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179210061-179210061	T	-	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179209557-179209557	T	C	intronik	PIK3CA	.	0,0788
chr3-179209361-179209361	T	C	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179207234-179207234	T	C	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179204642-179204642	A	G	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179204486-179204486	C	A	intronik	PIK3CA	.	0,5551
chr3-179204434-179204434	G	T	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179203851-179203851	C	A	intronik	PIK3CA	.	.

chr3-179203465-179203465	-	TAAA	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179203370-179203370	G	A	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179201609-179201609	-	T	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179199300-179199300	-	ATT	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179199217-179199217	A	G	intronik	PIK3CA	.	0,2106
chr3-179186306-179186306	T	A	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179182648-179182648	A	G	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179173529-179173529	A	C	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179171138-179171138	-	AAAATGGA	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179160952-179160952	-	TAGT	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179156067-179156067	C	G	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179154567-179154567	C	T	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179234719-179234719	G	T	UTR3	PIK3CA	.	.
chr3-179148539-179148539	C	T	UTR5	PIK3CA	.	.

Çizelge 4.13.a Üçüncü Hasta Germline Uygunsuz DNA Onarım Genleri Varyant Çeşitleri

Genler	ekzonik	intronik	UTR3	Genel Toplam
MLH1		7		7
MSH2		7		7
MSH6	3	20		23
PMS2	6	26	1	33
Genel Toplam	9	60	1	70

Çizelge 4.13.b Üçüncü Hasta Germline Uygunsuz DNA Onarım Genleri Varyantları

Kromozom / Lokasyon	Ref	Değ	Fonk.refGene	Gen .refGene	Ekzonik Fonk.	gnomAD
chr3-37050400-37050400	G	C	intronik	MLH1	.	.
chr3-37040994-37040994	T	C	intronik	MLH1	.	.
chr3-37023442-37023442	T	C	intronik	MLH1	.	.
chr3-37016321-37016321	C	G	intronik	MLH1	.	.
chr3-37006802-37006802	A	-	intronik	MLH1	.	.
chr3-37005942-37005942	G	A	intronik	MLH1	.	.
chr3-37001343-37001343	C	A	intronik	MLH1	.	.
chr2-47476746-47476746	G	A	intronik	MSH2	.	.
chr2-47476240-47476240	C	T	intronik	MSH2	.	.
chr2-47475312-47475312	-	T	intronik	MSH2	.	0,0456
chr2-47445430-47445430	G	A	intronik	MSH2	.	.
chr2-47429626-47429626	A	T	intronik	MSH2	.	.
chr2-47408384-47408384	-	T	intronik	MSH2	.	0,1994
chr2-47404617-47404617	C	A	intronik	MSH2	.	.
chr2-47795976-47795976	T	C	ekzonik	MSH6	sinonim SNV	0,2138
chr2-47790942-47790942	A	G	ekzonik	MSH6	sinonim SNV	0,1348

chr2-47783419-47783419	C	A	ekzonik	MSH6	sinonim SNV	0,1439
chr2-47806412-47806412	C	G	intronik	MSH6	.	0,7333
chr2-47805798-47805798	T	C	intronik	MSH6	.	.
chr2-47805736-47805739	CTAT	-	intronik	MSH6	.	0,6841
chr2-47805602-47805602	T	-	intronik	MSH6	.	0,1034
chr2-47805474-47805474	G	A	intronik	MSH6	.	.
chr2-47803699-47803699	A	T	intronik	MSH6	.	0,4111
chr2-47803319-47803319	G	C	intronik	MSH6	.	.
chr2-47803038-47803038	C	T	intronik	MSH6	.	.
chr2-47798555-47798555	C	T	intronik	MSH6	.	.
chr2-47797737-47797737	C	T	intronik	MSH6	.	.
chr2-47795761-47795761	A	G	intronik	MSH6	.	.
chr2-47792275-47792275	G	A	intronik	MSH6	.	.
chr2-47791175-47791175	T	A	intronik	MSH6	.	.
chr2-47791155-47791156	TG	-	intronik	MSH6	.	.
chr2-47789214-47789214	G	A	intronik	MSH6	.	.
chr2-47789175-47789175	T	C	intronik	MSH6	.	.
chr2-47785236-47785236	G	C	intronik	MSH6	.	.
chr2-47783952-47783952	G	C	intronik	MSH6	.	.
chr2-47783919-47783919	G	A	intronik	MSH6	.	.
chr2-47783515-47783515	C	G	intronik	MSH6	.	0,1362
chr7-6006003-6006003	T	C	ekzonik	PMS2	nonsinonim SNV	0,0091
chr7-5997349-5997349	G	C	ekzonik	PMS2	sinonim SNV	0,8015
chr7-5987357-5987357	G	A	ekzonik	PMS2	nonsinonim SNV	0,3879
chr7-5987144-5987144	T	C	ekzonik	PMS2	nonsinonim SNV	0,8407
chr7-5973522-5973522	A	G	ekzonik	PMS2	sinonim SNV	0,1109
chr7-5973418-5973418	C	G	ekzonik	PMS2	nonsinonim SNV	0,2856
chr7-6008736-6008736	G	A	intronik	PMS2	.	.
chr7-6008734-6008735	TG	-	intronik	PMS2	.	.
chr7-6008732-6008732	T	-	intronik	PMS2	.	.
chr7-6007088-6007090	ATT	-	intronik	PMS2	.	.
chr7-6005754-6005754	T	C	intronik	PMS2	.	.
chr7-6003481-6003481	C	T	intronik	PMS2	.	.
chr7-6003306-6003306	-	AT	intronik	PMS2	.	.
chr7-6002891-6002891	C	T	intronik	PMS2	.	.
chr7-6002205-6002205	T	A	intronik	PMS2	.	.
chr7-6002187-6002187	G	A	intronik	PMS2	.	.
chr7-6000475-6000475	A	T	intronik	PMS2	.	.
chr7-5999091-5999091	T	C	intronik	PMS2	.	0,3684
chr7-5998990-5998991	AA	-	intronik	PMS2	.	.
chr7-5998945-5998945	A	C	intronik	PMS2	.	.
chr7-5997426-5997426	-	A	intronik	PMS2	.	0,0683
chr7-5997171-5997171	A	G	intronik	PMS2	.	.
chr7-5995797-5995797	A	C	intronik	PMS2	.	.
chr7-5992282-5992282	G	A	intronik	PMS2	.	.
chr7-5990656-5990656	G	A	intronik	PMS2	.	.

chr7-5990117-5990117	C	T	intronik	PMS2	.	.
chr7-5989137-5989137	G	A	intronik	PMS2	.	.
chr7-5988009-5988009	C	T	intronik	PMS2	.	.
chr7-5987677-5987677	C	T	intronik	PMS2	.	.
chr7-5982995-5982995	C	T	intronik	PMS2	.	0,1601
chr7-5978118-5978118	C	T	intronik	PMS2	.	.
chr7-5977892-5977892	A	G	intronik	PMS2	.	.
chr7-5973069-5973069	C	G	UTR3	PMS2	.	.

Dördüncü Hasta

Dördüncü hastaya ait normal kolon dokusu örneği Germline verisinde tümör süpresör olarak bilinen (APC, ARID1A, CTNNB1, FBXW7, PTEN, RET, SMAD4, TP53) genlerini içeren filtre uygulandığında Dördüncü hastada toplam 103 varyasyon izlendi. Bu varyasyonların 18 tanesi ekzonik varyasyonlardı (Çizelge 4.14.a) Tespit edilen varyasyonlar Çizelge 4.14.b’de özetlenmiştir. Protoonkogen olarak bilinen (BRAF, ERBB2, GNAS, KRAS, NRAS, PIK3CA) genleri içeren filtre ile toplam 39 varyasyon izlendi. Bu varyasyonların 1 tanesi ekzonik varyasyonlardı. (Çizelge 4.15.a) Tespit edilen varyasyonlar Çizelge 4.15.b’de özetlenmiştir. Mikrosatellit instabilite ile ilişkilendirilen Uygunsuz DNA Onarım Genleri (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) gen filtresi sonucunda toplam 47 varyasyon izlendi. Bu varyasyonların 2 tanesi ekzonik varyasyonlardı(Çizelge 4.16.a) Tespit edilen varyasyonlar Çizelge 4.16.b’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.14.a Dördüncü Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyant Çeşitleri

Genler	ekzonik	intronik	splicing	UTR3	UTR5	Genel Toplam
APC	8	17		3	2	30
ARID1A	1	1		2		4
CTNNB1	1	2				3
FBXW7		8				8
PTEN	1	4	1			6
RET	5	32		4		41
SMAD4		2		1		3
TP53	2	4			2	8
Genel Toplam	18	70	1	10	4	103

Çizelge 4.14.b Dördüncü Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyantları

Kromozom / Lokasyon	Ref	Değ	Fonk.refGene	Gen .refGene	Ekzonik Fonk.	gnomAD
chr5-112841474-112841474	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6497
chr5-112841059-112841059	T	A	ekzonik	APC	nonsinonim SNV	0,7938
chr5-112840862-112840862	T	G	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6513

chr5-112840628-112840628	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6524
chr5-112840073-112840073	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6496
chr5-112828864-112828864	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6493
chr5-112827157-112827157	T	C	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,5854
chr5-112792494-112792494	C	T	ekzonik	APC	stopgain	.
chr5-112837409-112837409	-	AGAA	intronik	APC	.	.
chr5-112834661-112834661	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112829165-112829165	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112824746-112824766	TCATTAGTATACCAGGCCAAG	-	intronik	APC	.	.
chr5-112822734-112822734	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112818834-112818834	G	T	intronik	APC	.	.
chr5-112815854-112815854	G	T	intronik	APC	.	.
chr5-112808747-112808747	A	T	intronik	APC	.	.
chr5-112794737-112794737	A	C	intronik	APC	.	.
chr5-112790305-112790305	G	T	intronik	APC	.	.
chr5-112781076-112781076	A	G	intronik	APC	.	.
chr5-112775373-112775373	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112766096-112766096	C	A	intronik	APC	.	.
chr5-112764898-112764898	A	C	intronik	APC	.	.
chr5-112760078-112760078	T	A	intronik	APC	.	.
chr5-112726218-112726218	G	C	intronik	APC	.	.
chr5-112711319-112711319	-	AGGCATTAGTTAGATT	intronik	APC	.	.
chr5-112845682-112845682	C	G	UTR3	APC	.	.
chr5-112845224-112845224	T	C	UTR3	APC	.	.
chr5-112844531-112844531	-	A	UTR3	APC	.	.
chr5-112707585-112707585	-	G	UTR5	APC	.	.
chr5-112707585-112707585	C	G	UTR5	APC	.	.
chr1-26773691-26773693	GCA	-	ekzonik	ARID1A	Silinme (ÇK. Yok)	0,0002
chr1-26759058-26759058	A	-	intronik	ARID1A	.	.
chr1-26781160-26781161	AA	-	UTR3	ARID1A	.	.
chr1-26781460-26781460	A	-	UTR3	ARID1A	.	.
chr3-41239325-41239325	T	C	ekzonik	CTNNB1	nonsinonim SNV	.
chr3-41237949-41237949	A	G	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41233273-41233273	C	A	intronik	CTNNB1	.	.
chr4-152530204-152530204	T	G	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152489238-152489238	C	A	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152411948-152411948	T	A	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152347075-152347075	-	A	intronik	FBXW7	.	0,0666
chr4-152346816-152346816	A	G	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152330909-152330909	A	G	intronik	FBXW7	.	0,3733
chr4-152329550-152329550	G	C	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152327994-152327994	T	C	intronik	FBXW7	.	.
chr10-87864144-87864144	G	C	ekzonik	PTEN	nonsinonim SNV	.
chr10-87961150-87961150	T	G	intronik	PTEN	.	0,3726
chr10-87960876-87960876	-	T	intronik	PTEN	.	0,1917
chr10-87931195-87931195	-	TTATC	intronik	PTEN	.	.

chr10-87893929-87893929	A	G	intronik	PTEN	.	.
chr10-87864104-87864104	T	-	splicing	PTEN	.	.
chr10-43120185-43120185	C	G	ekzonik	RET	sinonim SNV	0,212
chr10-43118395-43118395	G	T	ekzonik	RET	sinonim SNV	0,7392
chr10-43114671-43114671	G	A	ekzonik	RET	nonsinonim SNV	0,211
chr10-43111239-43111239	A	G	ekzonik	RET	sinonim SNV	0,6956
chr10-43100520-43100520	A	G	ekzonik	RET	sinonim SNV	0,7309
chr10-43124686-43124686	C	T	intronik	RET	.	.
chr10-43124631-43124631	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43123036-43123036	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43122760-43122760	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43122070-43122070	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43119934-43119934	C	T	intronik	RET	.	.
chr10-43118782-43118782	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43116260-43116260	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43115007-43115007	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43114918-43114918	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43112312-43112312	C	-	intronik	RET	.	.
chr10-43112308-43112308	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43111011-43111011	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43109502-43109502	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43108942-43108942	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43108700-43108700	A	C	intronik	RET	.	.
chr10-43106301-43106301	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43106111-43106111	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43105241-43105241	A	G	intronik	RET	.	0,4288
chr10-43104877-43104878	CC	-	intronik	RET	.	.
chr10-43102747-43102747	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43101640-43101640	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43100859-43100859	G	T	intronik	RET	.	.
chr10-43100731-43100731	G	A	intronik	RET	.	0,2583
chr10-43100388-43100388	-	T	intronik	RET	.	.
chr10-43096756-43096756	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43096541-43096541	G	C	intronik	RET	.	.
chr10-43095609-43095609	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43095453-43095453	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43095420-43095420	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43092865-43092865	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43084567-43084567	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43129775-43129775	G	A	UTR3	RET	.	.
chr10-43128869-43128869	A	T	UTR3	RET	.	.
chr10-43128657-43128657	G	A	UTR3	RET	.	.
chr10-43126769-43126769	T	C	UTR3	RET	.	0,7909
chr18-51066763-51066763	G	A	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51058486-51058486	T	-	intronik	SMAD4	.	0,1576
chr18-51078637-51078637	-	T	UTR3	SMAD4	.	.

chr17-7676154-7676154	G	C	ekzonik	TP53	nonsinonim SNV	0,6686
chr17-7674918-7674918	-	C	ekzonik	TP53	Çerçeve k.	.
chr17-7676326-7676341	CCCCAGCCCTCCAGGT	-	intronik	TP53	.	.
chr17-7674797-7674797	T	C	intronik	TP53	.	0,8634
chr17-7674360-7674360	-	T	intronik	TP53	.	.
chr17-7672246-7672246	T	C	intronik	TP53	.	.
chr17-7676483-7676483	G	C	UTR5	TP53	.	0,6738
chr17-7675327-7675327	C	T	UTR5	TP53	.	.

Çizelge 4.15.a Dördüncü Hasta Germline Protoonkogen Varyant Çeşitleri

Genler	ekzonik	intronik	UTR3	UTR5	Genel Toplam
BRAF		4			4
ERBB2		3			3
GNAS		5	1	1	7
KRAS	1	4	14		19
NRAS		2			2
PIK3CA		4			4
Genel Toplam	1	22	15	1	39

Çizelge 4.15.b Dördüncü Hasta Germline Protoonkogen Varyantları

Kromozom / Lokasyon	Ref	Değ	Fonk.refGene	Gen .refGene	Ekzonik Fonk.	gnomAD
chr7-140924205-140924207	GCC	-	intronik	BRAF	.	.
chr7-140852376-140852376	A	G	intronik	BRAF	.	.
chr7-140747591-140747591	A	G	intronik	BRAF	.	.
chr7-140734797-140734797	-	A	intronik	BRAF	.	.
chr17-39717790-39717790	-	AC	intronik	ERBB2	.	.
chr17-39691880-39691880	T	C	intronik	ERBB2	.	.
chr17-39691867-39691872	ATAGAT	-	intronik	ERBB2	.	.
chr20-58910556-58910556	T	C	intronik	GNAS	.	.
chr20-58908893-58908893	G	A	intronik	GNAS	.	.
chr20-58903884-58903884	G	A	intronik	GNAS	.	.
chr20-58903393-58903393	A	T	intronik	GNAS	.	.
chr20-58894018-58894018	T	C	intronik	GNAS	.	.
chr20-58900136-58900136	A	G	UTR3	GNAS	.	.
chr20-58889222-58889222	-	CGGCG	UTR5	GNAS	.	0,6772
chr12-25209843-25209843	A	G	ekzonik	KRAS	sinonim SNV	0,1906
chr12-25248888-25248888	T	C	intronik	KRAS	.	.
chr12-25233222-25233222	T	C	intronik	KRAS	.	.
chr12-25227137-25227137	T	A	intronik	KRAS	.	.
chr12-25215150-25215150	T	C	intronik	KRAS	.	.

chr12-25209618-25209618	A	C	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25209531-25209531	G	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25209283-25209283	A	G	UTR3	KRAS	.	0,5799
chr12-25208712-25208712	T	C	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25208208-25208208	A	G	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25208167-25208167	-	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25208157-25208157	T	C	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25208140-25208140	G	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206531-25206531	A	-	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206418-25206418	G	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206394-25206394	A	T	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25205729-25205730	TT	-	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25205716-25205716	A	T	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25205484-25205484	T	C	UTR3	KRAS	.	.
chr1-114714048-114714048	G	A	intronik	NRAS	.	.
chr1-114709988-114709988	G	C	intronik	NRAS	.	.
chr3-179226199-179226199	-	ACTTG	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179224643-179224643	C	G	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179204486-179204486	C	A	intronik	PIK3CA	.	0,5551
chr3-179203851-179203851	C	A	intronik	PIK3CA	.	.

Çizelge 4.16.a Dördüncü Hasta Germline Uygunuz DNA Onarım Genleri Varyant Çeşitleri

Satır Etiketleri	ekzonik	intronik	UTR5	Genel Toplam
MLH1	1	12	1	14
MSH2		20		20
MSH6		10		10
PMS2	1	2		3
Genel Toplam	2	44	1	47

Çizelge 4.16.b Dördüncü Hasta Germline Uygunuz DNA Onarım Genleri Varyantları

Kromozom / Lokasyon	Ref	Değ	Fonk.refGene	Gen .refGene	Ekzonik Fonk.	gnomAD
chr3-37012077-37012077	A	G	ekzonik	MLH1	nonsinonim SNV	0,2338
chr3-37048783-37048783	C	T	intronik	MLH1	.	.
chr3-37048350-37048350	T	-	intronik	MLH1	.	.
chr3-37042249-37042249	A	G	intronik	MLH1	.	0,3711
chr3-37028615-37028615	C	T	intronik	MLH1	.	.
chr3-37025559-37025559	A	G	intronik	MLH1	.	.
chr3-37022237-37022237	G	A	intronik	MLH1	.	.

chr3-37020549-37020549	T	C	intronik	MLH1	.	.
chr3-37017018-37017018	A	G	intronik	MLH1	.	.
chr3-37014221-37014221	-	GGGA	intronik	MLH1	.	.
chr3-37014183-37014183	-	GTGGGTGA	intronik	MLH1	.	.
chr3-37007142-37007142	A	G	intronik	MLH1	.	.
chr3-37001469-37001469	A	C	intronik	MLH1	.	.
chr3-36993455-36993455	G	A	UTR5	MLH1	.	.
chr2-47481978-47481978	C	G	intronik	MSH2	.	.
chr2-47481959-47481959	G	T	intronik	MSH2	.	.
chr2-47476888-47476888	G	C	intronik	MSH2	.	.
chr2-47476845-47476845	T	G	intronik	MSH2	.	.
chr2-47476746-47476746	G	A	intronik	MSH2	.	.
chr2-47476240-47476240	C	T	intronik	MSH2	.	.
chr2-47471245-47471245	G	A	intronik	MSH2	.	.
chr2-47471169-47471169	A	G	intronik	MSH2	.	.
chr2-47470579-47470579	G	A	intronik	MSH2	.	.
chr2-47466820-47466820	G	A	intronik	MSH2	.	0,3426
chr2-47466567-47466567	G	T	intronik	MSH2	.	.
chr2-47463272-47463272	T	C	intronik	MSH2	.	.
chr2-47463269-47463269	A	G	intronik	MSH2	.	.
chr2-47463265-47463265	T	C	intronik	MSH2	.	.
chr2-47429662-47429662	G	A	intronik	MSH2	.	.
chr2-47416052-47416052	C	G	intronik	MSH2	.	.
chr2-47407997-47407997	T	G	intronik	MSH2	.	.
chr2-47407996-47407996	A	G	intronik	MSH2	.	.
chr2-47403500-47403500	T	C	intronik	MSH2	.	.
chr2-47403411-47403411	C	G	intronik	MSH2	.	0,4736
chr2-47806412-47806412	C	G	intronik	MSH6	.	0,7333
chr2-47805798-47805798	T	C	intronik	MSH6	.	.
chr2-47805736-47805739	CTAT	-	intronik	MSH6	.	0,6841
chr2-47805602-47805602	T	-	intronik	MSH6	.	0,1034
chr2-47805474-47805474	G	A	intronik	MSH6	.	.
chr2-47805173-47805173	G	A	intronik	MSH6	.	.
chr2-47803699-47803699	A	T	intronik	MSH6	.	0,4111
chr2-47803319-47803319	G	C	intronik	MSH6	.	.
chr2-47795761-47795761	A	G	intronik	MSH6	.	.
chr2-47789832-47789832	T	-	intronik	MSH6	.	.
chr7-5987144-5987144	T	C	ekzonik	PMS2	nonsinonim SNV	0,8407
chr7-6002205-6002205	T	A	intronik	PMS2	.	.
chr7-5998989-5998989	-	A	intronik	PMS2	.	.

Beşinci Hasta

Beşinci hastaya ait normal kolon dokusu örneği Germline verisinde tümör süpresör olarak bilinen (APC, ARID1A, CTNNB1, FBXW7, PTEN, RET, SMAD4, TP53) genlerini içeren filtre uygulandığında Beşinci hastada toplam 141 varyasyon izlendi. Bu

varyasyonların 15 tanesi ekzonik varyasyonlardı. (Çizelge 4.17.a) Tespit edilen varyasyonlar Çizelge 4.17.b’de özetlenmiştir. Protoonkogen olarak bilinen (BRAF, ERBB2, GNAS, KRAS, NRAS, PIK3CA) genleri içeren filtre ile toplam 69 varyasyon izlendi. Bu varyasyonların 3 tanesi ekzonik varyasyonlardı.(Çizelge 4.18.a) Tespit edilen varyasyonlar Çizelge 4.18.b’de özetlenmiştir. Mikrosatellit instabilite ile ilişkilendirilen Uygunsuz DNA Onarım Genleri (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) gen filtresi sonucunda toplam 56 varyasyon izlendi. Bu varyasyonların 4 tanesi ekzonik varyasyonlardı.(Çizelge 4.19.a) Tespit edilen varyasyonlar Çizelge 4.19.b’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.17.a Beşinci Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyant Çeşitleri

Genler	downstream	ekzonik	introni	splicin	UTR 3	UTR 5	Genel Toplam
APC		7	21		2		30
ARID1A			11		3		14
CTNNB1			3				3
FBXW7			13				13
PTEN		1	5	1	1		8
RET		5	43		7		55
SMAD4			11				11
TP53	2	2	2			1	7
Genel Toplam	2	15	109	1	13	1	141

Çizelge 4.17.b Beşinci Hasta Germline Tümör Süpresör Gen Varyantları

Kromozom / Lokasyon	Ref	Değ	Fonk.refGene	Gen .refGene	Ekzonik Fonk.	gnomAD
chr1-26699449-26699449	C	G	intronic	ARID1A	.	.
chr1-26701730-26701730	A	G	intronic	ARID1A	.	.
chr1-26702773-26702773	T	C	intronic	ARID1A	.	.
chr1-26723990-26723990	C	T	intronic	ARID1A	.	.
chr1-26731130-26731130	A	C	intronic	ARID1A	.	0,0588
chr1-26746571-26746571	G	T	intronic	ARID1A	.	.
chr1-26757067-26757067	G	T	intronic	ARID1A	.	.
chr1-26759058-26759058	A	-	intronic	ARID1A	.	.
chr1-26759071-26759071	T	C	intronic	ARID1A	.	.
chr1-26767665-26767665	A	G	intronic	ARID1A	.	.
chr1-26771828-26771828	G	A	intronic	ARID1A	.	.
chr1-26781460-26781460	A	-	UTR3	ARID1A	.	.
chr1-26781648-26781648	A	T	UTR3	ARID1A	.	.
chr1-26781754-26781754	T	C	UTR3	ARID1A	.	.
chr3-41213867-41213867	T	G	intronic	CTNNB1	.	.

chr3-41220488-41220488	A	G	intronik	CTNNB1	.	.
chr3-41233273-41233273	C	A	intronik	CTNNB1	.	.
chr4-152327994-152327994	T	C	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152342129-152342129	C	G	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152346816-152346816	A	G	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152349812-152349812	A	G	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152378024-152378024	C	A	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152425646-152425646	G	A	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152458001-152458001	T	-	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152483400-152483400	A	-	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152495446-152495446	-	A	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152504639-152504639	G	A	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152509951-152509951	C	-	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152516998-152516998	G	T	intronik	FBXW7	.	.
chr4-152521747-152521747	G	T	intronik	FBXW7	.	.
chr5-112722076-112722076	G	T	intronik	APC	.	.
chr5-112726977-112726977	A	T	intronik	APC	.	.
chr5-112726988-112726988	C	T	intronik	APC	.	.
chr5-112731445-112731445	C	T	intronik	APC	.	.
chr5-112746227-112746227	A	G	intronik	APC	.	.
chr5-112754047-112754047	T	C	intronik	APC	.	.
chr5-112758258-112758258	A	G	intronik	APC	.	.
chr5-112766096-112766096	C	A	intronik	APC	.	.
chr5-112767494-112767497	ACTT	-	intronik	APC	.	.
chr5-112775613-112775613	A	-	intronik	APC	.	0,2456
chr5-112777830-112777830	A	T	intronik	APC	.	.
chr5-112778038-112778038	C	T	intronik	APC	.	.
chr5-112778063-112778063	T	C	intronik	APC	.	.
chr5-112778075-112778075	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112781076-112781076	A	G	intronik	APC	.	.
chr5-112800832-112800832	C	A	intronik	APC	.	.
chr5-112823750-112823750	A	T	intronik	APC	.	.
chr5-112823773-112823773	A	G	intronik	APC	.	.
chr5-112823865-112823865	A	G	intronik	APC	.	.
chr5-112827157-112827157	T	C	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,5854
chr5-112828864-112828864	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6493
chr5-112829165-112829165	G	A	intronik	APC	.	.
chr5-112837409-112837409	-	AGAA	intronik	APC	.	.
chr5-112840073-112840073	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6496
chr5-112840628-112840628	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6524
chr5-112840862-112840862	T	G	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6513
chr5-112841059-112841059	T	A	ekzonik	APC	nonsinonim SNV	0,7938
chr5-112841474-112841474	G	A	ekzonik	APC	sinonim SNV	0,6497
chr5-112844531-112844531	-	A	UTR3	APC	.	.
chr5-112845224-112845224	T	C	UTR3	APC	.	.
chr10-43077502-43077503	AA	-	intronik	RET	.	.

chr10-43077503-43077503	-	GCGGGCGGC	intronik	RET	.	.
chr10-43077951-43077951	A	C	intronik	RET	.	.
chr10-43078110-43078110	C	T	intronik	RET	.	.
chr10-43080224-43080224	C	G	intronik	RET	.	.
chr10-43080773-43080773	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43081462-43081462	G	T	intronik	RET	.	.
chr10-43082425-43082425	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43082605-43082606	CT	-	intronik	RET	.	.
chr10-43083331-43083331	A	C	intronik	RET	.	.
chr10-43083625-43083625	C	T	intronik	RET	.	.
chr10-43084767-43084767	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43084776-43084776	C	A	intronik	RET	.	.
chr10-43085728-43085728	-	CTCCCTGGGCATCCC	intronik	RET	.	.
chr10-43087702-43087702	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43090173-43090173	T	G	intronik	RET	.	.
chr10-43090426-43090426	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43090441-43090441	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43092865-43092865	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43092933-43092933	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43092981-43092981	C	T	intronik	RET	.	.
chr10-43093470-43093470	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43095143-43095143	T	A	intronik	RET	.	.
chr10-43095420-43095420	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43095453-43095453	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43095955-43095955	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43100520-43100520	A	G	ekzonik	RET	sinonim SNV	0,7309
chr10-43100731-43100731	G	A	intronik	RET	.	0,2583
chr10-43102747-43102747	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43104877-43104878	CC	-	intronik	RET	.	.
chr10-43105241-43105241	A	G	intronik	RET	.	0,4288
chr10-43105967-43105967	G	C	intronik	RET	.	.
chr10-43106245-43106245	C	G	intronik	RET	.	.
chr10-43106301-43106301	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43108942-43108942	A	T	intronik	RET	.	.
chr10-43109944-43109944	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43110138-43110138	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43111239-43111239	A	G	ekzonik	RET	sinonim SNV	0,6956
chr10-43112308-43112308	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43112312-43112312	C	-	intronik	RET	.	.
chr10-43114671-43114671	G	A	ekzonik	RET	nonsinonim SNV	0,211
chr10-43116260-43116260	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43116417-43116417	T	C	intronik	RET	.	.
chr10-43118395-43118395	G	T	ekzonik	RET	sinonim SNV	0,7392
chr10-43119012-43119012	G	A	intronik	RET	.	.
chr10-43120057-43120057	G	A	intronik	RET	.	0,2041
chr10-43120185-43120185	C	G	ekzonik	RET	sinonim SNV	0,212

chr10-43125654-43125654	A	G	intronik	RET	.	.
chr10-43126769-43126769	T	C	UTR3	RET	.	0,7909
chr10-43126920-43126920	T	A	UTR3	RET	.	.
chr10-43128364-43128364	C	T	UTR3	RET	.	.
chr10-43128657-43128657	G	A	UTR3	RET	.	.
chr10-43128869-43128869	A	T	UTR3	RET	.	.
chr10-43129385-43129385	T	C	UTR3	RET	.	.
chr10-43129775-43129775	G	A	UTR3	RET	.	.
chr10-87864104-87864104	T	-	splicing	PTEN	.	.
chr10-87864144-87864144	G	C	ekzonik	PTEN	nonsinonim SNV	.
chr10-87875390-87875390	T	C	intronik	PTEN	.	.
chr10-87929613-87929613	C	A	intronik	PTEN	.	.
chr10-87942808-87942808	A	-	intronik	PTEN	.	.
chr10-87961337-87961337	C	T	intronik	PTEN	.	.
chr10-87964859-87964859	C	T	intronik	PTEN	.	.
chr10-87966988-87966988	T	C	UTR3	PTEN	.	.
chr17-7667611-7667611	C	T	downstream	TP53	.	.
chr17-7667612-7667612	A	G	downstream	TP53	.	.
chr17-7674797-7674797	T	C	intronik	TP53	.	0,8634
chr17-7674892-7674892	T	C	ekzonik	TP53	sinonim SNV	0,0126
chr17-7676154-7676154	G	C	ekzonik	TP53	nonsinonim SNV	0,6686
chr17-7676326-7676341	CCCCAGCCCTCCAGGT	-	intronik	TP53	.	.
chr17-7676483-7676483	G	C	UTR5	TP53	.	0,6738
chr18-51042601-51042601	G	-	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51044060-51044060	C	A	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51044202-51044202	T	A	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51046270-51046270	C	T	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51048118-51048118	A	T	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51049019-51049019	T	C	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51055530-51055530	-	A	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51055548-51055548	C	T	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51059814-51059814	A	G	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51059974-51059974	C	T	intronik	SMAD4	.	.
chr18-51062037-51062037	C	T	intronik	SMAD4	.	.

Çizelge 4.18.a Beşinci Hasta Germline Protoonkogen Varyant Çeşitleri

Genler	ekzonik	intronik	upstream	UTR3	UTR5	Genel Toplam
BRAF	1	15	1			17
ERBB2	1	3				4
GNAS	1	10				11
KRAS		7		13		20
MYC			1		2	3
NRAS		3				3
PIK3CA		9		2		11
Genel Toplam	3	47	2	15	2	69

Çizelge 4.18.b Beşinci Hasta Germline Protoonkogen Varyantları

Kromozom / Lokasyon	Ref	Değ	Fonk.refGene	Gen .refGene	Ekzonik Fonk.	gnomAD
chr1-114714048-114714048	G	A	intronik	NRAS	.	.
chr1-114714588-114714588	C	A	intronik	NRAS	.	.
chr1-114714900-114714900	C	T	intronik	NRAS	.	.
chr3-179148620-179148620	C	T	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179148649-179148649	G	T	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179166549-179166549	C	T	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179203851-179203851	C	A	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179204486-179204486	C	A	intronik	PIK3CA	.	0,5551
chr3-179204642-179204642	A	G	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179204894-179204894	A	G	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179224643-179224643	C	G	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179226199-179226199	-	ACTTG	intronik	PIK3CA	.	.
chr3-179238818-179238818	A	T	UTR3	PIK3CA	.	.
chr3-179240073-179240073	-	A	UTR3	PIK3CA	.	0,0625
chr7-140749271-140749271	C	G	intronik	BRAF	.	0,1985
chr7-140749350-140749350	T	C	ekzonik	BRAF	sinonim SNV	0,2012
chr7-140766435-140766437	ATA	-	intronik	BRAF	.	.
chr7-140766503-140766504	CA	-	intronik	BRAF	.	.
chr7-140785535-140785535	T	C	intronik	BRAF	.	.
chr7-140785890-140785890	C	T	intronik	BRAF	.	.
chr7-140787402-140787402	C	T	intronik	BRAF	.	.
chr7-140804215-140804215	T	-	intronik	BRAF	.	.
chr7-140808453-140808453	-	T	intronik	BRAF	.	.
chr7-140810123-140810123	A	G	intronik	BRAF	.	.
chr7-140834467-140834467	C	T	intronik	BRAF	.	.
chr7-140852376-140852376	A	G	intronik	BRAF	.	.
chr7-140862737-140862737	T	A	intronik	BRAF	.	.
chr7-140867652-140867652	G	A	intronik	BRAF	.	.
chr7-140872683-140872683	C	T	intronik	BRAF	.	.
chr7-140878270-140878270	C	A	intronik	BRAF	.	.
chr7-140924775-140924780	GGAGGC	-	upstream	BRAF	.	.
chr8-127735707-127735707	G	T	upstream	MYC	.	.
chr8-127736197-127736197	C	A	UTR5	MYC	.	.
chr8-127736198-127736198	T	A	UTR5	MYC	.	.
chr12-25205716-25205716	A	T	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25205729-25205730	TT	-	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206009-25206009	T	C	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206035-25206035	T	G	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206394-25206394	A	T	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206418-25206418	G	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25206531-25206531	A	-	UTR3	KRAS	.	.

chr12-25207204-25207204	T	C	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25208157-25208157	T	C	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25208167-25208167	-	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25209283-25209283	A	G	UTR3	KRAS	.	0,5799
chr12-25209531-25209531	G	A	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25209618-25209618	A	C	UTR3	KRAS	.	.
chr12-25215660-25215660	T	-	intronik	KRAS	.	.
chr12-25216683-25216683	A	G	intronik	KRAS	.	.
chr12-25228380-25228380	A	-	intronik	KRAS	.	.
chr12-25228419-25228419	C	G	intronik	KRAS	.	.
chr12-25232529-25232529	A	T	intronik	KRAS	.	.
chr12-25236573-25236573	A	G	intronik	KRAS	.	.
chr12-25240151-25240151	C	T	intronik	KRAS	.	.
chr17-39712462-39712462	C	T	intronik	ERBB2	.	0,6079
chr17-39720104-39720104	G	T	intronik	ERBB2	.	.
chr17-39723509-39723509	G	A	intronik	ERBB2	.	0,612
chr17-39727784-39727784	C	G	ekzonik	ERBB2	nonsinonim SNV	0,6118
chr20-58888938-58888938	C	T	intronik	GNAS	.	.
chr20-58890810-58890811	GT	-	intronik	GNAS	.	.
chr20-58896497-58896497	G	A	intronik	GNAS	.	.
chr20-58899666-58899667	CA	-	intronik	GNAS	.	.
chr20-58902123-58902123	C	-	intronik	GNAS	.	.
chr20-58903752-58903752	C	T	ekzonik	GNAS	sinonim SNV	0,5416
chr20-58906093-58906093	A	G	intronik	GNAS	.	.
chr20-58906532-58906532	C	G	intronik	GNAS	.	.
chr20-58908893-58908893	G	A	intronik	GNAS	.	.
chr20-58909879-58909879	C	T	intronik	GNAS	.	.
chr20-58910556-58910556	T	C	intronik	GNAS	.	.

Çizelge 4.19.a Beşinci Hasta Germline Uygunuz DNA Onarım Genleri Varyant Çeşitleri

Genler	ekzonik	intronik	UTR5	Genel Toplam
MLH1		1	1	2
MSH2		20		20
MSH6	1	8		9
PMS2	3	22		25
Genel Toplam	4	51	1	56

Çizelge 4.19.b Beşinci Hasta Germline Uygunsuz DNA Onarım Genleri Varyantları

Kromozom / Lokasyon	Ref	Değ	Fonk.refGene	Gen .refGene	Ekzonik Fonk.	gnomAD
chr2-47403411-47403411	C	G	intronic	MSH2	.	0,4736
chr2-47412707-47412707	-	TT	intronic	MSH2	.	.
chr2-47416052-47416052	C	G	intronic	MSH2	.	.
chr2-47429662-47429662	G	A	intronic	MSH2	.	.
chr2-47430053-47430053	-	T	intronic	MSH2	.	.
chr2-47430057-47430057	C	T	intronic	MSH2	.	.
chr2-47439495-47439495	A	G	intronic	MSH2	.	.
chr2-47445430-47445430	G	A	intronic	MSH2	.	.
chr2-47455672-47455672	A	G	intronic	MSH2	.	.
chr2-47463265-47463265	T	C	intronic	MSH2	.	.
chr2-47463269-47463269	A	G	intronic	MSH2	.	.
chr2-47463272-47463272	T	C	intronic	MSH2	.	.
chr2-47465142-47465142	C	T	intronic	MSH2	.	.
chr2-47466567-47466567	G	T	intronic	MSH2	.	.
chr2-47466820-47466820	G	A	intronic	MSH2	.	0,3426
chr2-47471169-47471169	A	G	intronic	MSH2	.	.
chr2-47471245-47471245	G	A	intronic	MSH2	.	.
chr2-47476240-47476240	C	T	intronic	MSH2	.	.
chr2-47476361-47476361	T	C	intronic	MSH2	.	0,1147
chr2-47482565-47482565	T	C	intronic	MSH2	.	.
chr2-47786016-47786016	C	A	intronic	MSH6	.	.
chr2-47795761-47795761	A	G	intronic	MSH6	.	.
chr2-47803319-47803319	G	C	intronic	MSH6	.	.
chr2-47803507-47803507	C	G	ekzonik	MSH6	nonsinonim SNV	4,47E-05
chr2-47803699-47803699	A	T	intronic	MSH6	.	0,4111
chr2-47805474-47805474	G	A	intronic	MSH6	.	.
chr2-47805736-47805739	CTAT	-	intronic	MSH6	.	0,6841
chr2-47805798-47805798	T	C	intronic	MSH6	.	.
chr2-47806412-47806412	C	G	intronic	MSH6	.	0,7333
chr3-36993455-36993455	G	A	UTR5	MLH1	.	.
chr3-37032810-37032810	G	T	intronic	MLH1	.	.
chr7-5976478-5976478	A	G	intronic	PMS2	.	.
chr7-5977892-5977892	A	G	intronic	PMS2	.	.
chr7-5984785-5984785	-	A	intronic	PMS2	.	.
chr7-5987144-5987144	T	C	ekzonik	PMS2	nonsinonim SNV	0,8407
chr7-5987357-5987357	G	A	ekzonik	PMS2	nonsinonim SNV	0,3879
chr7-5990059-5990059	-	T	intronic	PMS2	.	.
chr7-5990117-5990117	C	T	intronic	PMS2	.	.
chr7-5991393-5991393	A	-	intronic	PMS2	.	.
chr7-5995797-5995797	A	C	intronic	PMS2	.	.
chr7-5997349-5997349	G	C	ekzonik	PMS2	sinonim SNV	0,8015
chr7-5998529-5998529	C	T	intronic	PMS2	.	.
chr7-5998990-5998990	A	-	intronic	PMS2	.	.

chr7-5999091-5999091	T	C	intronik	PMS2	.	0,3684
chr7-5999498-5999498	T	C	intronik	PMS2	.	.
chr7-6002187-6002187	G	A	intronik	PMS2	.	.
chr7-6002205-6002205	T	A	intronik	PMS2	.	.
chr7-6002891-6002891	C	T	intronik	PMS2	.	.
chr7-6003004-6003004	A	G	intronik	PMS2	.	.
chr7-6003307-6003308	AT	-	intronik	PMS2	.	.
chr7-6003426-6003426	A	G	intronik	PMS2	.	.
chr7-6003481-6003481	C	T	intronik	PMS2	.	.
chr7-6003864-6003864	T	C	intronik	PMS2	.	.
chr7-6004334-6004335	TG	-	intronik	PMS2	.	.
chr7-6004884-6004884	C	T	intronik	PMS2	.	.
chr7-6005754-6005754	T	C	intronik	PMS2	.	.

4.2 SOMATİK VARYASYONLAR:

Somatik varyasyon analizleri sonucunda 5 hastada izlenen toplam somatik varyasyon sayısı 252282'dir. Bunların 224586'sı Tek Nükleotid Varyasyonu (SNV) iken, 27696 tanesi silinme ve eklenmelerden meydana gelen İNDEL (Insertion/Deletion) varyasyondan meydana gelmektedir. Tüm varyasyonlar, genomda görülme yerleri, ve sebep oldukları mutasyon çeşitleri itibari ile Çizelge 4.20 'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.20 Tüm Somatik Varyasyonlar

ÖRNEKLER	1TM	1MÇ	1MET	1P	2MET	2MÇ	3T	3MÇ	4TM	4MÇ	2TM	3MET	5MÇ	5TM	5MET	4MET
TOPLAM VARYANT	8652	8977	9022	8283	7569	6680	6801	7187	54260	44348	4786	4876	3870	4099	3624	41552
EKSONİK NONSİNÖNİM SNV	289	463	404	359	461	246	317	377	4406	4370	378	348	158	273	172	4305
EKSONİK STOPGAİN	13	29	27	19	36	19	24	25	55	54	17	17	2	10	2	65
EKSONİK STOPLOSS	2		1		1		1	1	6	5		1		1		5
EKSONİK SİNÖNİM SNV	130	192	162	149	159	92	144	172	4361	4258	136	160	84	106	80	4155
EKSONİK BİLİNMEYEN	13	13	13	13	14	9	11	20	93	111	5	11	20	25	19	100
UTR3	542	606	597	559	533	446	507	544	3483	3043	324	323	219	262	242	2921
UTR5	146	155	147	122	67	53	59	62	1069	726	48	67	42	33	31	689
UTR5; UTR3			1	1		1	1		1	1		1				1
DOWNSTREAM	87	109	98	108	76	58	72	82	553	430	42	70	45	49	41	404
TOPLAM EKSONİK	447	697	606	540	671	366	497	595	8913	8791	536	537	264	415	272	8623
EKSONİK SPLİCİNG			1						8	7						7
INTERGENİK	2687	2162	2575	1945	2382	2376	1967	2021	6942	6080	1392	1478	1441	1311	1259	5223
İNTRONİK	4017	4476	4329	4296	3227	2872	3171	3307	28356	21274	2021	1981	1485	1590	1432	19901
NCRNA_EKSONİK	155	162	156	170	143	138	136	147	1425	1280	103	81	78	96	67	1245
NCRNA_EKSONİK; SPLİCİNG	1															
NCRNA_İNTRONİK	395	420	361	376	369	292	321	364	2503	2091	238	271	246	278	232	1978
NCRNA_SPLİCİNG		1	1			1	1		6	5		2	1			6
SPLİCİNG	18	36	18	12	23	12	19	7	36	32	14	16	4	9	4	31

UPSTREAM	144	144	116	146	74	59	48	57	919	561	54	44	40	55	41	492
UPSTREAM; DOWNSTREAM	13	9	16	8	4	6	2	1	46	27	14	5	5	1	2	31

Çizelge 4.20 Tüm Somatik Varyasyonlar(devamı)

ÖRNEKLER	1T M	1M Ç	1ME T	1P	2ME T	2M Ç	3T	3M Ç	4T M	4M Ç	2T M	3ME T	5M Ç	5T M	5ME T	4ME T
TOPLAM VARIANT	1142	1161	1175	1215	1187	1096	1166	1234	5932	4311	720	782	771	866	838	4100
EKSONİK ÇERÇEVE K. /SİLİNME	12	11	20	13	15	9	20	10	38	56	14	11	7	14	8	53
EKSONİK ÇERÇEVE K./EKLENME	6	5	8	14	6	4	7	12	35	38	8	7	4	6	3	32
EKSONİK ÇERÇEVE K. O./SİLİNME	15	13	16	11	14	9	10	12	72	64	9	24	9	14	8	67
EKSONİK ÇERÇEVE K. O. /EKLENME	1	1			2	3	1	2	45	38	1	2	2	1	2	31
EKSONİK STOPGAİN			1			1	1		3	4						4
EKSONİK STOPLOSS.STOPLOSS									1	2						1
EKSONİK FONK. BİLİNMEEN		1							2	2	1			1		1
UTR3	108	115	121	109	143	110	130	136	623	487	70	60	73	82	90	489
UTR5	15	20	14	18	17	16	16	21	129	64	8	9	15	12	13	58
DOWNSTREAM	13	12	13	23	12	15	12	17	57	41	11	12	9	11	11	44
TOPLAM EKSONİK	34	31	45	38	37	26	39	36	196	204	33	44	22	36	21	189
.İNTERGENİK	139	114	153	113	147	151	110	129	484	404	121	138	127	140	119	358
İNTRONİK	749	785	757	820	732	689	762	792	3906	2731	418	461	463	524	517	2608
NCRNA_EKSONİK	7	16	7	11	16	11	14	11	106	85	7	11	8	9	8	78
NCRNA_İNTRONİK	57	50	50	65	72	62	70	76	306	223	38	40	45	45	52	224
SPLICİNG	3	2	3	3	4	5	1	5	10	8	2		2	1	1	7
UPSTREAM	17	16	11	14	7	10	11	9	108	58	10	5	6	5	4	42
UPSTREAM; DOWNSTREAM			1	1		1	1	2	7	6	2	2	1	1	2	3

Somatik varyasyonları incelerken özellikle hastaların farklı dokularında ortak olarak izlenen varyasyonlar ile kolon kanserinin karaciğer metastazı ile ilişkilendirilebilecek varyasyonlar tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla hastalarda ortak olarak (tüm dokularda en az 3 hastada ve farklı örneklerde olmak koşulu ile) izlenen 23 varyasyon belirlendi ve ayrıntılı olarak incelendi. (Çizelge 4. 21)

Çizelge 4.21 Farklı hastalarda ve farklı doku örneklerinde ortak olarak izlenen somatik varyasyonlar

Kromozom	Başlangıç	Sonlanış	Ref	Değ	Fonksiyon	Gen İsmi	Varyasyon Alt Tip
chr9	65283245	65283245	A	G	ekzonik	FOXD4L5	nonsinonim SNV
chr10	47995404	47995404	C	T	ekzonik	FAM25C	nonsinonim SNV
chr11	1095865	1095865	C	A	ekzonik	MUC2	bilinmiyor
chr17	21703303	21703303	G	A	ekzonik	KCNJ18	nonsinonim SNV
chr11	64315749	64315749	G	C	ekzonik	ESRRA	nonsinonim SNV
chr6	73518751	73518751	C	T	ekzonik	EEF1A1	nonsinonim SNV
chr9	172167	172167	C	T	ekzonik	CBWD1	nonsinonim SNV
chr7	83155155	83155155	A	G	ekzonik	PCLO	nonsinonim SNV
chr8	80638590	80638590	A	-	UTR3	ZNF704	.
chr20	31074347	31074347	C	A	interjenik	FRG1BP	.

chrY	11318741	11318741	A	G	intergenik	TTY23	.
chr9	65691040	65691040	C	G	intronik	CBWD5	.
chr2	107860072	107860072	T	G	intronik	RGPD4	.
chr12	109439504	109439504	C	G	intronik	MYO1H	.
chr17	10706269	10706270	AT	-	intronik	ADPRM	.
chr15	41988236	41988236	A	C	ncRNA_intronik	PLA2G4E-AS1	.
chr9	30093	30093	G	C	upstream	WASHC1	.
chr15	20282100	20282100	C	A	upstream	CHEK2P2	.
chr9	27173064	27173064	G	T	intronik	TEK	.
chr10	46130172	46130172	G	A	ncRNA_ekzonik	AGAP7P	.
chr20	30393394	30393394	T	C	ncRNA_intronik	FRG1BP	.
chr4	54009893	54009893	T	A	UTR3	CHIC2	.
chr13	26212948	26212948	A	G	UTR3	RNF6	.

Hastaların karaciğer metastazlarında en az 3 hastada izlenen ortak varyasyon sayısı 15 olarak bulunmuştur. (Çizelge 4.22)

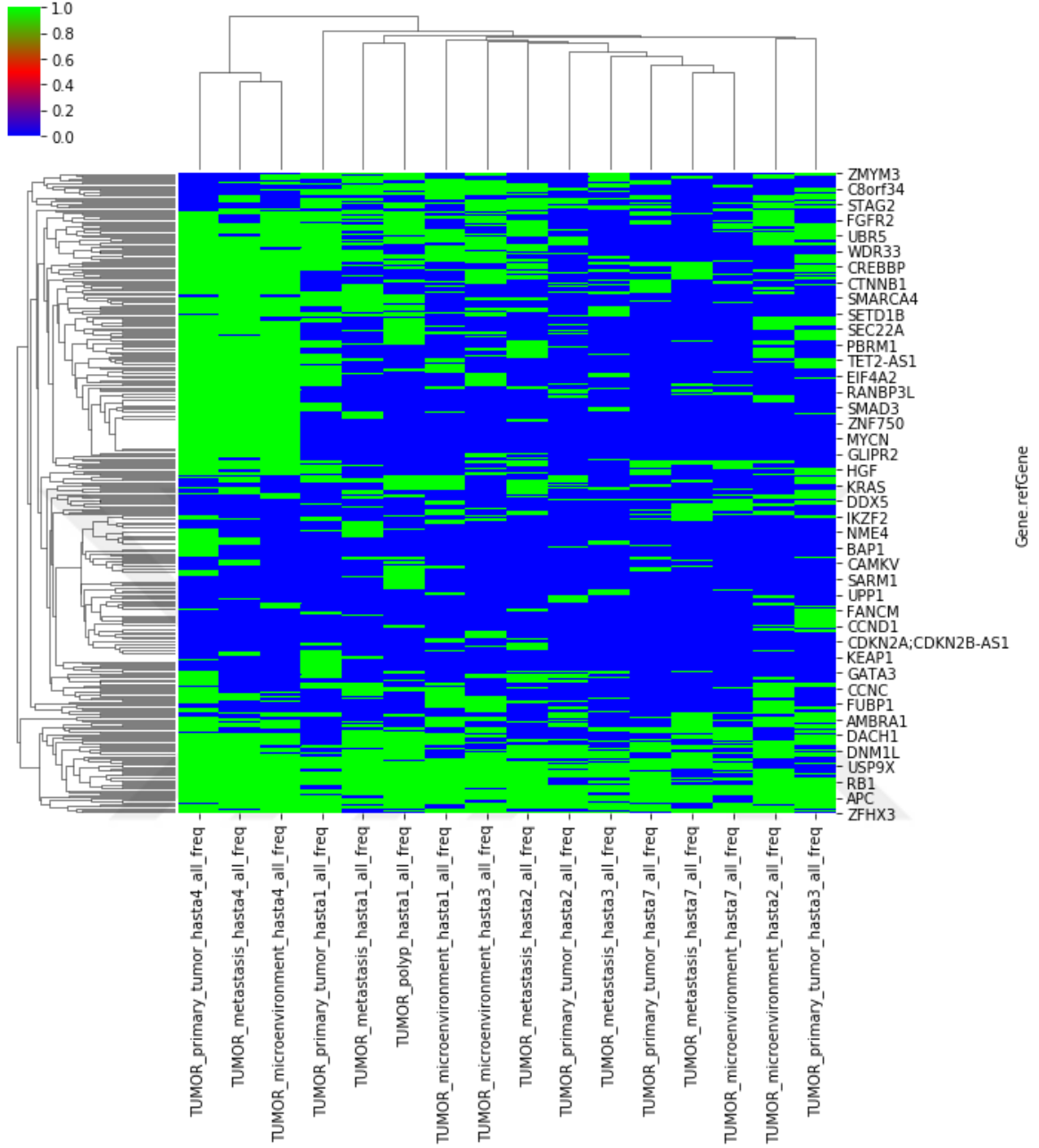
Çizelge 4.22 Karaciğer Metastaz Dokularında ortak izlenen varyasyonlar

Gen ismi	Kromozom/Başl.	Son	Ref	Değ.	Met h1	Met h2	Met h3	Met h4	Met h5	Gnom AD Allel fr.
<i>APOBR</i>	Chr16: 28496096	28496096	A	G	.	0,3333	0,2222	0,2857	.	.
<i>FAM25C</i>	Chr10: 47995404	47995404	C	T	.	0,1349	0,1505	0,1455	.	0,01428
<i>IGFN1</i>	Chr1: 201209539	201209539	C	G	0,1429	.	.	0,1818	0,1803	0,0004
<i>MUC2</i>	Chr11: 1095865	1095865	C	A	.	.	0,1364	0,1176	0,1154	.
<i>MUC2</i>	Chr11:1097336	1097336	G	A	0,2143	.	.	0,3077	0,1765	0,0012
<i>MIR548I2</i>	Chr4: 9692727	9692727	C	T	.	.	0,1	0,2727	0,1739	.
<i>RP11-108M9.2</i>	16856777	16856777	C	T	0,1111	.	0,2414	0,1	.	.
<i>ADPRM</i>	Chr17: 10706269	10706270	AT	-	0,1667	.	.	0,1875	0,125	.
<i>EVA1C</i>	Chr21: 32475903	32475903	C	A	.	.	0,2609	0,1481	0,1064	.
<i>G3BP1</i>	Chr5: 151800908	151800908	T	A	0,1176	0,125	0,125	.	.	0,0028
<i>RFWD2</i>	Chr1: 176136560	176136560	T	A	.	0,2222	.	0,2143	0,1	.
<i>WASHC4</i>	Chr12: 105120706	105120706	GT	-	.	0,3333	0,2632	0,1071	.	.
<i>PLA2G4E-AS1</i>	Chr15:41988236	41988236	A	C	0,1774	0,1186	0,1765	.	.	.
<i>CHIC2</i>	Chr4:54009893	54009893	T	A	0,2308	0,125	0,1667	.	0,1	.
<i>PKD2L2</i>	Chr5: 137940467	137940467	G	T	0,25	.	.	0,1765	0,1053	.

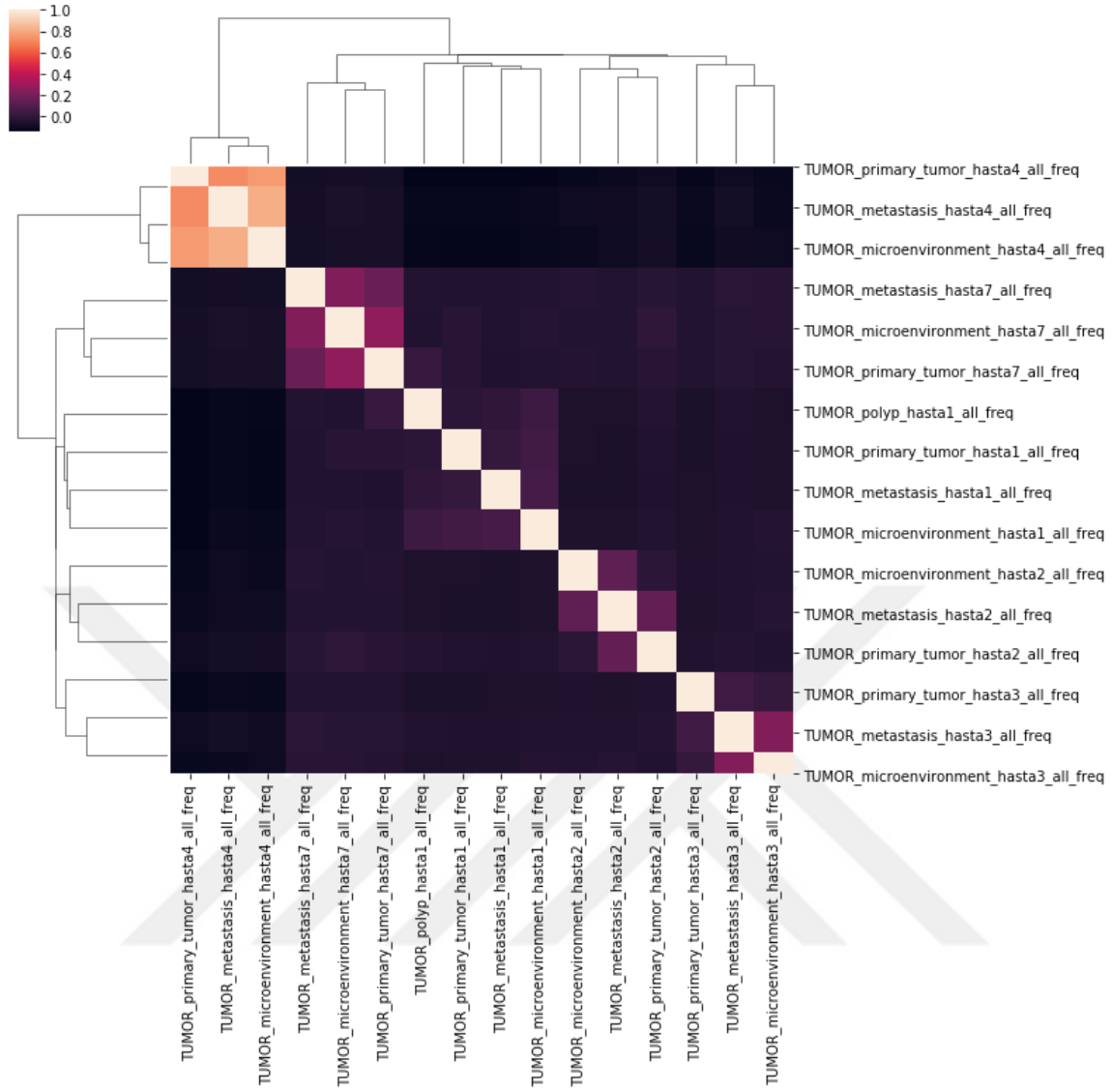
4.3. SÜRÜCÜ GENLER ve FİLOGENETİK AĞAÇ MODELLEME

Her bir hasta için treeomiks aracı kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçlar yolu ile toplamda 239 sürücü mutasyon tespit edildi. Bu mutasyonlar kanser açısından belirgin olanları da içerecek şekilde her bir hasta kendi dokuları içinde değerlendirildi ve farklı doku tiplerinin birbirine yakınlıkları hesaplandı. Ardından kanserde belirgin olan sürücü mutasyonlar üzerinden tüm hasta dokuları birarada değerlendirilip, tüm varyantları gösteren

ısı haritası (Çizim 4.1) ve dokuların benzerlik matrisi oluşturuldu (Çizim 4.2)



Çizim 4.1 Farklı dokulardaki belirgin sürücü varyantları gösteren ısı haritası



Çizim 4.2 Tüm dokuları değerlendiren varyasyon benzerlik matrisi

4.3.1 Filogenetik Ağaç Modelleme

Hasta 1

Birinci hastada olası sürücü varyantların sayısı: 44 gende toplam 56 varyant olarak tespit edildi. Genler ve varyant sayıları (parentez içindeki sayı varyant sayısıdır) sırasıyla; ACVR1B(2), APOB, ATXN3, CD70, DACH1, GNAS(2), HUWE1(2), INPPL1, KMT2B, MACF1, NUP133, RHEB, RPS6KA3(2), SCAF4, SF1, SMARCA1, SOX9, TAF1, USP9X, AMER1, APC(3), BRCA1, BRCA2(2), CYLD, DICER1, EPAS1, EZH2, FBXW7(2), FGFR3, KDM6A, KMT2C, KRAS, NF1(2), NFE2L2, NPM1, PBRM1, PCBP1, RAC1, RB1, RBM10, STAG2(3), TET2, TP53, ZFH3(2) olarak tespit edildi. Cancer Gene Census listesinde de bulunan genler (koyu yazılı) **Çizelge 4.23** 'de özellikleri ile verilmiştir (Çizelge 14)

Çizelge 4.23 Birinci Hastanın Farklı Dokularında Tespit Edilen Kanser İçin Doğrulanmış Bulunan Sürücü Mutasyonlar

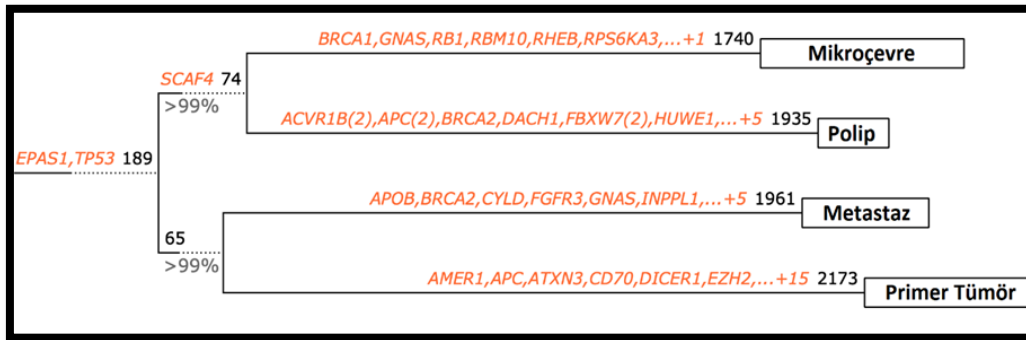
Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Gen	Mutasyon	Örnek Kodu
2	46382525	46382525	G	C	EPAS1	Nokta Mut.	MÇ-TM
17	7670716	7670716	C	T	TP53	Splice alıcı	MÇ-TM
17	43092379	43092379	G	T	BRCA1	Nokta Mut.	MÇ
13	48465095	48465095	A	T	RB1	Nokta Mut.	MÇ
X	47179379	47179379	G	A	RBM10	Nokta Mut.	MÇ
16	72800041	72800041	G	T	ZFH3	Nokta Mut.	MÇ
5	112837971	112837971	C	T	APC	Erken Son	Polip
5	112840068	112840069	GC	G	APC	Çerçeve K.	P
13	32398178	32398178	G	T	BRCA2	Nokta Mut.	P
4	152330733	152330733	T	G	FBXW7	Nokta Mut.	P
4	152411452	152411455	TCTC	T	FBXW7	Silinme	P
12	25245350	25245350	C	A	KRAS	Nokta Mut.	P
2	177234113	177234113	T	G	NFE2L2	Nokta Mut.	P
5	171410539	171410539	C	A	NPM1	Nokta Mut.	P
2	70088042	70088042	T	A	PCBP1	Nokta Mut.	P
13	32338958	32338958	G	T	BRCA2	Nokta Mut.	MET
16	50782405	50782405	G	T	CYLD	Nokta Mut.	MET
4	1799460	1799460	G	T	FGFR3	Nokta Mut.	MET
3	52617529	52617529	G	T	PBRM1	Nokta Mut.	MET
7	6387265	6387265	G	T	RAC1	Nokta Mut.	MET
X	124049023	124049023	G	T	STAG2	Erken Son	MET
X	124083554	124083554	G	T	STAG2	İntr.Bağ.B	MET
X	64190607	64190607	G	T	AMER1	Nokta Mut.	TM
5	112839548	112839549	TC	T	APC	Çerçeve K.	TM
14	95116698	95116698	G	GA	DICER1	İntr.Bağ.B	TM
7	148826475	148826475	G	T	EZH2	Nokta Mut.	TM
X	45069777	45069777	G	T	KDM6A	Erken Son	TM
7	152181417	152181417	G	T	KMT2C	Nokta Mut.	TM
17	31330499	31330499	G	T	NF1	Splice verici	TM
17	31337818	31337818	G	T	NF1	Splice alıcı	TM
X	124022676	124022676	G	T	STAG2	İntr.Bağ.B	TM
4	105242833	105242833	G	T	TET2	Splice alıcı	TM
16	72787830	72787830	G	T	ZFH3	Nokta Mut.	TM

Hastanın dokuları arasındaki Jaccard Benzerlik katsayısı değerlendirmesinde dokuların %10 -11 bandında benzer oldukları görüldü. (Çizelge 4.24) (Çizim 4.3)

Çizelge 4.24 1. Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi.

Örnek	metastaz	mikroçevre	polip	primer tümör
metastaz	1	0.11	0.1	0.1
mikroçevre	0.11	1	0.11	0.11
polip	0.1	0.11	1	0.1
primer tümör	0.1	0.11	0.1	1

1. Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi. Medyan:0.1, Ortalama:0.1



Çizim 4.3: Birinci hasta filogenetik ağaç, ortak sürücü mutasyonlar (Tespit edilen varyantlar içinde kırmızı ile gösterilenler doğrulanmış sürücü mutasyonlardır).

Hasta 2

İkinci hastada olası sürücü varyantların sayısı: 41 gende toplam 52 varyant tespit edildi. Genler ve varyant sayıları sırasıyla (APOB, BRD7, CACNA1A, CHD8, DMD(2), EEF1A1, KIF1A, KMT2B(2), MACF1, RFC1, TAF1, USP9X(3), ZBTB20, APC(2), ARID1A, ASXL1, ATM(3), ATR(2), ATRX, BCOR, BRCA2, CHD4(2), CREBBP, EPHA3, GNA11, IL6ST, KDM6A, KMT2A, KMT2C, KMT2D(2), KRAS, MAX, MET, NSD1, PIK3CA, RAC1, RAD21, RB1, STK11, TET2, TP53, ZFH3(2));olarak tespit edilmiştir. Cancer Gene Census listesinde de bulunan genler (koyu yazılı) Çizelge 4.25 'de özellikleri ile verilmiştir.

Çizelge 4.25 İkinci Hastanın Farklı Dokularında Tespit Edilen Kanser İçin Doğrulanmış Bulunan Sürücü Mutasyonlar

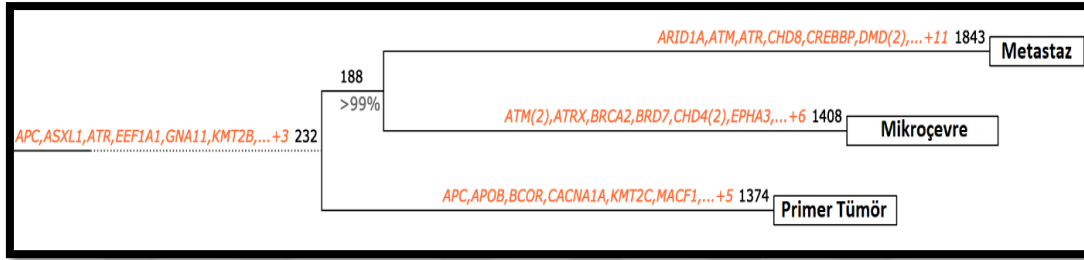
Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Gen	Mutasyon	Örnek Kodu
12	25245347	25245347	C	T	KRAS	Nokta mutasyon	MET-MÇ-TM
8	116847615	116847615	G	A	RAD21	Substitution	MET-MÇ-TM
19	3119318	3119319	TC	T	GNA11	ÇerçeveK	MET-MÇ-TM
5	112838610	112838611	CA	C	APC	ÇerçeveK	MET-MÇ-TM
20	32434638	32434638	A	AG	ASXL1	ÇerçeveK	MET-MÇ-TM
3	142561273	142561273	G	T	ATR	Nokta mutasyon	MET-MÇ-TM
17	7673776	7673776	G	A	TP53	Nokta mutasyon	MET-MÇ-TM
1	26732676	26732676	G	T	ARID1A	Erken Sonlanım	MET
11	108271334	108271334	G	C	ATM	Nokta mutasyon	MET
3	142470178	142470178	A	G	ATR	Nokta mutasyon	MET
16	3758033	3758033	C	A	CREBBP	Nokta mutasyon	MET
12	49050427	49050427	G	T	KMT2D	Nokta mutasyon	MET
14	65077592	65077592	G	T	MAX	Nokta mutasyon	MET
7	116769654	116769654	A	T	MET	Nokta mutasyon	MET
13	48380056	48380056	G	A	RB1	Nokta mutasyon	MET
4	105236521	105236521	A	C	TET2	Nokta mutasyon	MET
16	72787715	72787739	CGCCACCGCCGCCGCCGCCACT	C	ZFH3	Silinme	MET
11	108243957	108243957	G	T	ATM	Nokta mutasyon	MÇ
11	108271369	108271369	G	T	ATM	Nokta mutasyon	MÇ
X	77663559	77663559	C	A	ATRX	Splice Alıcı	MÇ
13	32354916	32354916	G	T	BRCA2	Erken Sonlanım	MÇ
12	6593197	6593197	A	G	CHD4	Nokta mutasyon	MÇ
12	6593204	6593204	C	A	CHD4	Nokta mutasyon	MÇ
3	89419308	89419308	G	T	EPHA3	Nokta mutasyon	MÇ
5	55963467	55963467	G	T	IL6ST	Erken Sonlanım	MÇ
X	44974685	44974685	G	T	KDM6A	Nokta mutasyon	MÇ
11	118498529	118498529	G	A	KMT2A	Splice verici	MÇ
12	49051255	49051255	T	G	KMT2D	Nokta mutasyon	MÇ
3	179220053	179220053	G	T	PIK3CA	Splice verici	MÇ
5	112792467	112792467	C	T	APC	Erken Sonlanım	TM
X	40074505	40074505	G	A	BCOR	Nokta mutasyon	TM
7	152163751	152163751	C	T	KMT2C	Nokta mutasyon	TM
5	177212197	177212197	T	G	NSD1	Splice verici	TM
7	6402336	6402336	T	A	RAC1	Nokta mutasyon	TM
19	1220605	1220605	G	A	STK11	Nokta mutasyon	TM
16	72788426	72788426	C	T	ZFH3	Nokta mutasyon	TM

İkinci hastanın dokuları arasındaki Jaccard Benzerlik katsayısı değerlendirmesinde dokuların %9 -13 bandında benzer oldukları görüldü. (Çizelge 4.26), (Çizim 4.4)

Çizelge 4.26 2. Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi

Örnek	metastaz	mikroçevre	primer tümör
metastaz	1	0.13	0.13
mikroçevre	0.13	1	0.09
primer tümör	0.13	0.09	1

2. Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi. Medyan:0.13, Ortalama:0.12



Çizim 4.4 İkinci hasta filogenetik ağaç, ortak sürücü mutasyonlar (Tespit edilen varyantlar içinde kırmızı ile gösterilenler doğrulanmış sürücü mutasyonlardır).

Hasta 3

Üçüncü hastada olası sürücü varyantların sayısı: 35 gende toplam 39 varyant tespit edildi. Genler ve varyant sayıları sırasıyla (Şekil 6), (Ek data 15) ATXN3, BCL2L11, CHD3, COL5A1(2), DMD, HUWE1, PDS5B, RRAS2, SIN3A, SOX9(2), USP9X, ZFP36L1, **APC, ATR, ATRX, CNBD1, DDX3X, ERBB3, FBXW7, FUBP1, GNA11, IL6ST, KMT2D, MAX, MED12(2), MSH2, NCOR1, NF1, POLQ, PPP6C, RB1, SETD2, STAG2, TP53, ZFH3(2)**; olarak tespit edilmiştir. Cancer Gene Census listesinde de bulunan genler (koyu yazılı) **Çizelge 4.27** 'da özellikleri ile verilmiştir.

Çizelge 4.27 Üçüncü Hastanın Farklı Dokularında Tespit Edilen Kanser İçin Doğrulanmış Bulunan Sürücü Mutasyonlar

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Gen	Mutasyon	Örnek Kodu
5	112839793	112839793	C	A	APC	Erken Son	MET-MÇ
4	152328233	152328233	G	A	FBXW7	Nokta Mut.	MET-MÇ
3	47084198	47084198	G	A	SETD2	Nokta Mut	MET-MÇ
17	7676025	7676025	T	TGCAAGAA	TP53	Çerçeve K.	MET-MÇ
12	49029066	49029066	A	T	KMT2D	Nokta Mut	MET

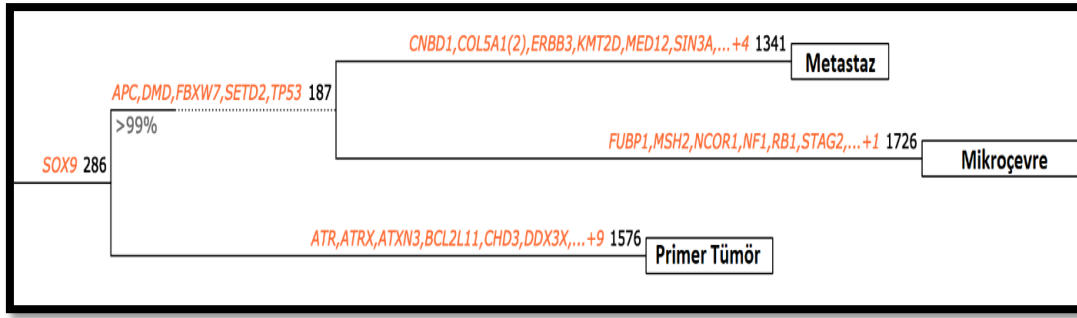
X	71130195	71130195	G	A	MED12	Nokta Mut	MET
8	87205990	87205990	G	T	CNBD1	İntr Bağl B.	MET
16	72788664	72788667	TTGC	T	ZFHX3	Silinme	MET
12	56101088	56101088	C	T	ERBB3	Nokta Mut	MET
1	77956691	77956691	C	T	FUBP1	Nokta Mut	MÇ
2	47408404	47408404	C	A	MSH2	Nokta Mut	MÇ
17	16151950	16151950	T	A	NCOR1	Erken Son	MÇ
17	31330357	31330357	C	T	NF1	Erken Son	MÇ
13	48463841	48463841	T	C	RB1	İntr Bağlanma B	MÇ
X	124071158	124071158	A	T	STAG2	Nokta Mut	MÇ
16	72787694	72787697	AGCC	A	ZFHX3	Silinme	MÇ
3	142549574	142549574	T	C	ATR	Nokta Mut	TM
X	77684033	77684033	G	T	ATRX	Nokta Mut	TM
X	41343346	41343346	A	C	DDX3X	Nokta Mut	TM
19	3094733	3094733	C	T	GNA11	Erken Son	TM
5	55947563	55947563	C	A	IL6ST	Nokta Mut	TM
14	65077573	65077573	C	A	MAX	Nokta Mut	TM
X	71140738	71140741	GAGC	G	MED12	Silinme	TM
3	121489506	121489506	T	C	POLQ	Nokta Mut	TM
9	125171086	125171086	T	C	PPP6C	Nokta Mut	TM

Hastanın dokuları arasındaki Jaccard Benzerlik katsayısı değerlendirmesinde dokuların %11 -15 bandında benzer oldukları görüldü. (Çizelge 4.28) (Çizim 4.5)

Çizelge 4.28 3. Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi

Örnek	metastaz	mikroçevre	primer tümör
metastaz	1	0.15	0.11
mikroçevre	0.15	1	0.14
primer tümör	0.11	0.14	1

3. Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi. Medyan:0.14, Ortalama:0.13



Çizim 4.5 Üçüncü hasta filogenetik ağaç, ortak sürücü mutasyonlar (Tespit edilen varyantlar içinde kırmızı ile gösterilenler doğrulanmış sürücü mutasyonlardır.)

Hasta 4

Dördüncü hastada olası sürücü varyantların sayısı: 52gende toplam 72 varyant tespit edildi. Genler ve varyant sayıları sırasıyla (Şekil 7), AJUBA, APOB(4), ATF7IP, CBWD3(2), DACH1(2), DMD(3), EPHA2, GTF2I, HUWE1, MAP3K1, MGA(2), PDS5B, PLXNB2(2), SMARCA1, SPTA1(3), SPTAN1, USP9X, **ACVR1, ALK, APC, AR, ATM, ATR, ATRX, BCOR, BRCA1(2), CNBD1, CTNND1, ERBB2, FAT1(2), FGFR3, FLNA, FLT3, FOXA1, IL6ST, IL7R, KMT2C, KMT2D(2), LZTR1, MSH2, MSH6, PLCG1(2), POLE(2), POLQ(4), PTEN, RNF43, RUNX1, SETD2, TET2, THRAP3, TP53, TSC1** olarak tespit edilmiştir. Cancer Gene Census listesinde de bulunan genler (koyu yazılı) Çizelge 4.29 'da özellikleri ile verilmiştir.

Çizelge 4.29 Dördüncü Hastanın Farklı Dokularında Tespit Edilen Kanser İçin Doğrulanmış Bulunan Sürücü Mutasyonlar

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Gen	Mutasyon	Örnek Kodu
2	157799450	157799450	G	C	ACVR1	Nokta mut	MET-MÇ-TM
11	108304735	108304735	G	A	ATM	Nokta mut	MET-MÇ-TM
3	142459302	142459302	C	T	ATR	Nokta mut	MET-MÇ-TM
X	77682471	77682471	C	G	ATRX	Nokta mut	MET-MÇ-TM
X	40074613	40074613	G	A	BCOR	Nokta mut	MET-MÇ-TM
17	43070958	43070958	C	T	BRCA1	Nokta mut	MET-MÇ-TM
17	43094464	43094464	T	C	BRCA1	Nokta mut	MET-MÇ-TM
17	39727784	39727784	C	G	ERBB2	Nokta mut	MET-MÇ-TM
4	186708384	186708384	C	T	FAT1	Nokta mut	MET-MÇ-TM
4	186708616	186708616	A	C	FAT1	Nokta mut	MET-MÇ-TM
13	28050157	28050157	G	A	FLT3	Nokta mut	MET-MÇ-TM
14	37591441	37591441	C	T	FOXA1	Nokta mut	MET-MÇ-TM
5	55941119	55941119	G	A	IL6ST	Nokta mut	MET-MÇ-TM

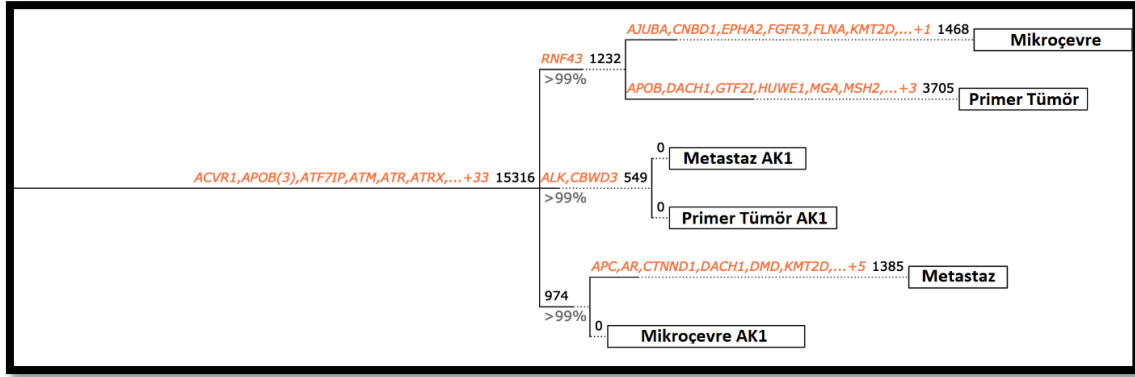
5	35874473	35874473	C	T	IL7R	Nokta mut	MET-MÇ-TM
7	152238768	152238768	T	C	KMT2C	Nokta mut	MET-MÇ-TM
2	47783349	47783349	G	A	MSH6	Nokta mut	MET-MÇ-TM
20	41163423	41163423	A	G	PLCG1	Nokta mut	MET-MÇ-TM
20	41168825	41168825	T	C	PLCG1	Nokta mut	MET-MÇ-TM
12	132643403	132643403	A	T	POLE	İntr Bağl. B	MET-MÇ-TM
12	132677409	132677409	G	A	POLE	Nokta mut	MET-MÇ-TM
3	121488790	121488790	G	T	POLQ	Nokta mut	MET-MÇ-TM
3	121489129	121489129	C	T	POLQ	Nokta mut	MET-MÇ-TM
21	34887027	34887027	A	G	RUNX1	Nokta mut	MET-MÇ-TM
3	47083895	47083895	G	A	SETD2	Nokta mut	MET-MÇ-TM
4	105275794	105275794	A	G	TET2	Nokta mut	MET-MÇ-TM
1	36286832	36286832	C	T	THRAP3	Nokta mut	MET-MÇ-TM
9	132911517	132911517	A	G	TSC1	Nokta mut	MET-MÇ-TM
17	58370936	58370936	C	T	RNF43	Nokta mut	MÇ-TM
3	121483570	121483570	C	A	POLQ	Nokta mut	MÇ
12	49039347	49039347	G	T	KMT2D	Nokta mut	MÇ
8	87205990	87205990	G	T	CNBD1	İntr. Bağl. B	MÇ
4	1804950	1804950	T	G	FGFR3	Nokta mut	MÇ
X	154358233	154358233	T	A	FLNA	Nokta mut	MÇ
3	121483382	121483382	G	T	POLQ	İntr. Bağl B	TM
2	47414369	47414369	A	C	MSH2	Nokta mut	TM
2	29223336	29223336	G	A	ALK	İntr. Bağl B	MET-TM
5	112839889	112839890	CA	C	APC	Çerçeve K.	MET
X	67546524	67546524	G	C	AR	Nokta mut	MET
10	87960902	87960902	G	T	PTEN	Nokta mut	MET
12	49032886	49032886	A	T	KMT2D	Nokta mut	MET
11	57796952	57796952	C	T	CTNND1	Nokta mut	MET
22	20985867	20985867	G	A	LZTR1	Nokta mut	MET
17	7674945	7674945	G	A	TP53	Erken Son	MET

Hastanın dokuları arasındaki Jaccard Benzerlik katsayısı değerlendirmesinde dokuların %73-82 bandında benzer oldukları görüldü (Çizelge 4.30) (Çizim 4.6)

Çizelge 4.30 4. Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi

Örnek	metastaz	mikroçevre	primer tümör
metastaz	1	0.82	0.73
mikroçevre	0.82	1	0.76
primer tümör	0.73	0.76	1

4. Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi. Medyan:0.76, Ortalama:0.77



Çizim 4.6 Dördüncü hasta filogenetik ağaç, ortak sürücü mutasyonlar

(Tespit edilen varyantlar içinde kırmızı ile gösterilenler doğrulanmış sürücü mutasyonlardır.)

Hasta 5

Beşinci hastada olası sürücü varyantların sayısı: 15 gende toplam 20 varyant tespit edildi. Genler ve varyant sayıları sırasıyla (Şekil 8), DIAPH2, MSH3(2), PDS5B, SMC3, APC(3), ATM, FAT1, KDM6A(2), KMT2D, KRAS, MAP2K1, POLE(2), PTEN, STK11, TP53 olarak tespit edilmiştir. Cancer Gene Census listesinde de bulunan genler (koyu yazılı) Çizelge 4.31 'de özellikleri ile verilmiştir.

Çizelge 4.31 Beşinci Hastanın Farklı Dokularında Tespit Edilen Kanser İçin Doğrulanmış Bulunan Sürücü Mutasyonlar

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Gen	Mutasyon	Örnek Kodu
5	112775626	112775626	T	A	APC	İntr. Bağl. B	MET
X	45059008	45059008	G	T	KDM6A	Nokta mut	MET
12	132661162	132661162	T	A	POLE	Nokta mut	MÇ
10	87960902	87960902	G	T	PTEN	Nokta mut	MÇ
5	112827997	112827997	C	CT	APC	Çerçeve K.	TM
5	112840054	112840055	CT	C	APC	Çerçeve K.	TM
12	132661129	132661129	T	C	POLE	Nokta mut	TM
11	108229243	108229243	C	T	ATM	Nokta mut	TM
19	1220588	1220588	A	C	STK11	Nokta mut	TM
17	7673704	7673704	G	A	TP53	Erken Son	TM
4	186636619	186636619	C	T	FAT1	Nokta mut	TM
X	45059019	45059019	A	T	KDM6A	Nokta mut	TM
12	49052065	49052065	G	T	KMT2D	Nokta mut	TM
12	25245350	25245350	C	G	KRAS	Nokta mut	TM
15	66489259	66489259	A	T	MAP2K1	Nokta mut	TM

Hastanın dokuları arasındaki Jaccard Benzerlik katsayısı değerlendirmesinde

dokuların %17-20 bandında benzer oldukları görüldü. (Çizelge 4.32) (Çizim 4.7)

Çizelge 4.32 Beşinci Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi

Örnek	metastaz	mikroçevre	primer tümör
metastaz	1	0.2	0.17
mikroçevre	0.2	1	0.17
primer tümör	0.17	0.17	1

5. Hastanın dokuları arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı matrisi. Medyan:0.17, Ortalama:0.18



Çizim 4.7 Beşinci Hasta Filogenetik Ağaç, Ortak Sürücü Mutasyonlar

(Tespit edilen varyantlar içinde kırmızı ile gösterilenler doğrulanmış sürücü mutasyonlardır.)

Bulunan tüm driver mutasyonlar içinde daha önce data setlerde önemi belirsiz olarak nitelenen ancak veri setimizde özellikle en az iki hastada ortak izlenen ve kanser ilişkili olabilecek 11 varyasyon belirlendi. (Çizelge 4.33)

Çizelge 4.33 Kanser ilişkili olabilme prediksyonu yüksek driver genler

Chr	Start	End	Ref	Alt	Func.refGene	Gene.refGene	ExonicFunc.refGene
chr6	73518751	73518751	C	T	exonic	EEF1A1	nonsynonymous SNV
chr4	1959486	1959486	G	A	exonic	NSD2	nonsynonymous SNV
chr5	55941119	55941119	G	A	exonic	IL6ST	nonsynonymous SNV
chr5	112839793	112839793	C	A	exonic	APC	stopgain
chr8	116847615	116847615	G	A	exonic	RAD21	nonsynonymous SNV
chr10	87960902	87960902	G	T	exonic	PTEN	nonsynonymous SNV
chr11	118499836	118499836	G	T	exonic	KMT2A	synonymous SNV
chr14	65084397	65084397	-	A	intronic	MAX	.
chr14	65084397	65084397	A	-	intronic	MAX	.
chr17	72121501	72121501	C	A	exonic	SOX9	stopgain
chr19	35732577	35732577	G	A	exonic	KMT2B	nonsynonymous SNV

4.4 SOMATİK VERİ KOPYA SAYISI DEĞİŞİMLERİ, TÜMÖR SÜPRESÖR,

PROTOONKOGEN ,UYGUNSUZ DNA ONARIM GENLERİ ve SEÇİLEN PATOJEN VARYASYONLARI

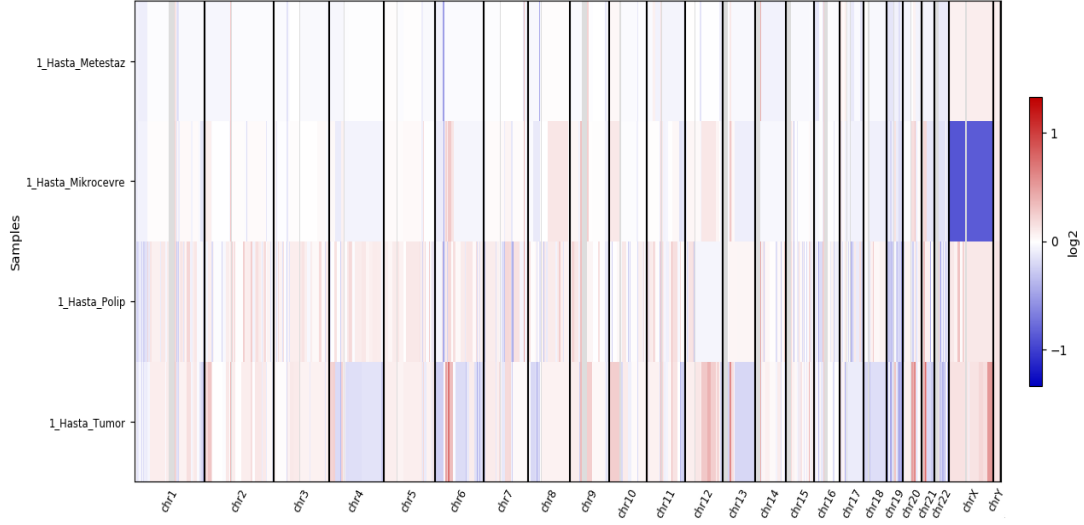
Tüm hastaların normal doku dışındaki doku örneklerinden üretilen somatik varyasyonları içeren ekzom dizileme verisi ; Kopya sayısı değişiklikleri açısından değerlendirildi. Farklı frekans aralıklarında kromozomlarda meydana gelen silinme veya eklenmeler, kromozom sayı değişimleri ekzom dasetasının sınırlılıkları içinde tespit edilmeye çalışıldı. Bu noktada kromozomal kopya sayısı değişimlerine dair daha kaba bir resimle dokulardaki benzerlikler ve farklılıkların yanı sıra dokuların kendi içinde kromozomlarda meydana gelen kopya sayısı varyasyonları gösterildi.

Somatik ekzom verisi değerlendirmesinde yaptığımız bir diğer incelemede DANN, Mutation Assessor, MutationTaster, PROVEAN and FATHMM-MKL, İnter var, Clin Var gibi farklı algoritma ve biyoinformatik araçları kullanılarak patolojik olabilme olasılıklarına ve Gnom AD'de nadir görülmelerine (düşük frekans) göre varyantları filtreledik. Her bir hastanın verisi kendi dokuları içinde sırayla aşağıda yer almaktadır. Birinci hastada Alel Frekansı 0,05 in altında olan nadir görülen veya allel frekansı bilinmeyen toplam 74 adet , ikinci hastada toplam 82 adet , Üçüncü hastada 63 adet , dördüncü hastada toplam 285 adet ,beşinci hastada ise toplam 25 adet patojenik ya da patojenik olma olasılığı yüksek varyasyon izlendi.

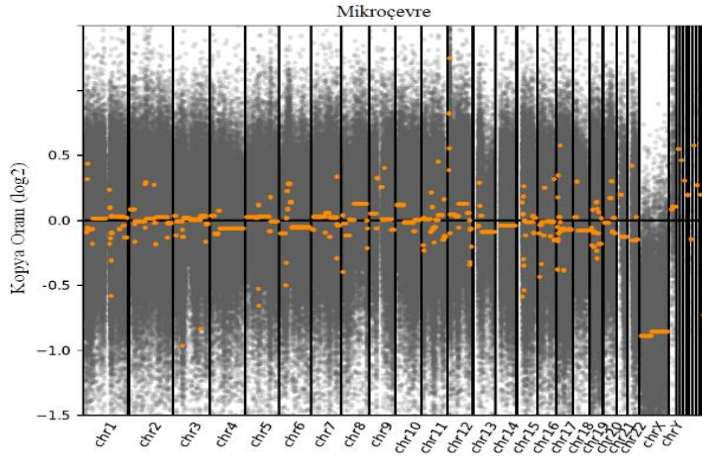
Normal kolon dokusu dışındaki hastaların tüm doku örnekleri somatik ekzom verisinde yapılan bir diğer inceleme ile Tümör Süpresör Genler (APC, ARID1A, CTNNB1, FBXW7, PTEN, RET, SMAD4, TP53) Protoonkogenler (BRAF, ERBB2, GNAS, KRAS, NRAS, PIK3CA) ve mikrosatellit instabilite ile ilişkilendirilen Uygunsuz DNA Onarım Genlerinde (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) meydana gelen varyasyonları araştırdık. İnceleme sonuçları her hasta ayrı ayrı aşağıda listelenmiştir.

Hasta 1

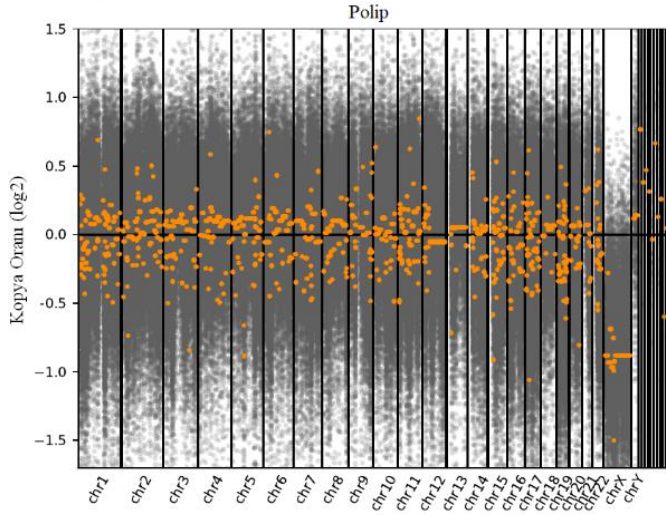
Birinci hastanın tüm doku örneklerinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri (Çizim 4.8), sırasıyla mikroçevre dokusu, polip dokusu, primer tümör ve metastaz dokusu kopya sayısı değişim tablosu ve frekans aralıkları Çizim 4.9'da yer almaktadır.



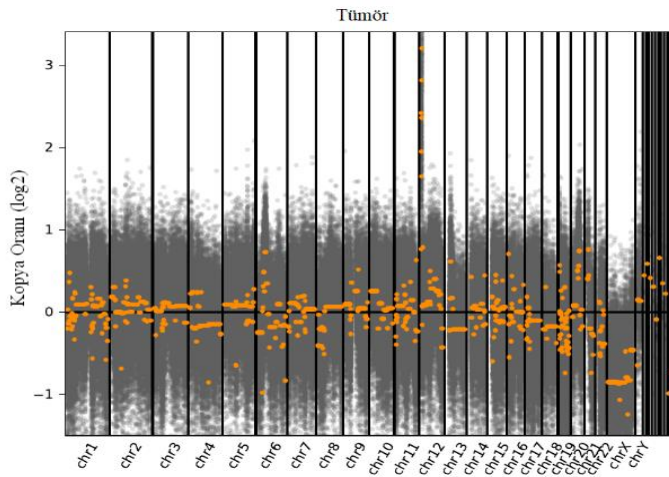
Çizim 4.8 Birinci hasta tüm doku örneklerinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



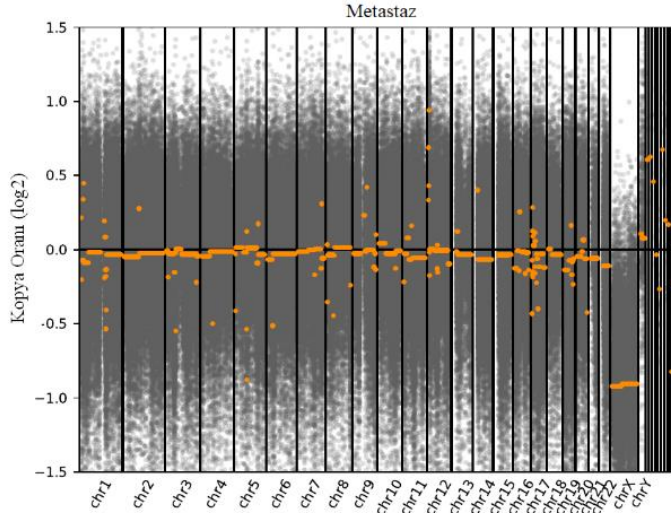
Çizim 4.9.a Birinci Hasta Somatik Veri Mikroçevre doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.9.b Birinci Hasta Somatik Veri Polip doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.9.c Birinci Hasta Somatik Veri Primer tümör doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.9.d Birinci Hasta Somatik Veri Primer tümör doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri

Prediksiyon araçları ile değerlendirilen varyant verisi sonucunda patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan ,daha önce patojen olarak tanımlanmamış, Alel Frekansı 0,05 in altında ,nadir görülen veya alel frekansı bilinmeyen toplam 74 adet varyant tespit edildi, Sırasıyla mikroçevre dokusu, polip dokusu, primer tümör ve metastaz dokusunda izlenen patojen yada patojenite skoru yüksek varyasyonlar aşağıda mikroçevre dokusu için Çizelge 4.34’de; Polip verisi için Çizelge 4.35’de ,Primer Tümör verisi için Çizelge 4.36’de ve Metastaz dokusu için ise Çizelge 4.37 bulunduğu kromozom, lokusu, varyasyon tipi ve fonksiyonu, allel frekansı ve bilinen varyantların Cosmic veri sistemindeki ‘rs’ kodlu tanımları ile birlikte geniş şekilde özetlenmiştir.

Çizelge 4.34 Birinci hasta mikroçevre dokusu ekzom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD exome_ALL	ID
chr1-198755930-198755930	G->A	PTPRC	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0019	rs150672767
chr17-7670716-7670716	C->T	TP53	Splicing	.	rs587782272
chr5-149914993-149914993	G->T	PDE6A	Exonic - Stopgain	.	.
chr7-151490981-151490981	C->A	RHEB	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr12-55748969-55748969	G->T	GDF11	Exonic - Stopgain	.	.
chr17-40133569-40133569	T->G	MSL1	Exonic - Stopgain	.	.
chr18-9255428-9255428	G->T	ANKRD12	Exonic - Stopgain	.	.
chrX-78123311-78123311	G->T	PGK1	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr1-93870757-93870757	G->T	DNTTIP2	Exonic - Stopgain	.	.
chr3-44848533-44848533	G->T	KIF15	Exonic - Stopgain	.	.
chr3-171853530-171853530	G->T	TMEM212	Exonic - Stopgain	.	.
chr4-127663486-127663486	G->T	INTU	Exonic - Stopgain	4.07E-06	.
chr6-63281197-63281197	G->T	LGSN	Exonic - Stopgain	.	.

Çizelge 4.35 Birinci hasta polip dokusu ekzom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr3-170997895-170997895	T->>	SLC2A2	Utr3	0.0014	rs764176766
chr4-112618811-112618811	C->A	ZGRF1	Exonic - Stopgain	.	.
chr6-131950863-131950863	C->A	CTGF	Exonic - Stopgain	.	.
chr7-76282998-76282998	G->T	SRRM3	Exonic - Stopgain	.	.
chr9-114423425-114423425	C->T	WHRN	Exonic - Synonymous Snv	0.0307	rs34252199
chr11-8695535-8695535	G->A	ST5	Exonic - Stopgain	.	.
chr11-63999006-63999006	C->A	MACROD1	Exonic - Stopgain	.	rs759283667
chr11-103245329-103245329	G->T	DYNC2H1	Exonic - Stopgain	.	.
chr12-25245350-25245350	C->A	KRAS	Exonic - Nonsynonymous Snv	0	rs121913529
chr12-25245350-25245350	C->G	KRAS	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.00E+00	rs121913529
chr12-26602387-26602387	G->A	ITPR2	Exonic - Stopgain	.	.
chr13-32536224-32536224	C->T	N4BP2L2	Exonic - Stopgain	.	.
chr19-47375528-47375528	C->A	DHX34	Exonic - Stopgain	.	.
chr20-50945888-50945888	C->A	DPM1	Exonic - Stopgain	.	.
chrX-133596519-133596519	G->T	GPC3	Exonic - Stopgain	.	.

Çizelge 4.36 Birinci hasta primer tümör dokusu ekzom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr1-35011024-35011024	T->A	ZMYM6	Exonic - Stopgain	.	.
chr1-229496043-229496043	G->T	NUP133	Exonic - Stopgain	.	.
chr1-244552671-244552671	G->T	CATSPERE	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-167247423-167247423	G->T	XIRP2	Exonic - Stopgain	.	.
chr5-181050285-181050285	C->T	BTNL9	Exonic - Stopgain	0.0002	rs200884524
chr7-92569845-92569845	G->T	FAM133B	Exonic - Stopgain	.	.
chr7-144378781-144378781	C->A	ARHGFE5	Exonic - Stopgain	.	.
chr8-119593809-119593809	C->A	ENPP2	Exonic - Stopgain	.	.
chr9-131111642-131111642	G->T	AIF1L	Exonic - Stopgain	.	.
chr10-73808145-73808145	G->A	NDST2	Exonic - Stopgain	8.12E-06	rs753508212
chr10-103900122-103900122	G->A	STN1	Exonic - Stopgain	2.84E-05	rs149919798
chr11-60464300-60464300	G->T	MS4A1	Exonic - Stopgain	.	.
chr15-50997872-50997872	G->T	AP4E1	Exonic - Stopgain	.	.
chr16-50153883-50153883	G->T	PAPD5	Exonic - Stopgain	.	.
chr17-13014456-13014456	A->T	ELAC2	Exonic - Stopgain	.	.
chr17-62481174-62481174	G->T	TLK2	Exonic - Stopgain	.	.
chr19-7871515-7871515	G->A	PRR36	Exonic - Stopgain	.	.
chr20-63203522-63203522	G->A	YTHDF1	Exonic - Stopgain	.	.
chrX-45069777-45069777	G->T	KDM6A	Exonic - Stopgain	.	.
chrX-132069523-132069523	G->T	STK26	Exonic - Stopgain	.	.
chrX-134493524-134493524	G->A	HPRT1	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	rs137852503

Çizelge 4.37 Birinci hasta metastaz dokusu ekzom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr1-63557178-63557178	G->T	EFCAB7	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-219210776-219210776	C->T	ABCB6	Exonic - Nonsynonymous Snv	4.11E-06	.
chr4-102911454-102911454	G->A	SLC9B1	Exonic - Stopgain	0.0251	rs75599926
chr4-114935287-114935287	G->T	NDST4	Exonic - Stopgain	.	.
chr4-186083862-186083862	G->T	TLR3	Exonic - Stopgain	.	.
chr5-173123154-173123154	G->T	CREBRF	Exonic - Stopgain	.	.
chr5-177404383-177404383	G->T	F12	Exonic - Stopgain	.	.
chr6-75138914-75138914	C->A	COL12A1	Exonic - Stopgain	.	.
chr7-6387265-6387265	G->T	RAC1	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr8-94739741-94739741	G->T	DPY19L4	Exonic - Stopgain	.	.
chr8-120443290-120443290	T->A	MRPL13	Exonic - Stopgain	.	.
chr8-123369896-123369896	C->A	ATAD2	Exonic - Stopgain	.	.
chr9-27009051-27009051	G->T	IFT74	Exonic - Stopgain	.	.
chr10-84245127-84245127	G->T	RGR	Exonic - Stopgain	.	.
chr11-43318697-43318697	C->T	API5	Exonic - Stopgain	4.06E-06	rs780783169
chr12-100298152-100298152	G->T	SCYL2	Exonic - Stopgain	.	.
chr15-48805593-48805593	A->T	CEP152	Exonic - Stopgain	.	.
chr16-67257111-67257111	C->T	SLC9A5	Exonic - Stopgain	.	.
chr17-19132696-19132696	G->T	GRAPL	Exonic - Stopgain	.	.
chr17-63834205-63834205	C->A	SMARCD2	Exonic - Stopgain	.	.
chr19-3753774-3753774	G->T	APBA3	Exonic - Stopgain	6.12E-06	.
chr22-50170785-50170785	G->T	PANX2	Exonic - Stopgain	.	.
chrX-21978898-21978898	G->T	SMS	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chrX-108187958-108187958	G->A	COL4A6	Exonic - Stopgain	.	.
chrX-124049023-124049023	G->T	STAG2	Exonic - Stopgain	.	.

Birinci hastanın normal kolon dokusu dışındaki tüm dokularında üretilen somatik ekzom dizileme verisinde Tümör Süpresör Genler APC, ARID1A, CTNNB1, FBXW7, PTEN, RET, SMAD4, TP53 ile Protoonkogenler BRAF, ERBB2, GNAS, KRAS, NRAS, PIK3CA ve mikrosatellit instabilite ile ilişkilendirilen Uygunuz DNA Onarım Genleri MLH1, MSH2, MSH6, PMS2'den meydana gelen varyasyonları araştırdık. Filtreleme işlemleri sonucunda herbir gende ilenen varyasyon ve mutasyonların görüldüğü dokuların listesi ve izlenen varyasyonların ayrıntıları Çizelge 4.38, Çizelge 4.39 ve Çizelge 4.40'da sırasıyla tümör süpresör genler (Çizelge 4.38.a, b), protoonkogenler (Çizelge 4.39.a, b) ve Uygunuz DNA Onarım genlerinde (Çizelge 4.40a, b) izlenen tüm varyasyonları içerecek şekilde listelenmiştir.

Çizelge 4.38.a Birinci Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Genlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

Genler	Metastaz	Mikroçevre	Polip	Primer Tümör
AMER1	1	1		2
APC		1	3	2
ARID1A	2			
CTNNB1		1	1	
DCC	2			1
FBXW7			2	
PTEN	1			
RET	1	1		
TGFB2	1	1		
TP53	1	1	1	1
Genel Toplam	9	6	7	6

Çizelge 4.38.b Birinci Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Gen Varyantları ve Özellikleri

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Fonk.refGene	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	MET	MÇ	P	TM
chr17	7670716	7670716	C	T	splicing	TP53	.	.		0,1463		0,341
chr17	7676653	7676653	A	G	intronik	TP53	.	.	0,1			
chr17	7676731	7676731	G	A	intronik	TP53	.	.			0,167	
chr1	26763375	26763375	G	A	intronik	ARID1A	.	.	0,1304			
chr1	26781036	26781036	T	-	UTR3	ARID1A	.	.	0,1			
chr3	41236303	41236303	T	-	intronik	CTNNB1	.	.		0,1		
chr3	41240021	41240021	G	T	UTR3	CTNNB1	.	.			0,154	
chr10	43109334	43109334	T	C	intronik	RET	.	.	0,125			
chr10	43111591	43111591	G	T	intronik	RET	.	.		0,1667		
chr18	53063556	53063556	T	A	intronik	DCC	.	.	0,125			
chr18	53340041	53340041	T	G	intronik	DCC	.	.	0,1053			
chr18	53468135	53468135	G	C	intronik	DCC	.	.				0,875
chrX	64185160	64185160	C	T	UTR3	AMER1	.	.	0,1			
chrX	64188236	64188236	G	A	UTR3	AMER1	.	.				0,1
chrX	64189811	64189811	T	C	UTR3	AMER1	.	.		0,129		
chrX	64190607	64190607	G	T	ekzonik	AMER1	nonsinonim SNV	.				0,105
chr10	87966932	87966932	A	T	UTR3	PTEN	.	.	0,125			
chr5	112780696	112780696	T	C	intronik	APC	.	.		0,1176		
chr5	112818833	112818834	TG	-	intronik	APC	.	.			0,143	
chr5	112818858	112818858	G	T	intronik	APC	.	.				0,133
chr5	112837971	112837971	C	T	ekzonik	APC	stopgain	.			0,304	
chr5	112839549	112839549	C	-	ekzonik	APC	Çerçeve K.	.				0,283
chr5	112840069	112840069	C	-	ekzonik	APC	Çerçeve K.	.			0,196	
chr4	152330733	152330733	T	G	ekzonik	FBXW7	nonsinonim SNV	.			0,255	
chr4	152411453	152411455	CTC	-	ekzonik	FBXW7	Silinme(ÇK yok)	0.0002			0,15	
chr1	218346586	218346586	-	AAAC	UTR5	TGFB2	.	.	0,75	0,4167		

Çizelge 4.39.a Birinci Hasta Somatik Verisinde Protoonkogenlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

Genler	Metastaz	Mikroçevre	Polip	Primer Tümör
BRAF			2	1
GNAS	2	3	1	1
KRAS		1	2	
NRAS				1
PIK3CA		1		
SOX9			5	1
TCF7L2			3	5
Genel Toplam	2	5	13	9

Çizelge 4.39.b Birinci Hasta Somatik Verisi Protoonkogen Varyantları ve Özellikleri

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Fonk.refGene	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	MET	MÇ	P	TM
chr7	140777217	140777217	C	A	intronik	BRAF	.	.			0,143	
chr7	140734796	140734796	A	G	intronik	BRAF	.	0.0006			0,118	
chr7	140808440	140808440	T	A	intronik	BRAF	.	.				0,118
chr20	58854703	58854703	G	A	ekzonik	GNAS	nonsinonim SNV	.	0,1818			
chr20	58891709	58891709	G	C	UTR5	GNAS	.	3,99E-02	0,1053			
chr20	58854665	58854665	C	T	ekzonik	GNAS	nonsinonim SNV	.		0,25		
chr20	58855341	58855341	G	A	intronik	GNAS	.	6,34E-03		0,1		0,365
chr20	58892074	58892074	C	T	intronik	GNAS	.	.		0,13		
chr20	58853145	58853145	G	A	UTR5	GNAS	.	.			0,286	
chr20	58855341	58855341	G	A	intronik	GNAS	.	6,34E-03		0,1		0,365
chr12	25225782	25225782	-	A	intronik	KRAS	.	.		0,11		
chr12	25245350	25245350	C	G	ekzonik	KRAS	nonsinonim SNV	0			0,51	
chr1	114714048	114714048	G	A	intronik	NRAS	.	.				0,76
chr3	179225769	179225769	G	T	intronik	PIK3CA	.	.		0,11		
chr17	72125660	72125660	-	T	UTR3	SOX9	.	.			0,118	0,182
chr17	72124410	72124410	A	C	UTR3	SOX9	.	0.4074		0,889		
chr17	72123104	72123104	C	G	intronik	SOX9	.	.		0,826		
chr17	72122790	72122790	-	C	ekzonik	SOX9	Silinme(Çerçeve K.)	.		0,553		
chr17	72122558	72122558	G	A	intronik	SOX9	.	.		0,781		
chr17	72125660	72125660	-	T	UTR3	SOX9	.	.		0,118	0,182	
chr10	113166055	113166055	T	G	UTR3	TCF7L2	.	.		0,125		
chr10	113166044	113166044	A	C	UTR3	TCF7L2	.	.		0,2		
chr10	113144104	113144104	G	C	intronik	TCF7L2	.	.		0,154		
chr10	113151315	113151315	C	T	intronik	TCF7L2	.	.			0,1	
chr10	113148879	113148879	G	A	intronik	TCF7L2	.	.			0,143	
chr10	112967055	112967055	G	T	intronik	TCF7L2	.	.			0,154	
chr10	112966868	112966868	G	T	intronik	TCF7L2	.	.			0,111	
chr10	112959182	112959182	G	T	intronik	TCF7L2	.	.			0,111	

Çizelge 4.40.a Birinci Hasta Somatik Verisinde Uygunuz DNA Onarım Genlerinde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

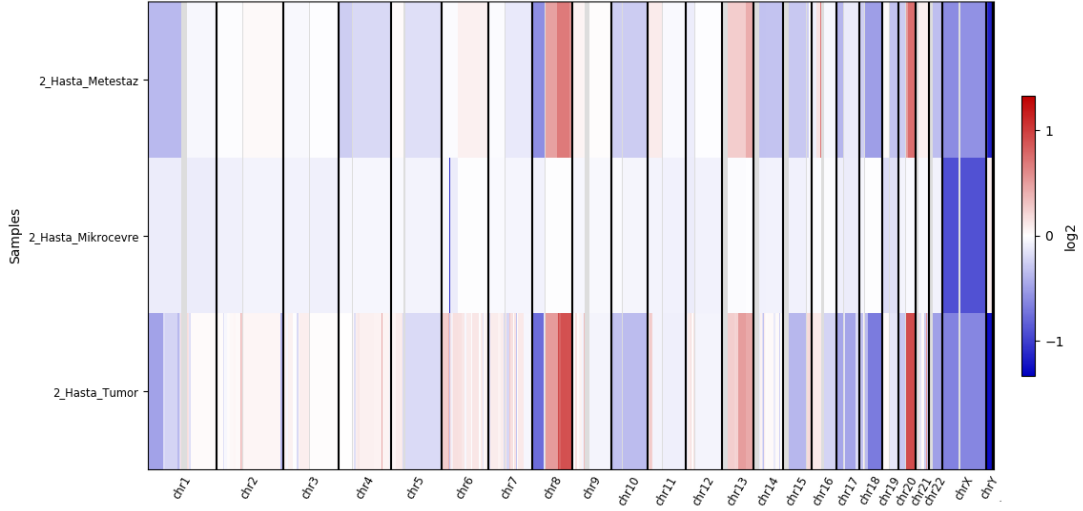
Genler	Metastaz	Mikroçevre	Polip	Primer Tümör
FBXO11				1
MLH1	2	1	1	
MSH6		1		
PMS2	1			
POLE		1	1	1
Genel Toplam	3	3	2	2

Çizelge 4.40.b Birinci Hasta Somatik Veri Uygunuz DNA Onarım Genleri Varyantları ve Özellikleri

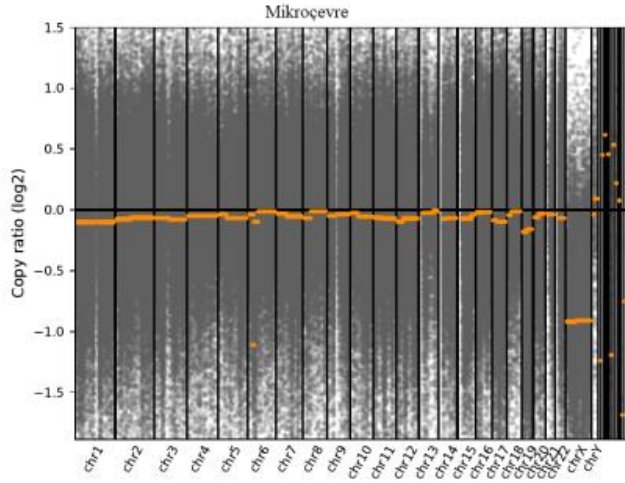
Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Fonk.refGene	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	MET	MÇ	P	TM
chr2	47808534	47808534	A	G	intronik	FBXO11	.	.				0,833
chr3	37025606	37025608	ATA	-	intronik	MLH1	.	0.0004	0,25	0,1538		
chr3	37004533	37004533	G	T	intronik	MLH1	.	.	0,125			
chr3	37025606	37025608	ATA	-	intronik	MLH1	.	0.0004	0,25	0,1538		
chr3	37014724	37014724	C	T	intronik	MLH1	.	.			0,111	
chr2	47795809	47795809	G	T	intronik	MSH6	.	.		0,2		
chr7	5995715	5995715	G	T	intronik	PMS2	.	.	0,1176			
chr12	132633998	132633998	C	A	intronik	POLE	.	.		0,1429		
chr12	132626450	132626450	G	A	intronik	POLE	.	.			0,1	
chr12	132680356	132680369	G	T	intronik	POLE	.	.				0,118

Hasta 2

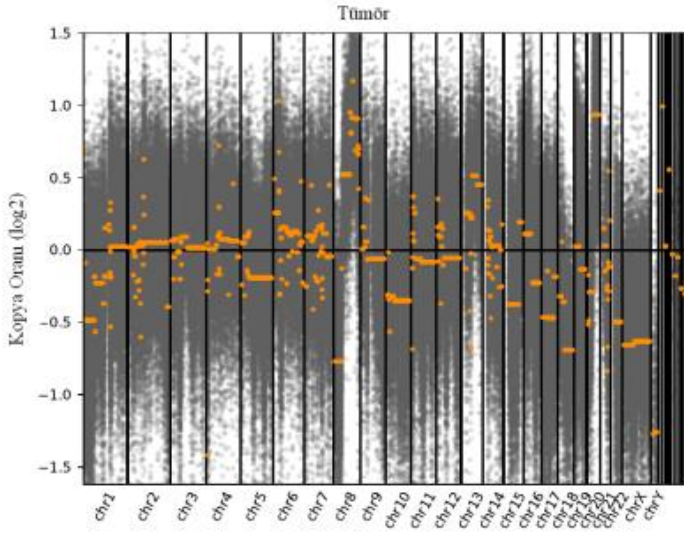
İkinci hastanın tüm doku örneklerinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri (çizim 10), sırasıyla mikroçevre dokusu, polip dokusu, primer tümör ve metastaz dokusu kopya sayısı değişim tablosu ve frekans aralıkları Çizim 11’de yer almaktadır.



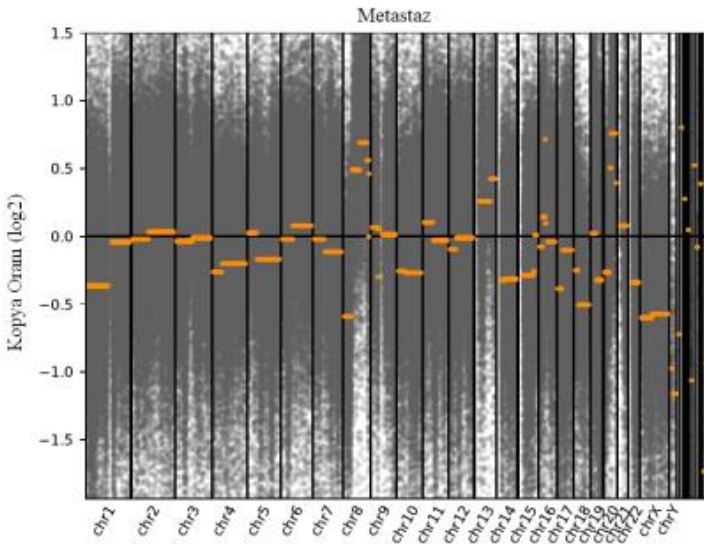
Çizim 4.10 İkinci hastanın tüm doku örneklerinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.11.a İkinci Hasta Somatik Veri Mikrocevre doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.11.b İkinci Hasta Somatik Veri Primer tümör doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.11.c İkinci Hasta Somatik Veri Metastaz doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri

İkinci hastada prediksiyon araçları ile değerlendirilen varyant verisi sonucunda patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan ,daha önce patojen olarak tanımlanmamış, Alel Frekansı 0,05 in altında ,nadir görülen veya alel frekansı bilinmeyen toplam adet varyant tespit edildi, Sırasıyla sırasıyla mikroçevre dokusu, polip dokusu, primer tümör ve metastaz dokusunda izlenen patojen yada patojenite skoru yüksek varyasyonlar aşağıda mikroçevre dokusu için Çizelge 4.41’de; ,Primer Tümör verisi için Çizelge 4.42’de ve Metastaz dokusu için ise Çizelge 4.43’de bulunduğu kromozom, lokusu, varyasyon tipi ve fonksiyonu, allel frekansı ve bilinen varyantların Cosmic sistemindeki rs kodlu tanımları ile birlikte geniş

şekilde özetlenmiştir.

Çizelge 4.41 İkinci hasta mikroçevre dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr2-177216050-177216050	G->T	HNRNPA3	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-208346096-208346096	G->T	PIKFYVE	Exonic - Stopgain	.	.
chr3-10064724-10064724	C->T	FANCD2	İntronic	0.0003	rs4019784
chr4-36290455-36290455	G->T	DTHD1	Exonic - Stopgain	.	.
chr4-93455745-93455745	C->A	GRID2	Exonic - Stopgain	.	.
chr4-122935800-122935800	G->T	SPATA5	Exonic - Stopgain	.	.
chr5-55963467-55963467	G->T	IL6ST	Exonic - Stopgain	.	.
chr5-66054931-66054931	G->T	ERBIN	Exonic - Stopgain	.	.
chr5-146223513-146223513	G->T	RBM27	Exonic - Stopgain	.	.
chr6-15593088-15593088	->>A	DTNBP1	İntronic	2.26E-01	rs199770715
chr9-6588653-6588653	T->A	GLDC	Exonic - Stopgain	.	.
chr12-6593197-6593197	A->G	CHD4	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr12-6593204-6593204	C->A	CHD4	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr12-10129988-10129988	G->T	CLEC7A	Exonic - Stopgain	.	.
chr12-67299047-67299047	G->T	CAND1	Exonic - Stopgain	.	.
chr13-32354916-32354916	G->T	BRCA2	Exonic - Stopgain	4.07E-06	rs200078639
chr14-49709174-49709174	G->T	KLHDC1	Exonic - Stopgain	.	.
chr14-92154379-92154379	G->T	CPSF2	Exonic - Stopgain	.	.
chr21-33343373-33343373	T->A	IFNAR1	Exonic - Stopgain	.	.
chrX-21977080-21977080	G->T	SMS	Exonic - Stopgain	.	.
chrX-51744610-51744610	G->T	GSPT2	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.

Çizelge 4.42 İkinci hasta primer tümör dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr1-11794419-11794419	T->G	MTHFR	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.2902	rs1801131
chr1-21833291-21833291	G->A	HSPG2	Exonic - Nonsynonymous Snv	1.10E-03	rs149159881
chr1-43317888-43317888	T->A	TIE1	Exonic - Stopgain	.	.
chr1-173573298-173573298	A->T	SLC9C2	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-141013709-141013709	C->A	LRP1B	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-165155791-165155791	G->A	SCN3A	Exonic - Stopgain	.	.
chr3-51715171-51715171	T->A	GRM2	Exonic - Stopgain	.	.
chr5-112792467-112792467	C->T	APC	Exonic - Stopgain	.	.
chr6-160080150-160080150	G->T	IGF2R	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr7-6402336-6402336	T->A	RAC1	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr8-66592451-66592451	G->A	MYBL1	Exonic - Stopgain	.	.
chr8-86668139-86668139	C->A	CNGB3	Exonic - Stopgain	.	.

chr8-103910431-103910431	G->T	RIMS2	Exonic - Stopgain	.	.
chr9-37708482-37708482	C->T	FRMPD1	Exonic - Stopgain	4.47E-05	rs756821118
chr9-127873044-127873044	T->A	AK1	Exonic - Stopgain	.	.
chr10-52771482-52771482	G->A	MBL2	Exonic - Nonsynonymous Snv	5.58E-02	rs5030737
chr10-100069757-100069757	C->T	CPN1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0423	rs61751507
chr12-2685755-2685755	G->A	CACNA1C	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0001	rs200231105
chr12-25245347-25245347	C->T	KRAS	Exonic - Nonsynonymous Snv	0	rs112445441
chr12-63150566-63150566	G->A	AVPR1A	Exonic - Stopgain	4.11E-06	rs775685841
chr15-71901322-71901322	C->A	MYO9A	Exonic - Stopgain	.	.
chr16-56343825-56343825	T->A	GNAO1	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr17-7673776-7673776	G->A	TP53	Exonic - Nonsynonymous Snv	4.06E-06	rs28934574
chr18-23539985-23539985	T->A	NPC1	Exonic - Nonsynonymous Snv	5.28E-05	rs372030650
chr18-45739310-45739310	G->T	SLC14A1	Exonic - Stopgain	.	.
chr19-12720896-12720896	G->A	TNPO2	Exonic - Stopgain	.	.
chr20-3706494-3706494	C->A	SIGLEC1	Exonic - Stopgain	0.0096	rs150358287
chr20-32434638-32434638	->->G	ASXL1	Exonic - Frameshift Insertion	0.0005	rs1085307856

Çizelge 4.43 İkinci hasta metastaz dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr1-26732676-26732676	G->T	ARID1A	Exonic - Stopgain	.	.
chr1-35414011-35414011	G->T	ZMYM4	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-27462763-27462763	G->A	IFT172	Exonic - Stopgain	1.63E-05	rs754435174
chr2-55334365-55334365	G->T	CCDC88A	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-55334624-55334624	C->A	CCDC88A	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-141013709-141013709	C->A	LRP1B	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-165155791-165155791	G->A	SCN3A	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-185796320-185796320	G->T	FSIP2	Exonic - Stopgain	.	.
chr4-24800212-24800212	C->G	SOD3	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0225	rs1799895
chr4-56017744-56017744	A->T	CEP135	Exonic - Stopgain	.	.
chr4-87612388-87612388	A->T	DSPP	Exonic - Nonsynonymous Snv	8.58E-02	rs36094464
chr4-90468341-90468341	G->T	CCSER1	Exonic - Stopgain	.	.
chr5-6632940-6632940	G->A	NSUN2	Exonic - Stopgain	.	.
chr5-40945351-40945351	G->T	C7	Exonic - Stopgain	.	.
chr5-83539874-83539874	G->T	VCAN	Exonic - Stopgain	.	.
chr7-12375142-12375142	A->T	VWDE	Exonic - Stopgain	.	.
chr8-30837609-30837609	G->T	TEX15	Exonic - Stopgain	.	.
chr8-86668139-86668139	C->A	CNGB3	Exonic - Stopgain	.	.
chr8-100528003-100528003	G->T	ANKRD46	Exonic - Stopgain	.	.
chr10-71284746-71284746	G->T	UNC5B	Exonic - Stopgain	1.72E-05	.
chr11-28082964-28082964	A->T	KIF18A	Exonic - Stopgain	.	.
chr11-102186038-102186038	G->T	YAP1	Exonic - Stopgain	.	.
chr12-25245347-25245347	C->T	KRAS	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.00E+00	rs112445441

chr12-58880668-58880668	C->A	LRIG3	Exonic - Stopgain	.	.
chr14-70593359-70593359	G->T	MED6	Exonic - Stopgain	.	.
chr14-78967227-78967227	G->T	NRXN3	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr17-7673776-7673776	G->A	TP53	Exonic - Nonsynonymous Snv	4.06E-06	rs28934574
chr17-56844158-56844158	A->->	DGKE	Exonic - Frameshift Deletion	2.72E-05	rs147972030
chr17-62586204-62586204	G->T	TLK2	Exonic - Stopgain	.	.
chr19-12720896-12720896	G->A	TNPO2	Exonic - Stopgain	.	.
chr20-32434638-32434638	->->G	ASXL1	Exonic - Frameshift İnsertion	0.0005	rs1085307856
chr21-37156888-37156888	G->T	TTC3	Exonic - Stopgain	.	.
chrX-38681246-38681246	G->T	TSPAN7	Exonic - Stopgain	.	.

İkinci hastanın normal kolon dokusu dışındaki tüm dokularında üretilen somatik ekzom dizileme verisinde Tümör Süpresör Genler APC, ARID1A, CTNNB1, FBXW7, PTEN, RET, SMAD4, TP53 ile Protoonkogenler BRAF, ERBB2, GNAS, KRAS, NRAS, PIK3CA ve mikrosatellit instabilite ile ilişkilendirilen Uygun DNA Onarım Genleri MLH1, MSH2, MSH6, PMS2'den meydana gelen varyasyonları araştırdık. Filtreleme işlemleri sonucunda herbir gende ilenen varyasyon ve mutasyonların görüldüğü dokuların listesi ve izlenen varyasyonların ayrıntıları Çizelge 4.44, Çizelge 4.45 ve Çizelge 4.46'da sırasıyla tümör süpresör genler (Çizelge 4.44.a, b), protoonkogenler (Çizelge 4.45.a, b) ve Uygun DNA Onarım genlerinde (Çizelge 4.46.a, b) izlenen tüm varyasyonları içerecek şekilde listelenmiştir.

Çizelge 4.44.a İkinci Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Genlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

Genler	Metastaz	Mikroçevre	Primer Tümör
AMER1			1
APC	1	1	4
ARID1A	2		1
DCC	4	3	6
FBXW7	1		
PTEN		1	
RET	4		
SMAD4	1		1
TGFB2	1		
TP53	1	1	3
Genel Toplam	15	6	16

Çizelge 4.44.b İkinci Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Gen Varyantları ve Özellikleri

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Fonk.refGene	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	MET	MÇ	TM
chrX	64186401	64186401	C	A	UTR3	AMER1	.	.			0,1176
chr5	112838611	112838611	A	-	eksonik	APC	Silme (Ç.K)	.	0,2381		0,1667
chr5	112827863	112827863	G	T	intronik	APC	.	.		0,1	
chr5	112792467	112792467	C	T	eksonik	APC	stopgain	.			0,2439
chr5	112783810	112783810	G	A	intronik	APC	.	0,0003			0,1818
chr5	112783800	112783800	G	A	intronik	APC	.	0,0002			0,3
chr1	26770940	26770940	G	A	intronik	ARID1A	.	.	0,1667		
chr1	26732676	26732676	G	T	eksonik	ARID1A	stopgain	.	0,2093		
chr1	26771024	26771024	A	G	intronik	ARID1A	.	.			0,7692
chr18	53467838	53467838	G	T	intronik	DCC	.	.	0,7931		
chr18	53416283	53416283	C	T	intronik	DCC	.	0,4410	0,8571		
chr18	53340056	53340077	ACACACACACACACACACAT	-	intronik	DCC	.	.	0,2	0,2	
chr18	53340054	53340077	ACACACACACACACACACAT	-	intronik	DCC	.	.	0,1667		
chr18	53415906	53415906	G	T	intronik	DCC	.	.		0,1818	
chr18	53402731	53402731	T	C	intronik	DCC	.	.		0,1364	
chr18	53340056	53340077	ACACACACACACACACACAT	-	intronik	DCC	.	.	0,2	0,2	
chr18	53410410	53410410	G	A	intronik	DCC	.	0,4514			0,8571
chr18	53397132	53397132	A	G	intronik	DCC	.	.			0,8182
chr18	53397130	53397130	T	A	intronik	DCC	.	.			0,8333
chr18	53397123	53397123	T	C	intronik	DCC	.	.			0,8333
chr18	53391941	53391941	A	G	intronik	DCC	.	.			0,9091
chr18	53205103	53205103	A	C	intronik	DCC	.	.			0,25
chr4	152330909	152330909	A	G	intronik	FBXW7	.	0,3733	0,7647		
chr10	87966951	87966951	A	T	UTR3	PTEN	.	.		0,1111	
chr10	43126769	43126769	T	C	UTR3	RET	.	0,7909	0,8667		
chr10	43118395	43118395	G	T	eksonik	RET	sinonimSNV	0,7392	0,7761		
chr10	43116417	43116417	T	C	intronik	RET	.	.	0,8235		
chr10	43100520	43100520	A	G	eksonik	RET	sinonimSNV	0,7309	0,7833		
chr18	51059736	51059736	G	T	intronik	SMAD4	.	.	0,1053		
chr18	51049150	51049150	G	T	intronik	SMAD4	.	.			0,1333
chr1	218437342	218437342	G	A	splicing	TGFB2	.	5,09E-02	0,1		
chr17	7673776	7673776	G	A	eksonik	TP53	nonsinonim SNV	4,06E-03	0,5435		0,3889
chr17	7677142	7677142	G	A	intronik	TP53	.	.		0,1818	
chr17	7674109	7674109	G	A	intronik	TP53	.	.			0,8889
chr17	7674089	7674089	A	C	intronik	TP53	.	.			0,8889
chr17	7673776	7673776	G	A	eksonik	TP53	nonsinonim SNV	4,06E-03	0,5435		0,3889

Çizelge 4.45.a İkinci Hasta Somatik Verisinde Protoonkogenlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

Genler	Metastaz	Mikroçevre	Primer Tümör
BRAF		1	
KRAS	2		1
PIK3CA		1	1
RSPO3			1
TCF7L2	2	2	
Genel Toplam	4	4	3

Çizelge 4.45.b İkinci Hasta Somatik Verisi Protoonkogen Varyantları ve Özellikleri

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Fonk.refGene	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	ME T	M Ç	TM
chr7	140734504	140734504	G	-	UTR3	BRAF	.	.		0,1176	
chr12	25245347	25245347	C	T	ekzonik	KRAS	nonsinonim SNV	0	0,193		0,5862
chr12	25205227	25205227	G	T	UTR3	KRAS	.	.		0,1	
chr12	25245347	25245347	C	T	ekzonik	KRAS	nonsinonim SNV	0	0,193		0,5862
chr3	179220053	179220053	G	T	splicing	PIK3CA	.	.			0,1364
chr3	179201610	179201610	T	-	intronik	PIK3CA	.	.			0,1935
chr6	127150401	127150401	T	G	intronik	RSPO3	.	.			0,125
chr10	113145994	113145994	G	T	intronik	TCF7L2	.	0,0004		0,1304	
chr10	113141442	113141442	G	T	intronik	TCF7L2	.	.		0,7931	
chr10	113144085	113144085	A	T	intronik	TCF7L2	.	.			0,1
chr10	113053434	113053434	G	A	intronik	TCF7L2	.	.			0,125

Çizelge 4.46.a İkinci Hasta Somatik Verisinde Uygunsuz DNA Onarım Genlerinde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

Genler	Metastaz	Mikroçevre	Primer Tümör
EPCAM		1	
MLH1	1	1	
MSH2			1
MSH6	2		1
PMS2		2	2
Genel Toplam	3	4	4

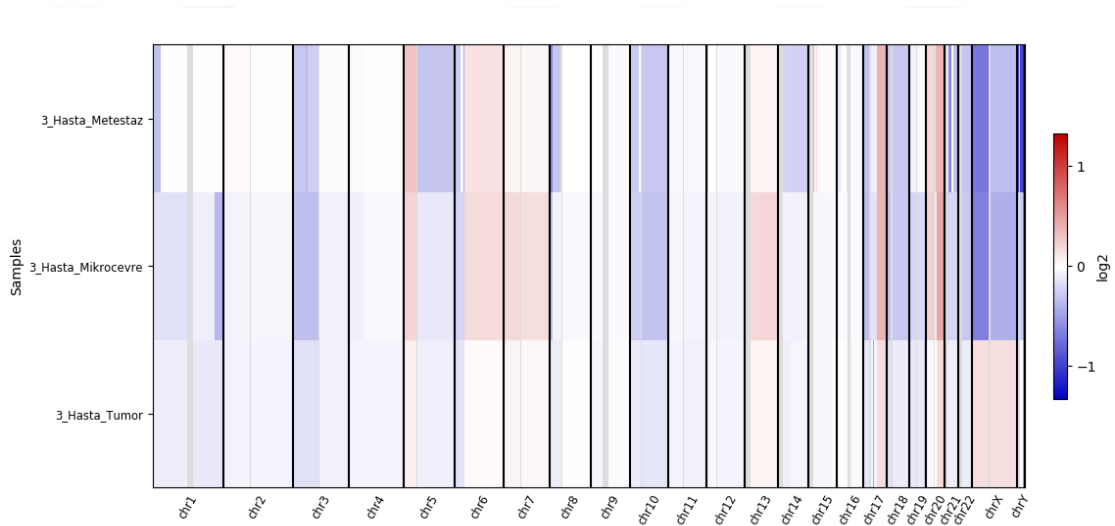
Çizelge 4.46.b İkinci Hasta Somatik Veri Uygunsuz DNA Onarım Genleri Varyantları ve Özellikleri

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Fonk.refGene	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	ME T	M Ç	TM
chr2	47385085	47385085	C	T	intronik	EPCAM	.	.			0,8182
chr3	37000868	37000868	C	T	intronik	MLH1	.	.	0,2		
chr3	37016373	37016373	C	A	intronik	MLH1	.	.			0,1111
chr2	47475312	47475312	G	T	intronik	MSH2	.	0,3229			0,1176

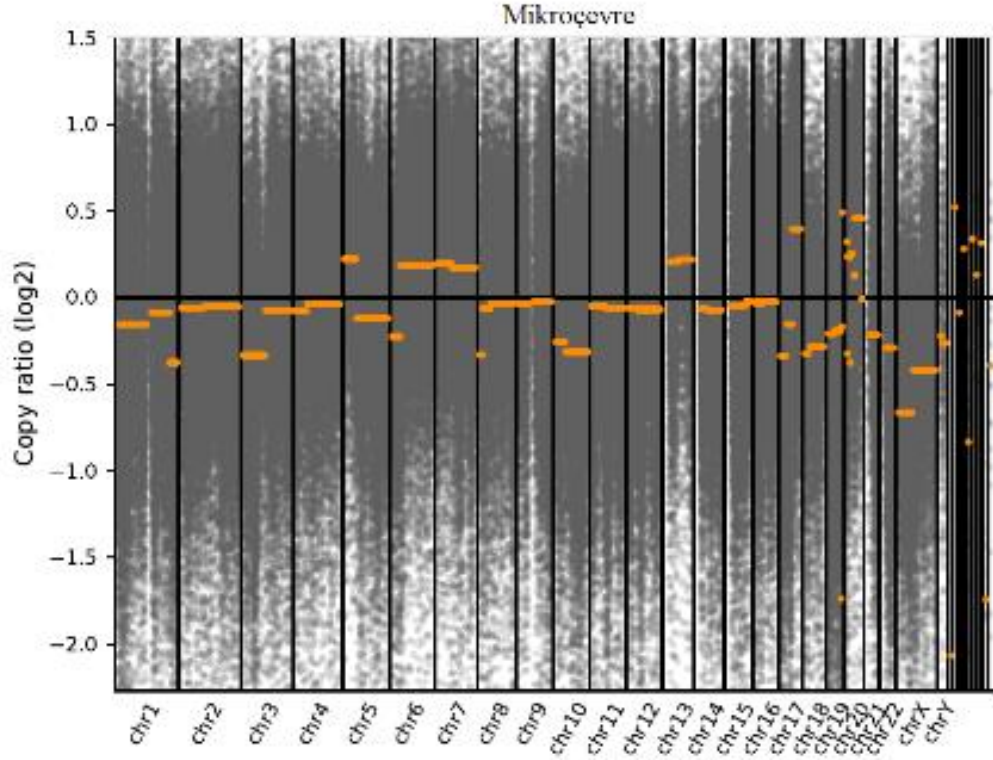
chr2	47803800	47803800	G	A	intronik	MSH6	.	.	0,1176
chr2	47791155	47791156	TG	-	intronik	MSH6	.	.	0,1739
chr2	47805739	47805739	T	A	intronik	MSH6	.	3,26E-02	0,125
chr7	6008184	6008184	A	T	intronik	PMS2	.	.	0,1176
chr7	5997117	5997117	G	T	intronik	PMS2	.	.	0,2222
chr7	5991838	5991838	-	A	intronik	PMS2	.	.	0,2
chr7	5982763	5982763	T	A	intronik	PMS2	.	.	0,1333

Hasta 3

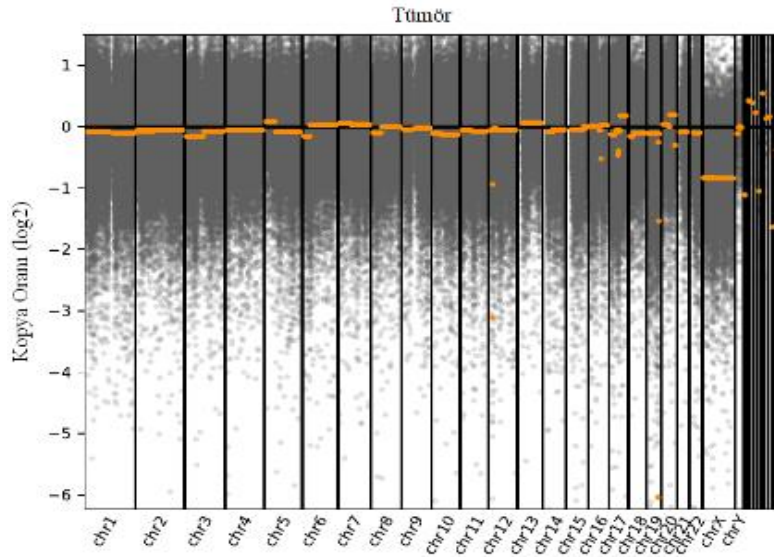
Üçüncü hastanın tüm doku örneklerinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri (Çizim 4. 12), sırasıyla mikroçevre dokusu, polip dokusu, primer tümör ve metastaz dokusu kopya sayısı değişim tablosu ve frekans aralıkları Çizim 13’de yer almaktadır.



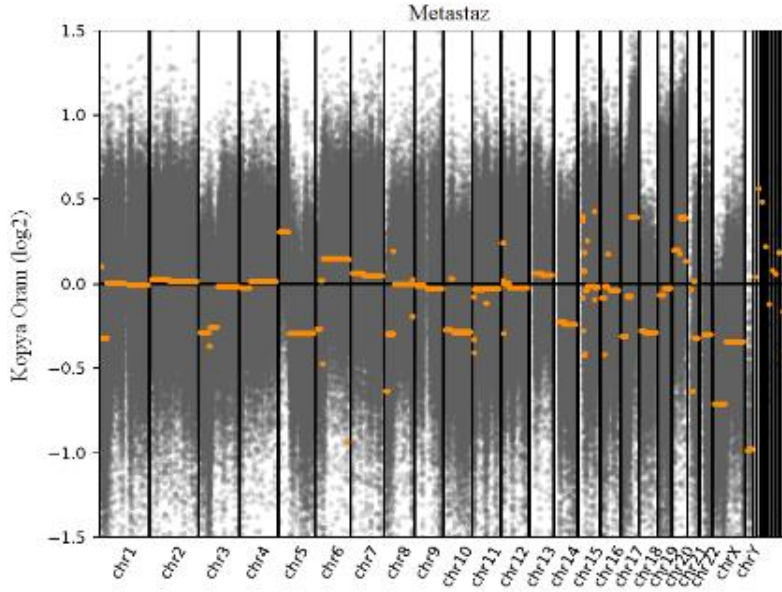
Çizim 4.12 Üçüncü hastanın tüm doku örneklerinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.13.a Üçüncü Hasta Somatik Veri Mikroçevre doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.13.b Üçüncü Hasta Somatik Veri Primer tümör doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.13.c Üçüncü Hasta Somatik Veri Metastaz doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri

Üçüncü hastada prediksyon araçları ile değerlendirilen varyant verisi sonucunda patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan ,daha önce patojen olarak tanımlanmamış, Alel Frekansı 0,05 in altında ,nadir görülen veya alel frekansı bilinmeyen toplam adet varyant tespit edildi, Sırasıyla sırasıyla mikroçevre dokusu, polip dokusu, primer tümör ve metastaz dokusunda izlenen patojen yada patojenite skoru yüksek varyasyonlar aşağıda mikroçevre dokusu için Çizelge 4.47’de; ,Primer Tümör verisi için Çizelge 4.48’de ve Metastaz dokusu için ise Çizelge 4.49’de bulunduğu kromozom, lokusu, varyasyon tipi ve fonksiyonu, alel frekansı ve bilinen varyantların Cosmic sistemindeki rs kodlu tanımları ile birlikte geniş şekilde özetlenmiştir.

Çizelge 4.47 Üçüncü hasta mikroçevre dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr1-173831529-173831529	T->G	DARS2	İntronic	0.018	rs115051769
chr1-222632197-222632197	C->T	MIA3	Exonic - Stopgain	4.06E-06	rs996625035
chr1-229286530-229286530	A->T	RAB4A	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-55336691-55336691	G->T	CCDC88A	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-160318224-160318224	A->C	RBMS1	Exonic - Stopgain	0	.
chr2-178663311-178663311	A->C	TTN	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0954	rs12994774
chr4-653934-653934	G->A	PDE6B	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0011	rs144562730
chr4-56019383-56019383	G->T	CEP135	Exonic - Stopgain	.	.
chr4-152328233-152328233	G->A	FBXW7	Exonic - Nonsynonymous Snv	4.40E-06	rs867384286
chr6-151538291-151538291	G->T	CCDC170	Exonic - Stopgain	.	.

chr8-31085235-31085235	G->T	WRN	Exonic - Stopgain	.	.
chr8-100528003-100528003	G->T	ANKRD46	Exonic - Stopgain	.	.
chr11-90206267-90206267	G->T	CHORDC1	Exonic - Stopgain	.	.
chr12-70592530-70592530	G->T	PTPRB	Exonic - Stopgain	.	.
chr12-80368270-80368270	C->A	OTOGL	Exonic - Stopgain	.	.
chr15-20534606-20534606	G->A	GOLGA6L6	Exonic - Stopgain	9.89E-05	rs752882832
chr15-41494225-41494225	G->T	ITPKA	Exonic - Stopgain	.	.
chr16-19172763-19172763	G->T	SYT17	Exonic - Stopgain	.	.
chr17-10633585-10633585	A->C	MYH3	Intronic	0.0006	rs375163919
chr17-16151950-16151950	T->A	NCOR1	Exonic - Stopgain	.	.
chr17-31330357-31330357	C->T	NF1	Exonic - Stopgain	.	rs878853904
chr17-72121501-72121501	C->A	SOX9	Exonic - Stopgain	.	.
chr21-33755347-33755347	A->G	ITSN1	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.

Çizelge 4.48 Üçüncü hasta primer tümör dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr1-32158352-32158352	T->A	KPNA6	Exonic - Stopgain	.	.
chr1-230939478-230939478	C->A	TTC13	Exonic - Stopgain	.	.
chr1-237491838-237491838	G->T	RYR2	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-97805624-97805624	G->T	TMEM131	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-172077855-172077855	G->T	METAP1D	Exonic - Stopgain	.	.
chr4-13604943-13604943	C->A	BOD1L1	Exonic - Stopgain	.	.
chr4-78878825-78878825	G->T	BMP2K	Exonic - Stopgain	.	.
chr5-73857666-73857666	G->T	ARHGEF28	Exonic - Stopgain	.	.
chr5-143400196-143400196	G->T	NR3C1	Exonic - Stopgain	.	.
chr6-12129861-12129861	G->T	HIVEP1	Exonic - Stopgain	.	.
chr9-95972350-95972350	G->T	ERCC6L2	Exonic - Stopgain	.	.
chr9-125171086-125171086	T->C	PPP6C	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr11-14294517-14294517	G->T	RRAS2	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr11-89801809-89801809	G->A	TRIM49	Exonic - Stopgain	3.00E-04	.
chr11-125905585-125905585	G->T	DDX25	Exonic - Stopgain	.	.
chr13-52011455-52011455	->>CGGCG	ATP7B	Utr5	.	rs148013251
chr16-47365812-47365812	C->A	ITFG1	Exonic - Stopgain	.	.
chr17-7890598-7890598	C->T	CHD3	Exonic - Stopgain	.	.
chr17-72121501-72121501	C->A	SOX9	Exonic - Stopgain	.	.
chr19-3094733-3094733	C->T	GNA11	Exonic - Stopgain	.	.

Çizelge 4.49 Üçüncü hasta metastaz dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr1-35015085-35015085	G->T	ZMYM6	Exonic - Stopgain	.	.
chr1-222632197-222632197	C->T	MIA3	Exonic - Stopgain	4.06E-06	rs996625035
chr1-228414710-228414710	G->T	TRIM17	Exonic - Stopgain	.	.
chr3-49721975-49721975	A->C	GMPPB	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr4-653934-653934	G->A	PDE6B	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0011	rs144562730
chr4-152328233-152328233	G->A	FBXW7	Exonic - Nonsynonymous Snv	4.40E-06	rs867384286
chr6-151538291-151538291	G->T	CCDC170	Exonic - Stopgain	.	.
chr7-99855666-99855666	T->A	CYP3A43	Exonic - Stopgain	4.91E-05	rs759645964
chr10-47325585-47325585	T->G	GDF2	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr10-124682196-124682196	G->T	FAM53B	Exonic - Stopgain	.	.
chr12-80368270-80368270	C->A	OTOGL	Exonic - Stopgain	.	.
chr15-20534606-20534606	G->A	GOLGA6L6	Exonic - Stopgain	9.89E-05	rs752882832
chr17-18126364-18126364	C->T	MYO15A	Exonic - Synonymous Snv	0.0024	rs148723625
chr17-29110457-29110457	G->T	MYO18A	Exonic - Stopgain	.	.
chr17-72121501-72121501	C->A	SOX9	Exonic - Stopgain	.	.
chr18-48670742-48670742	C->T	CTIF	Exonic - Stopgain	.	.
chr19-6826650-6826650	C->A	VAV1	Exonic - Stopgain	.	.
chr19-18862016-18862016	G->T	UPF1	Exonic - Stopgain	.	.
chr22-30287446-30287446	G->T	CASTOR1	Exonic - Stopgain	.	.
chrX-48478697-48478697	A->G	FTSJ1	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.

Üçüncü hastanın normal kolon dokusu dışındaki tüm dokularında üretilen somatik ekzom dizileme verisinde Tümör Süpresör Genler APC, ARID1A, CTNNB1, FBXW7, PTEN, RET, SMAD4, TP53 ile Protoonkogenler BRAF, ERBB2, GNAS, KRAS, NRAS, PIK3CA ve mikrosatellit instabilite ile ilişkilendirilen Uygun DNA Onarım Genleri MLH1, MSH2, MSH6, PMS2'den meydana gelen varyasyonları araştırdık. Filtreleme işlemleri sonucunda herbir gende ilenen varyasyon ve mutasyonların görüldüğü dokuların listesi ve izlenen varyasyonların ayrıntıları Çizelge 4.50, Çizelge 4.51 ve Çizelge 4.52'da sırasıyla tümör süpresör genler (Çizelge 4.50.a, b), protoonkogenler (Çizelge 4.51.a, b) ve Uygun DNA Onarım genlerinde (Çizelge 4.52.a, b) izlenen tüm varyasyonları içerecek şekilde listelenmiştir.

Çizelge 4.50.a Üçüncü Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Genlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

Genler	Metastaz	Mikroçevre	Primer Tümör
AMER1	1		
APC	1	2	1
ARID1A		1	
CTNNB1		1	
DCC		1	1
FBXW7	1	1	
MIR548F3			1
PTEN	1	2	
RET	1		
SMAD4		1	
TGFB2			1
TP53	1	1	
Genel Toplam	6	10	4

Çizelge 4.50.b Üçüncü Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Gen Varyantları ve Özellikleri

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Fonk.refGene	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	MET	MÇ	TM
chrX	64186069	64186069	T	A	UTR3	AMER1	.	.	0,1333		
chr5	112839793	112839793	C	A	ekzonik	APC	stopgain	.	0,3333	0,2619	
chr5	112775606	112775606	T	C	intronik	APC	.	.		0,1176	
chr5	112844733	112844733	G	T	UTR3	APC	.	.			0,25
chr1	26771364	26771364	G	T	intronik	ARID1A	.	.		0,1	
chr3	41239573	41239573	T	C	UTR3	CTNNB1	.	.		0,1111	
chr18	53526848	53526848	-	CACCCCAGGC	intronik	DCC	.	.		0,8571	
chr18	53339570	53339570	G	T	intronik	DCC	.	.			0,1818
chr4	152328233	152328233	G	A	ekzonik	FBXW7	nonsinonim SNV	4,40E-03	0,3333	0,3226	
chr1	218440997	218440997	G	A	ncRNA intronik	MIR548F3	.	.			0,125
chr10	87966988	87966988	T	C	UTR3	PTEN	.	.	0,8085		
chr10	87930986	87930986	-	T	intronik	PTEN	.	.		0,2222	
chr10	87894199	87894199	A	G	intronik	PTEN	.	.		0,1429	
chr10	43116778	43116778	C	T	intronik	RET	.	0,2076	0,8571		
chr18	51058483	51058483	-	TT	intronik	SMAD4	.	0,0002		0,1111	
chr1	218363192	218363192	C	T	intronik	TGFB2	.	.			0,1538
chr17	7676025	7676025	-	GCAAGAA	ekzonik	TP53	Eklenme(Ç.K)	.	0,4615	0,1935	

Çizelge 4.51.a Üçüncü Hasta Somatik Verisinde Protoonkogenlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

Genler	Metastaz	Mikroçevre	Primer Tümör
BRAF			1
GNAS	1		1
NRAS		1	
PIK3CA		2	2
RSPO2	1	1	1
SOX9	2	1	2
TCF7L2	2	2	1
Genel Toplam	6	7	8

Çizelge 4.51.b Üçüncü Hasta Somatik Verisi Protoonkogen Varyantları ve Özellikleri

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Fonk.refGene	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	ME T	M Ç	TM
chr7	140808467	140808467	A	T	intronik	BRAF	.	.			0,1053
chr20	58905209	58905209	T	A	intronik	GNAS	.	.	0,1111		
chr20	58892116	58892116	G	T	intronik	GNAS	.	.			0,1538
chr1	114707684	114707684	-	A	UTR3	NRAS	.	.			0,1463
chr3	179230647	179230647	A	G	intronik	PIK3CA	.	.			0,25
chr3	179230646	179230646	C	T	intronik	PIK3CA	.	.			0,25
chr3	179209376	179209376	C	T	intronik	PIK3CA	.	.			0,25
chr3	179209357	179209357	C	T	intronik	PIK3CA	.	.			0,25
chr8	107900359	107900359	G	A	UTR3	RSPO2	.	.	0,1		
chr8	107988593	107988593	C	A	intronik	RSPO2	.	.			0,1111
chr8	107988475	107988475	T	A	intronik	RSPO2	.	.			0,1304
chr17	72124020	72124020	-	GCCGG	ekzonik	SOX9	Eklenme(Ç.K)	.	0,1765		
chr17	72121501	72121501	C	A	ekzonik	SOX9	stopgain	.	0,4634	0,384	0,259
chr17	72125373	72125373	G	T	UTR3	SOX9	.	.			0,2
chr10	113037608	113037608	T	C	intronik	TCF7L2	.	.	0,8095	0,8571	
chr10	112964484	112964484	A	C	intronik	TCF7L2	.	.	0,7826	0,8529	
chr10	113145973	113145973	T	C	intronik	TCF7L2	.	0,0030			0,1111

Çizelge 4.52.a Üçüncü Hasta Somatik Verisinde Uygunsuz DNA Onarım Genlerinde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

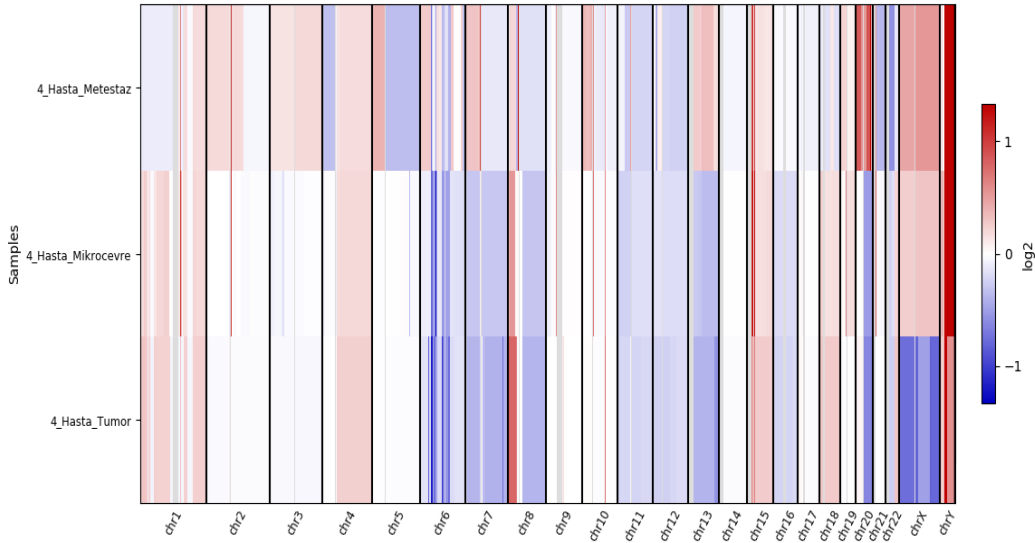
Genler	Metastaz	Mikroçevre
EPCAM	1	
MSH2		3
PMS2	1	1
POLE	1	
Genel Toplam	3	4

Çizelge 4.52.b Üçüncü Hasta Somatik Veri Uygunsuz DNA Onarım Genleri Varyantları ve Özellikleri

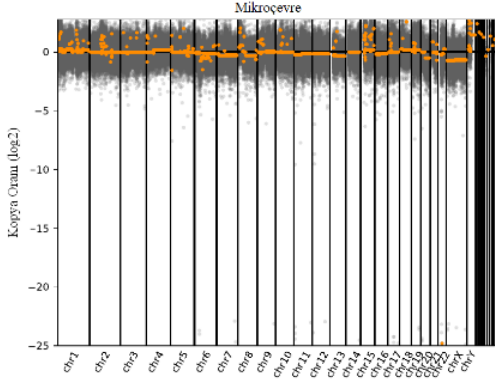
Kromozom	Başlangıç	Sonlam	Referans	Değişim	Fonk.refGene	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	ME T	M Ç	T M
chr2	47375033	47375033	A	C	intronik	EPCAM	.	.	0,1176		
chr2	47416607	47416607	-	T	intronik	MSH2	.	.		0,375	
chr2	47416587	47416587	G	A	intronik	MSH2	.	.		0,1667	
chr2	47408404	47408404	C	A	ekzonik	MSH2	nonsinonim SNV	.		0,1	
chr7	5992164	5992164	T	A	intronik	PMS2	.	.	0,1667		
chr7	5995466	5995466	C	A	intronik	PMS2	.	.		0,1	
chr12	132641691	132641691	G	A	ekzonik	POLE	sinonim SNV	0.0059	1		

Hasta 4

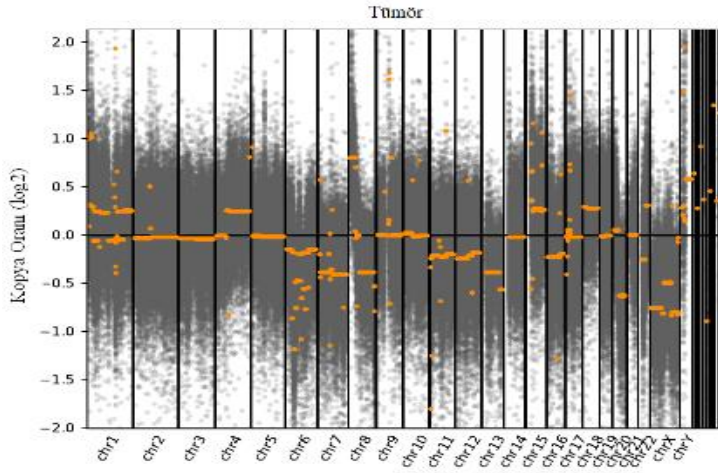
Dördüncü hastanın tüm doku örneklerinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri (Çizim 4.14), sırasıyla mikroçevre dokusu, polip dokusu, primer tümör ve metastaz dokusu kopya sayısı değişim tablosu ve frekans aralıkları Çizim 4.15’de yer almaktadır.



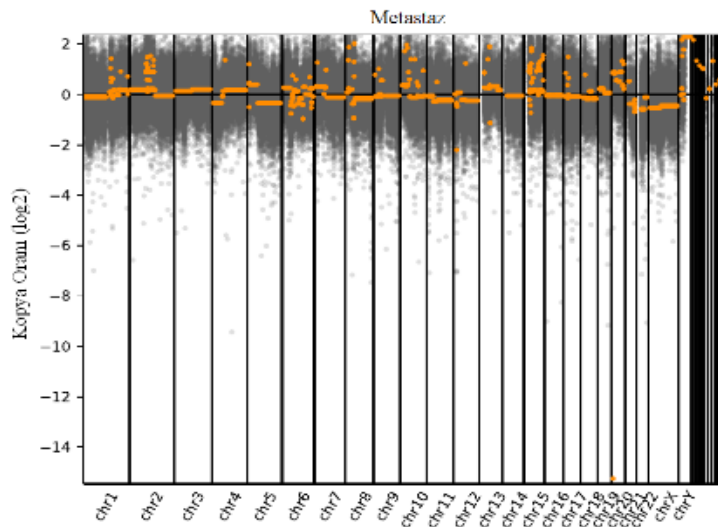
Çizim 4.14 Dördüncü hastanın tüm doku örneklerinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.15.a Dördüncü Hasta Somatik Veri Mikroçevre doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.15.b Dördüncü Hasta Somatik Veri Primer tümör doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.15.c Hasta Somatik Veri Metastaz doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri

Dördüncü hastada prediksiyon araçları ile değerlendirilen varyant verisi sonucunda patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan ,daha önce patojen olarak tanımlanmamış, Alel Frekansı 0,05 in altında ,nadir görülen veya alel frekansı bilinmeyen toplam adet varyant tespit edildi, Sırasıyla sırasıyla mikroçevre dokusu, polip dokusu, primer tümör ve metastaz dokusunda izlenen patojen yada patojenite skoru yüksek varyasyonlar aşağıda mikroçevre dokusu için Çizelge 4.53’de; ,Primer Tümör verisi için Çizelge 4.54’de ve Metastaz dokusu için ise Çizelge 4.55’de bulunduğu kromozom, lokusu, varyasyon tipi ve fonksiyonu, alel frekansı ve bilinen varyantların Cosmic sistemindeki rs kodlu tanımları ile birlikte geniş şekilde özetlenmiştir

Çizelge 4.53 Dördüncü hasta mikroçevre dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr1-11794419-11794419	T->G	MTHFR	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.2902	rs1801131
chr1-17027802-17027802	A->G	SDHB	Exonic - Nonsynonymous Snv	1.22E-02	rs33927012
chr1-22906853-22906853	G->A	EPHB2	Exonic - Nonsynonymous Snv	3.50E-03	rs28936395
chr1-32204044-32204044	C->T	CCDC28B	Exonic - Synonymous Snv	0.0115	rs41263993
chr1-46405089-46405089	C->A	FAAH	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.236	rs324420
chr1-94047009-94047009	C->T	ABCA4	Exonic - Nonsynonymous Snv	3.04E-02	rs1801581
chr1-158654738-158654738	G->T	SPTA1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0331	rs35948326
chr1-161040972-161040972	C->T	USF1	Intronic	.	rs2073658
chr1-179889309-179889309	G->A	TOR1AIP1	Splicing	6.51E-01	rs2245425
chr1-182586014-182586014	C->A	RNASEL	Exonic - Stopgain	3.60E-03	rs74315364
chr1-185734893-185734893	G->T	HMCN1	Exonic - Synonymous Snv	3.40E-03	rs115169621
chr1-231272345-231272345	A->G	GNPAT	Exonic - Nonsynonymous Snv	1.63E-01	rs11558492
chr2-21008515-21008515	T->G	APOB	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0088	rs2163204
chr2-149571135-149571135	G->C	MMADHC	Exonic - Nonsynonymous Snv	2.00E-03	rs141093638
chr2-151499371-151499371	A->G	NEB	Exonic - Nonsynonymous Snv	1.00E-04	rs200269437
chr2-178532039-178532039	C->T	TTN	Exonic - Nonsynonymous Snv	1.27E-02	rs68080670
chr2-201209375-201209375	G->A	CASP10	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0422	rs13010627
chr2-227054742-227054742	T->A	COL4A4	Intronic	0.0114	rs1800519
chr2-240758467-240758467	G->A	KIF1A	Exonic - Synonymous Snv	0.0018	rs199996308
chr3-10289773-10289773	G->T	GHRL	Exonic - Nonsynonymous Snv	8.76E-02	rs696217
chr3-108358028-108358028	G->A	HHLA2	Exonic - Stopgain	4.20E-03	rs41267017
chr3-149198428-149198428	G->A	CP	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0287	rs61733458
chr3-167566888-167566888	G->A	WDR49	Intronic	3.44E-02	rs76506630
chr4-46303716-46303716	T->C	GABRA2	Intronic	.	rs279871
chr4-47943400-47943400	T->C	CNGA1	Exonic - Synonymous Snv	0.0167	rs76061451
chr4-102905612-102905612	G->A	SLC9B1	Exonic - Stopgain	0.0002	rs200075071
chr4-102911454-102911454	G->A	SLC9B1	Exonic - Stopgain	2.51E-02	rs75599926
chr4-168685497-168685497	A->T	PALLD	Exonic - Nonsynonymous Snv	4.60E-03	rs140454899
chr5-256320-256321	CT->->	SDHA	Intronic	0	rs372662724

chr5-1216785-1216785	G->A	SLC6A19	Intronic	0.2158	rs35329108
chr5-150848436-150848436	C->T	IRGM	Exonic - Synonymous Snv	0.1649	rs10065172
chr5-157208987-157208987	G->A	ITK	Exonic - Synonymous Snv	0.0003	rs201403794
chr5-175965048-175965048	C->A	THOC3	Exonic - Stopgain	5.65E-05	rs540340981
chr6-44229658-44229658	C->T	SLC29A1	Exonic - Stopgain	0	.
chr6-46705206-46705206	A->G	PLA2G7	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.8046	rs1051931
chr6-87508882-87508882	->->CACT	SLC35A1	Intronic	.	rs10638303
chr6-135411511-135411511	T->C	AHI1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.004	rs41288013
chr6-135428747-135428747	C->T	AHI1	Exonic - Synonymous Snv	0.0037	rs41288017
chr6-149400554-149400554	G->A	SUMO4	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.5527	rs237025
chr6-151615542-151615542	G->A	CCDC170	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.3076	rs6929137
chr6-166160758-166160758	G->A	T	Intronic	.	rs3127334
chr7-4786314-4786314	G->A	AP5Z1	Exonic - Synonymous Snv	0.0173	rs117666541
chr7-150286477-150286477	G->A	ACTR3C	Exonic - Stopgain	0.0499	rs78661149
chr8-22192083-22192083	G->A	BMP1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0041	rs145284541
chr8-100709671-100709671	C->A	PABPC1	Exonic - Stopgain	0.0483	rs142985461
chr8-117172544-117172544	C->T	SLC30A8	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.2876	rs13266634
chr8-142875713-142875713	G->T	CYP11B1	Exonic - Synonymous Snv	0.0174	rs61752786
chr8-142912850-142912850	A->G	CYP11B2	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0846	rs61757294
chr9-14842660-14842660	C->G	FREM1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.019	rs41298151
chr10-52771482-52771482	G->A	MBL2	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0558	rs5030737
chr10-53822876-53822876	T->C	PCDH15	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0054	rs111033362
chr10-68885620-68885620	A->C	STOX1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.219	rs10509305
chr10-71510134-71510134	G->A	CDH23	Exonic - Synonymous Snv	0.0046	rs111033288
chr11-1759099-1759099	G->A	CTSD	Intronic	0.0054	rs141523461
chr11-46728098-46728098	G->A	F2	Exonic - Synonymous Snv	0.0657	rs5898
chr11-63083303-63083303	G->A	SLC22A24	Exonic - Stopgain	0.0253	rs77002186
chr11-89178528-89178528	C->A	TYR	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.2545	rs1042602
chr11-89803701-89803701	C->T	TRIM49	Exonic - Stopgain	0.0025	rs528076726
chr11-116820918-116820918	C->A	APOA4	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0525	rs5110
chr12-2682634-2682634	T->C	CACNA1C	Exonic - Synonymous Snv	0.0001	rs371831239
chr12-7209853-7209853	A->G	PEX5	Intronic	0.0104	rs116873137
chr12-10098846-10098846	C->G	CLEC1A	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.7536	rs2306894
chr12-52367173-52367173	C->T	KRT85	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0382	rs61630004
chr12-55688241-55688241	G->C	ITGA7	Exonic - Synonymous Snv	0.0409	rs17117883
chr13-20189313-20189313	A->G	GJB2	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0007	rs80338945
chr13-21176399-21176399	G->A	SKA3	Exonic - Stopgain	0.0907	rs61950356
chr14-67805304-67805304	C->A	ZFYVE26	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0035	rs35512910
chr14-87976368-87976368	C->T	GALC	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.1267	rs34362748
chr15-78590583-78590583	G->A	CHRNA5	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.2655	rs16969968
chr15-90811410-90811410	T->G	BLM	Intronic	0.0044	rs183176301
chr16-1571517-1571517	G->T	IFT140	Exonic - Synonymous Snv	0.0042	rs141542834
chr16-1571518-1571518	A->T	IFT140	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0042	rs150903791
chr16-4783969-4783969	C->T	SEPT12	Exonic - Synonymous Snv	0.2894	rs759991
chr16-21736318-21736318	G->T	OTOA	Exonic - Stopgain	0.0003	rs200988634
chr16-47503085-47503085	G->A	PHKB	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0018	rs144486825
chr16-89919773-89919773	G->T	MC1R	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0007	rs376670171

chr17-5582047-5582047	A->T	NLRP1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.3674	rs12150220
chr17-75840005-75840005	A->C	UNC13D	Intronic	0.0186	rs140758914
chr19-19196988-19196988	C->T	RFXANK	Exonic - Synonymous Snv	0.0528	rs72997200
chr20-25775271-25775271	C->A	FAM182B	Nerna_Exonic	0.0002	rs778175355
chr20-25775277-25775277	C->A	FAM182B	Nerna_Exonic	0.0002	rs200386240
chr20-50582818-50582818	->->G	PTPN1	Utr3	.	rs16989673
chr22-50454858-50454858	T->C	SBF1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0003	rs200488568
chrX-31478281-31478281	T->C	DMD	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0258	rs1800279
chrX-154776814-154776816	AAG->->	DKC1	Exonic - Nonframeshift Deletion	0.0043	rs782576893

Çizelge 4.54 Dördüncü hasta primer tümör dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr1-1309113-1309113	G->T	PUSL1	Exonic - Stopgain	.	.
chr1-11794419-11794419	T->G	MTHFR	Exonic - Nonsynonymous Snv	2.90E-01	rs1801131
chr1-12894694-12894694	C->T	PRAMEF10	Exonic - Stopgain	4.07E-06	rs2260233
chr1-17027802-17027802	A->G	SDHB	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0122	rs33927012
chr1-22906853-22906853	G->A	EPHB2	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0035	rs28936395
chr1-32204044-32204044	C->T	CCDC28B	Exonic - Synonymous Snv	1.15E-02	rs41263993
chr1-46405089-46405089	C->A	FAAH	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.236	rs324420
chr1-94047009-94047009	C->T	ABCA4	Exonic - Nonsynonymous Snv	3.04E-02	rs1801581
chr1-158654738-158654738	G->T	SPTA1	Exonic - Nonsynonymous Snv	3.31E-02	rs35948326
chr1-161039733-161039733	G->A	USF1	Utr3	.	rs3737787
chr1-161040972-161040972	C->T	USF1	Intronic	.	rs2073658
chr1-179889309-179889309	G->A	TOR1AIP1	Splicing	6.51E-01	rs2245425
chr1-182586014-182586014	C->A	RNASEL	Exonic - Stopgain	0.0036	rs74315364
chr1-185734893-185734893	G->T	HMCN1	Exonic - Synonymous Snv	3.40E-03	rs115169621
chr1-231272345-231272345	A->G	GNPAT	Exonic - Nonsynonymous Snv	1.63E-01	rs11558492
chr2-21008515-21008515	T->G	APOB	Exonic - Nonsynonymous Snv	8.80E-03	rs2163204
chr2-149571135-149571135	G->C	MMADHC	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.002	rs141093638
chr2-151499371-151499371	A->G	NEB	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0001	rs200269437
chr2-178532039-178532039	C->T	TTN	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0127	rs68080670
chr2-178663311-178663311	A->C	TTN	Exonic - Nonsynonymous Snv	9.54E-02	rs12994774
chr2-200569694-200569694	G->T	SGO2	Exonic - Stopgain	.	.
chr2-201209375-201209375	G->A	CASP10	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0422	rs13010627
chr2-227054742-227054742	T->A	COL4A4	Intronic	1.14E-02	rs1800519
chr2-240591746-240591746	T->C	CAPN10	Intronic	.	rs2975760
chr2-240758467-240758467	G->A	KIF1A	Exonic - Synonymous Snv	0.0018	rs199996308
chr3-10289773-10289773	G->T	GHRL	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0876	rs696217
chr3-108358028-108358028	G->A	HHLA2	Exonic - Stopgain	4.20E-03	rs41267017
chr3-149198428-149198428	G->A	CP	Exonic - Nonsynonymous Snv	2.87E-02	rs61733458
chr3-167566888-167566888	G->A	WDR49	Intronic	0.0344	rs76506630
chr3-186582056-186582056	G->T	DNAJB11	Exonic - Stopgain	.	.
chr4-46303716-46303716	T->C	GABRA2	Intronic	.	rs279871
chr4-47943400-47943400	T->C	CNGA1	Exonic - Synonymous Snv	0.0167	rs76061451
chr4-168685497-168685497	A->T	PALLD	Exonic - Nonsynonymous Snv	4.60E-03	rs140454899
chr5-1216785-1216785	G->A	SLC6A19	Intronic	0.2158	rs35329108
chr5-150848436-150848436	C->T	IRGM	Exonic - Synonymous Snv	0.1649	rs10065172
chr5-157208987-157208987	G->A	ITK	Exonic - Synonymous Snv	0.0003	rs201403794

chr5-175965048-175965048	C->A	THOC3	Exonic - Stopgain	5.65E-05	rs540340981
chr5-177093242-177093242	G->A	FGFR4	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.327	rs351855
chr6-46705206-46705206	A->G	PLA2G7	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.8046	rs1051931
chr6-87508882-87508882	->->CACT	SLC35A1	Intronic	.	rs10638303
chr6-135411511-135411511	T->C	AHI1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.004	rs41288013
chr6-135428747-135428747	C->T	AHI1	Exonic - Synonymous Snv	0.0037	rs41288017
chr6-149400554-149400554	G->A	SUMO4	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.5527	rs237025
chr6-151615542-151615542	G->A	CCDC170	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.3076	rs6929137
chr6-166160758-166160758	G->A	T	Intronic	.	rs3127334
chr7-4786314-4786314	G->A	AP5Z1	Exonic - Synonymous Snv	0.0173	rs117666541
chr7-16537681-16537681	G->A	LRRC72	Exonic - Stopgain	.	.
chr7-128948946-128948946	T->C	IRF5	Utr3	.	rs2070197
chr7-144365539-144365539	C->G	ARHGEF5	Exonic - Stopgain	0.1562	rs202036368
chr7-150286477-150286477	G->A	ACTR3C	Exonic - Stopgain	0.0499	rs78661149
chr8-22192083-22192083	G->A	BMP1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0041	rs145284541
chr8-117172544-117172544	C->T	SLC30A8	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.2876	rs13266634
chr8-142875713-142875713	G->T	CYP11B1	Exonic - Synonymous Snv	0.0174	rs61752786
chr8-142912850-142912850	A->G	CYP11B2	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0846	rs61757294
chr9-14842660-14842660	C->G	FREM1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.019	rs41298151
chr9-76707494-76707494	C->A	PRUNE2	Exonic - Stopgain	.	.
chr9-132328446-132328446	G->T	SETX	Exonic - Stopgain	.	.
chr10-52771482-52771482	G->A	MBL2	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0558	rs5030737
chr10-53822876-53822876	T->C	PCDH15	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0054	rs111033362
chr10-68885620-68885620	A->C	STOX1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.219	rs10509305
chr10-71510134-71510134	G->A	CDH23	Exonic - Synonymous Snv	0.0046	rs111033288
chr11-1759099-1759099	G->A	CTSD	Intronic	0.0054	rs141523461
chr11-27119697-27119697	G->T	BBOX1	Exonic - Stopgain	4.97E-05	rs553462118
chr11-46728098-46728098	G->A	F2	Exonic - Synonymous Snv	0.0657	rs5898
chr11-63083303-63083303	G->A	SLC22A24	Exonic - Stopgain	0.0253	rs77002186
chr11-89178528-89178528	C->A	TYR	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.2545	rs1042602
chr11-89803701-89803701	C->T	TRIM49	Exonic - Stopgain	0.0025	rs528076726
chr11-103286264-103286264	C->T	DYNC2H1	Exonic - Nonsynonymous Snv	4.08E-06	rs769053227
chr11-116820918-116820918	C->A	APOA4	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0525	rs5110
chr12-2682634-2682634	T->C	CACNA1C	Exonic - Synonymous Snv	0.0001	rs371831239
chr12-7209853-7209853	A->G	PEX5	Intronic	0.0104	rs116873137
chr12-10098846-10098846	C->G	CLEC1A	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.7536	rs2306894
chr12-21491612-21491612	->->T	RECQL	Exonic - Frameshift Insertion	9.30E-05	rs771968849
chr12-52367173-52367173	C->T	KRT85	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0382	rs61630004
chr12-55688241-55688241	G->C	ITGA7	Exonic - Synonymous Snv	0.0409	rs17117883
chr12-124363740-124363740	G->T	NCOR2	Exonic - Stopgain	.	.
chr13-20189313-20189313	A->G	GJB2	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0007	rs80338945
chr13-27255263-27255263	G->A	RPL21	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr13-109782884-109782884	C->T	IRS2	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.3505	rs1805097
chr14-67805304-67805304	C->A	ZFYVE26	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0035	rs35512910
chr14-78967227-78967227	G->T	NRXN3	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr14-87976368-87976368	C->T	GALC	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.1267	rs34362748
chr15-78590583-78590583	G->A	CHRNA5	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.2655	rs16969968
chr15-90811410-90811410	T->G	BLM	Intronic	0.0044	rs183176301
chr16-1571517-1571517	G->T	IFT140	Exonic - Synonymous Snv	0.0042	rs141542834
chr16-1571518-1571518	A->T	IFT140	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0042	rs150903791
chr16-4783969-4783969	C->T	SEPT12	Exonic - Synonymous Snv	0.2894	rs759991
chr16-47503085-47503085	G->A	PHKB	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0018	rs144486825
chr16-89919773-89919773	G->T	MC1R	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0007	rs376670171
chr17-5582047-5582047	A->T	NLRP1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.3674	rs12150220

chr17-14236764-14236764	G->A	CDRT15	Exonic - Stopgain	0.0373	rs11651890
chr17-75840005-75840005	A->C	UNC13D	Intronic	0.0186	rs140758914
chr19-19196988-19196988	C->T	RFXANK	Exonic - Synonymous Snv	0.0528	rs72997200
chr19-19795116-19795116	G->T	ZNF506	Exonic - Stopgain	.	.
chr19-45179774-45179774	G->T	BLOC1S3	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0017	rs201502372
chr19-48729264-48729264	C->T	RASIP1	Exonic - Stopgain	0	.
chr20-50582818-50582818	->->G	PTPN1	Utr3	.	rs16989673
chr22-50064040-50064040	A->G	MLC1	Exonic - Synonymous Snv	.	rs11568190
chr22-50454858-50454858	T->C	SBF1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0003	rs200488568
chrX-31478281-31478281	T->C	DMD	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0258	rs1800279

Çizelge 4.55 Dördüncü hasta metastaz dokusu eksom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr1-11794419-11794419	T->G	MTHFR	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.2902	rs1801131
chr1-17027802-17027802	A->G	SDHB	Exonic - Nonsynonymous Snv	1.22E-02	rs33927012
chr1-22906853-22906853	G->A	EPHB2	Exonic - Nonsynonymous Snv	3.50E-03	rs28936395
chr1-46405089-46405089	C->A	FAAH	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.236	rs324420
chr1-94047009-94047009	C->T	ABCA4	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0304	rs1801581
chr1-158654738-158654738	G->T	SPTA1	Exonic - Nonsynonymous Snv	3.31E-02	rs35948326
chr1-161040972-161040972	C->T	USF1	Intronic	.	rs2073658
chr1-179889309-179889309	G->A	TOR1AIP1	Splicing	6.51E-01	rs2245425
chr1-182586014-182586014	C->A	RNASEL	Exonic - Stopgain	3.60E-03	rs74315364
chr1-185734893-185734893	G->T	HMCN1	Exonic - Synonymous Snv	3.40E-03	rs115169621
chr1-231272345-231272345	A->G	GNPAT	Exonic - Nonsynonymous Snv	1.63E-01	rs11558492
chr2-21008515-21008515	T->G	APOB	Exonic - Nonsynonymous Snv	8.80E-03	rs2163204
chr2-149571135-149571135	G->C	MMADHC	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.002	rs141093638
chr2-151499371-151499371	A->G	NEB	Exonic - Nonsynonymous Snv	1.00E-04	rs200269437
chr2-178532039-178532039	C->T	TTN	Exonic - Nonsynonymous Snv	1.27E-02	rs68080670
chr2-201209375-201209375	G->A	CASP10	Exonic - Nonsynonymous Snv	4.22E-02	rs13010627
chr2-227054742-227054742	T->A	COL4A4	Intronic	0.0114	rs1800519
chr2-240758467-240758467	G->A	KIF1A	Exonic - Synonymous Snv	0.0018	rs199996308
chr3-10289773-10289773	G->T	GHRL	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0876	rs696217
chr3-52515450-52515450	C->T	STAB1	Exonic - Stopgain	8,14E-03	rs934265954
chr3-108358028-108358028	G->A	HHLA2	Exonic - Stopgain	4.20E-03	rs41267017
chr3-149198428-149198428	G->A	CP	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0287	rs61733458
chr3-167566888-167566888	G->A	WDR49	Intronic	3.44E-02	rs76506630
chr4-9210677-9210677	C->G	USP17L10	Exonic - Stopgain	5.60E-03	rs368968666
chr4-46303716-46303716	T->C	GABRA2	Intronic	.	rs279871
chr4-47943400-47943400	T->C	CNGA1	Exonic - Synonymous Snv	0.0167	rs76061451
chr4-102905612-102905612	G->A	SLC9B1	Exonic - Stopgain	2.00E-04	rs200075071
chr4-102911454-102911454	G->A	SLC9B1	Exonic - Stopgain	2.51E-02	rs75599926
chr4-168685497-168685497	A->T	PALLD	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0046	rs140454899
chr5-256320-256321	CT->->	SDHA	Intronic	0	rs372662724
chr5-1216785-1216785	G->A	SLC6A19	Intronic	0.2158	rs35329108

chr5-150848436-150848436	C->T	IRGM	Exonic - Synonymous Snv	0.1649	rs10065172
chr5-157208987-157208987	G->A	ITK	Exonic - Synonymous Snv	3.00E-04	rs201403794
chr5-160640501-160640501	G->T	ATP10B	Exonic - Stopgain	.	.
chr5-175965048-175965048	C->A	THOC3	Exonic - Stopgain	5.65E-05	rs540340981
chr5-177093242-177093242	G->A	FGFR4	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.327	rs351855
chr5-178143973-178143973	G->T	RMND5B	Exonic - Stopgain	.	.
chr6-46705206-46705206	A->G	PLA2G7	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.8046	rs1051931
chr6-87508882-87508882	->->CACT	SLC35A1	Intronic	.	rs10638303
chr6-135411511-135411511	T->C	AHI1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.004	rs41288013
chr6-135428747-135428747	C->T	AHI1	Exonic - Synonymous Snv	0.0037	rs41288017
chr6-149400554-149400554	G->A	SUMO4	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.5527	rs237025
chr6-151615542-151615542	G->A	CCDC170	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.3076	rs6929137
chr6-166160758-166160758	G->A	T	Intronic	.	rs3127334
chr7-4786314-4786314	G->A	AP5Z1	Exonic - Synonymous Snv	0.0173	rs117666541
chr7-150286477-150286477	G->A	ACTR3C	Exonic - Stopgain	0.0499	rs78661149
chr8-22192083-22192083	G->A	BMP1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0041	rs145284541
chr8-29167405-29167405	C->A	KIF13B	Exonic - Stopgain	.	.
chr8-100709671-100709671	C->A	PABPC1	Exonic - Stopgain	0.0483	rs142985461
chr8-117172544-117172544	C->T	SLC30A8	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.2876	rs13266634
chr8-138878162-138878162	G->T	COL22A1	Exonic - Stopgain	.	.
chr8-142875713-142875713	G->T	CYP11B1	Exonic - Synonymous Snv	0.0174	rs61752786
chr8-142912850-142912850	A->G	CYP11B2	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0846	rs61757294
chr9-14842660-14842660	C->G	FREM1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.019	rs41298151
chr10-52771482-52771482	G->A	MBL2	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0558	rs5030737
chr10-53822876-53822876	T->C	PCDH15	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0054	rs111033362
chr10-68885620-68885620	A->C	STOX1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.219	rs10509305
chr10-71510134-71510134	G->A	CDH23	Exonic - Synonymous Snv	0.0046	rs111033288
chr10-90918984-90919001	ATAAATA AATATAT ATAT->->	ANKRD1	Intronic	0.5613	rs72003210
chr11-1759099-1759099	G->A	CTSD	Intronic	0.0054	rs141523461
chr11-46728098-46728098	G->A	F2	Exonic - Synonymous Snv	0.0657	rs5898
chr11-63083303-63083303	G->A	SLC22A24	Exonic - Stopgain	0.0253	rs77002186
chr11-89178528-89178528	C->A	TYR	Exonic - Nonsynonymous Snv	2.55E-01	rs1042602
chr11-89803701-89803701	C->T	TRIM49	Exonic - Stopgain	0.0025	rs528076726
chr11-116820918-116820918	C->A	APOA4	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0525	rs5110
chr12-2682634-2682634	T->C	CACNA1C	Exonic - Synonymous Snv	0.0001	rs371831239
chr12-7209853-7209853	A->G	PEX5	Intronic	0.0104	rs116873137
chr12-7770103-7770103	C->T	NANOGNB	Exonic - Stopgain	5.00E-04	rs185000545
chr12-10098846-10098846	C->G	CLEC1A	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.7536	rs2306894
chr12-52367173-52367173	C->T	KRT85	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0382	rs61630004
chr12-55688241-55688241	G->C	ITGA7	Exonic - Synonymous Snv	0.0409	rs17117883
chr12-57143694-57143694	G->A	LRP1	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr12-57209170-57209170	A->C	LRP1	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr13-20189313-20189313	A->G	GJB2	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0007	rs80338945
chr13-21176399-21176399	G->A	SKA3	Exonic - Stopgain	0.0907	rs61950356
chr14-67805304-67805304	C->A	ZFYVE26	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0035	rs35512910

chr14-87950752-87950752	A->>	GALC	Intronic	0.9749	rs11300320
chr14-87976368-87976368	C->T	GALC	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.1267	rs34362748
chr14-94614929-94614929	C->A	SERPINA3	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.
chr15-78590583-78590583	G->A	CHRNA5	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.2655	rs16969968
chr15-90811410-90811410	T->G	BLM	Intronic	0.0044	rs183176301
chr16-1571517-1571517	G->T	IFT140	Exonic - Synonymous Snv	0.0042	rs141542834
chr16-1571518-1571518	A->T	IFT140	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0042	rs150903791
chr16-4783969-4783969	C->T	SEPT12	Exonic - Synonymous Snv	0.2894	rs759991
chr16-23700571-23700571	G->C	ERN2	Exonic - Stopgain	.	.
chr16-47503085-47503085	G->A	PHKB	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0018	rs144486825
chr16-89919773-89919773	G->T	MC1R	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0007	rs376670171
chr17-5582047-5582047	A->T	NLRP1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.3674	rs12150220
chr17-7674945-7674945	G->A	TP53	Exonic - Stopgain	4.06E-06	rs397516435
chr17-7770262-7770262	C->T	DNAH2	Exonic - Stopgain	.	.
chr17-40751230-40751230	G->A	KRT25	Exonic - Stopgain	4.06E-06	.
chr17-75559349-75559349	C->T	LLGL2	Exonic - Stopgain	.	.
chr17-75840005-75840005	A->C	UNC13D	Intronic	0.0186	rs140758914
chr19-19196988-19196988	C->T	RFXANK	Exonic - Synonymous Snv	0.0528	rs72997200
chr19-36073536-36073536	->>C	WDR62	Intronic	.	rs373693641
chr19-45179774-45179774	G->T	BLOC1S3	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0017	rs201502372
chr20-50582818-50582818	->>G	PTPN1	Utr3	.	rs16989673
chr22-50064040-50064040	A->G	MLC1	Exonic - Synonymous Snv	.	rs11568190
chr22-50454858-50454858	T->C	SBF1	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0003	rs200488568
chrX-31478281-31478281	T->C	DMD	Exonic - Nonsynonymous Snv	0.0258	rs1800279

Dördüncü hastanın normal kolon dokusu dışındaki tüm dokularında üretilen somatik ekzom dizileme verisinde Tümör Süpresör Genler APC, ARID1A, CTNBN1, FBXW7, PTEN, RET, SMAD4, TP53 ile Protoonkogenler BRAF, ERBB2, GNAS, KRAS, NRAS, PIK3CA ve mikrosatellit instabilite ile ilişkilendirilen Uygunuz DNA Onarım Genleri MLH1, MSH2, MSH6, PMS2'den meydana gelen varyasyonları araştırdık. Filtreleme işlemleri sonucunda herbir gende ilenen varyasyon ve mutasyonların görüldüğü dokuların listesi ve izlenen varyasyonların ayrıntıları Çizelge 4.56, Çizelge 4.57 ve Çizelge 4.58'da sırasıyla tümör süpresör genler (Çizelge 4.56.a, b), protoonkogenler (Çizelge 4.57.a, b) ve Uygunuz DNA Onarım genlerinde (Çizelge 4.58.a, b) izlenen tüm varyasyonları içerecek şekilde listelenmiştir.

Çizelge 4.56.a Dördüncü Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Genlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

Genler	Metastaz	Mikroçevre	Primer Tümör
AMER1	2	2	2
APC	3	2	3
ARID1A	1	2	1
CTNNB1	2	1	1
DCC	19	17	15
FBXW7			1
PTEN	4		
RET	2	5	6
SMAD4	3	3	3
TGFB2	4	4	4
TP53	3	4	4
Genel Toplam	43	40	40

Çizelge 4.56.b Dördüncü Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Gen Varyantları ve Özellikleri

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Fonk.refGene	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	MET	MÇ	TM
1	26732489	26732489	G	T	intronik	ARID1A	.	.			0,125
1	26774592	26774592	T	C	ekzonik	ARID1A	sinonim SNV	.		0,1	
1	26775441	26775441	G	T	intronik	ARID1A	.	.		0,1176	
1	26781126	26781126	C	A	UTR3	ARID1A	.	.	0,1		
1	218346586	218346586	-	AAAC	UTR5	TGFB2	.	.	0,1818	0,25	0,5
1	218385690	218385690	G	A	intronik	TGFB2	.	.	0,4	0,3784	0,3836
1	218385783	218385783	T	A	intronik	TGFB2	.	.	0,2381	0,3846	0,3654
1	218435878	218435878	A	G	intronik	TGFB2	.	.	0,2581	0,5312	0,6296
3	41239923	41239923	T	A	UTR3	CTNNB1	.	.	0,2		
3	41240109	41240109	-	TAAT	UTR3	CTNNB1	.	.	0,3629	0,3853	0,2609
4	152322298	152322298	G	T	UTR3	FBXW7	.	.			0,1
5	112707687	112707687	T	G	UTR5	APC	.	0,0883	0,5652	0,5	0,5
5	112839890	112839890	A	-	ekzonik	APC	silinme(C.K)	.	0,2692		
5	112844560	112844560	C	T	UTR3	APC	.	.	0,6833	0,4854	0,3333
5	112845586	112845586	C	T	UTR3	APC	.	.			0,4706
10	43100333	43100333	G	T	intronik	RET	.	.			1
10	43100758	43100758	A	C	intronik	RET	.	4,52E-02		0,1111	
10	43100811	43100811	G	T	intronik	RET	.	.		0,2222	
10	43105416	43105416	A	T	intronik	RET	.	.			1
10	43111239	43111239	A	G	ekzonik	RET	sinonim SNV	0,6956	1	1	1
10	43112702	43112702	G	C	intronik	RET	.	.			1
10	43116417	43116417	T	C	intronik	RET	.	.	1	1	1
10	43125103	43125103	G	A	intronik	RET	.	.		1	1
10	87960902	87960902	G	T	ekzonik	PTEN	nonsinonim SNV	3,983e-05	0,1765		

10	87966104	87966104	C	T	UTR3	PTEN	.	.	0,1034		
10	87966130	87966130	T	-	UTR3	PTEN	.	.	0,1154		
10	87966165	87966165	G	A	UTR3	PTEN	.	.	0,1739		
17	7673183	7673183	G	A	intronik	TP53	.	0,0323	0,5	0,4167	
17	7674089	7674089	A	C	intronik	TP53	.	.	0,7778	0,5172	
17	7674109	7674109	G	A	intronik	TP53	.	.	0,7	0,7222	0,4706
17	7674945	7674945	G	A	ekzonik	TP53	stopgain	4,06E-03	0,6129		
17	7677182	7677182	C	T	intronik	TP53	.	.	0,8	0,625	0,4545
18	51049019	51049019	T	C	intronik	SMAD4	.	.	0,3	0,45	
18	51058587	51058587	A	T	intronik	SMAD4	.	.	0,1538		
18	51059814	51059814	A	G	intronik	SMAD4	.	.	0,2075	0,4038	0,3182
18	51059974	51059974	C	T	intronik	SMAD4	.	.	0,1522	0,4615	0,35
18	52699628	52699628	A	T	intronik	DCC	.	.	0,1739	0,5122	0,3478
18	52923870	52923870	T	G	intronik	DCC	.	0,3653	0,7059	0,5	0,4043
18	52925130	52925130	A	C	intronik	DCC	.	.	0,6923	0,55	0,5
18	52925451	52925451	T	G	intronik	DCC	.	.	0,8125	0,6061	0,6061
18	53063111	53063111	G	T	intronik	DCC	.	.			0,1818
18	53063509	53063509	A	T	intronik	DCC	.	.	0,1026		
18	53063528	53063528	A	T	intronik	DCC	.	.	0,1471		
18	53063535	53063535	-	A	intronik	DCC	.	.	0,5		
18	53205432	53205432	G	A	intronik	DCC	.	.	0,8261	0,2857	0,3929
18	53205453	53205453	T	C	intronik	DCC	.	.	0,7778	0,4	0,28
18	53391612	53391612	C	T	intronik	DCC	.	0,4388	0,913	0,6667	0,6364
18	53391620	53391623	TTTG	-	intronik	DCC	.	0,0040	0,1071	0,3	0,3333
18	53391941	53391941	A	G	intronik	DCC	.	.	0,8846	0,64	0,4667
18	53397130	53397130	T	A	intronik	DCC	.	.	0,6667	0,5357	
18	53397132	53397132	A	G	intronik	DCC	.	.	0,7333	0,5357	
18	53410410	53410410	G	A	intronik	DCC	.	0,4514	0,7742	0,475	0,3548
18	53410624	53410624	T	C	ekzonik	DCC	sinonim SNV	0,4507	0,7241	0,4848	0,3171
18	53410656	53410656	A	G	intronik	DCC	.	0,4508	0,7059	0,5152	0,2353
18	53526526	53526526	T	A	intronik	DCC	.	.	0,24	0,5	0,4412
18	53530545	53530545	G	T	intronik	DCC	.	0,1668	0,2143	0,4054	0,5111
X	64185448	64185448	A	C	UTR3	AMER1	.	.	0,25	0,2143	
X	64185454	64185454	A	C	UTR3	AMER1	.	.	0,125	0,25	0,2727
X	64185499	64185499	T	A	UTR3	AMER1	.	.			0,2222

Çizelge 4.57.a Dördüncü Hasta Somatik Verisinde Protoonkogenlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

Genler	Metastaz	Mikroçevre	Primer Tümör
BRAF	1		1
ERBB2	3	3	4
GNAS	7	6	8
MYC	1	1	1
NDUFB2;BRAF	2	1	2
NRAS	1	1	1
RSPO2	2	1	1
RSPO3	3	3	2
SOX9	1	1	2
TCF7L2	2	2	8
Genel Toplam	23	19	30

Çizelge 4.57.b Dördüncü Hasta Somatik Verisi Protoonkogen Varyantları ve Özellikleri

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Fonk.refGene	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	MET	MÇ	TM
chr7	140734494	140734494	-	A	UTR3	BRAF	.	.	0,1538		0,1579
chr17	39709752	39709752	C	T	intronik	ERBB2	.	.			1
chr17	39712462	39712462	C	T	İntronik	ERBB2	.	0,6079	1	1	1
chr17	39723509	39723509	G	A	İntronik	ERBB2	.	0,6120	1	1	1
chr17	39727784	39727784	C	G	Ekzonik	ERBB2	nonsinonim SNV	0,6118	1	1	1
chr20	58855422	58855422	C	G	İntronik	GNAS	.	.	0,9091	0,5455	0,4878
chr20	58855687	58855687	C	T	İntronik	GNAS	.	0,0215	0,8333	0,4706	0,4569
chr20	58856110	58856110	T	C	İntronik	GNAS	.	.	0,8592	0,5	0,25
chr20	58903752	58903752	C	T	Ekzonik	GNAS	sinonim SNV	0,5416	0,2071	0,434	0,4631
chr20	58903884	58903884	G	A	İntronik	GNAS	.	.	0,8431		
chr20	58903985	58903985	A	G	İntronik	GNAS	.	.		0,25	
chr20	58904078	58904078	A	G	İntronik	GNAS	.	.			0,6923
chr20	58908893	58908893	G	A	İntronik	GNAS	.	.			1
chr20	58909030	58909030	T	C	İntronik	GNAS	.	.	0,2414	0,4667	0,4754
chr20	58910556	58910556	T	C	İntronik	GNAS	.	.	1		1
chr8	127735707	127735707	G	T	upstream	MYC	.	.	1	0,973	1
chr7	140721450	140721453	CAAA	-	İntergenik	NDUFB2;BRAF	.	.			0,3
chr7	140726457	140726457	A	G	İntergenik	NDUFB2;BRAF	.	0,3722	1	0,9808	1
chr7	140726504	140726504	G	A	İntergenik	NDUFB2;BRAF	.	.	0,3214		
chr1	114707222	114707222	G	A	UTR3	NRAS	.	.	0,6	0,6111	0,4762
chr8	107960629	107960629	T	G	İntronik	RSPO2	.	.	0,1667		
chr8	108082519	108082519	C	T	İntronik	RSPO2	.	0,2112	0,7143	0,6538	0,5102
chr6	127148899	127148899	A	G	İntronik	RSPO3	.	.	0,4839	0,4	0,3333
chr6	127148927	127148927	A	G	İntronik	RSPO3	.	.	0,4583	0,4444	0,5263

chr6	127155572	127155572	C	T	İntronik	RSPO3	.	.	1	1		
chr17	72122996	72122996	G	A	İntronik	SOX9	.	0.0007	0,625	0,45	0,4359	
chr10	113037712	113037712	C	G	İntronik	TCF7L2	.	.		0,5833	0,3182	
chr10	113130079	113130079	C	-	İntronik	TCF7L2	.	.		0,75	0,7407	
chr10	113140868	113140868	T	C	İntronik	TCF7L2	.	.			0,7	
chr10	113141436	113141436	G	-	İntronik	TCF7L2	.	.	0,6		0,4048	
chr10	113141442	113141442	G	T	İntronik	TCF7L2	.	.	0,6		0,4595	
chr10	113145969	113145969	A	C	İntronik	TCF7L2	.	0.0369			0,1	
chr10	113159831	113159833	CCC	-	İntronik	TCF7L2	.	.			0,2308	

Çizelge 4.58.a Dördüncü Hasta Somatik Verisinde Uygunsuz DNA Onarım Genlerinde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

Genler	Metastaz	Mikroçevre	Primer Tümör
MLH1		2	1
MSH2			1
MSH6	9	8	10
PMS2	18	16	19
POLE	14	17	22
Genel Toplam	41	43	53

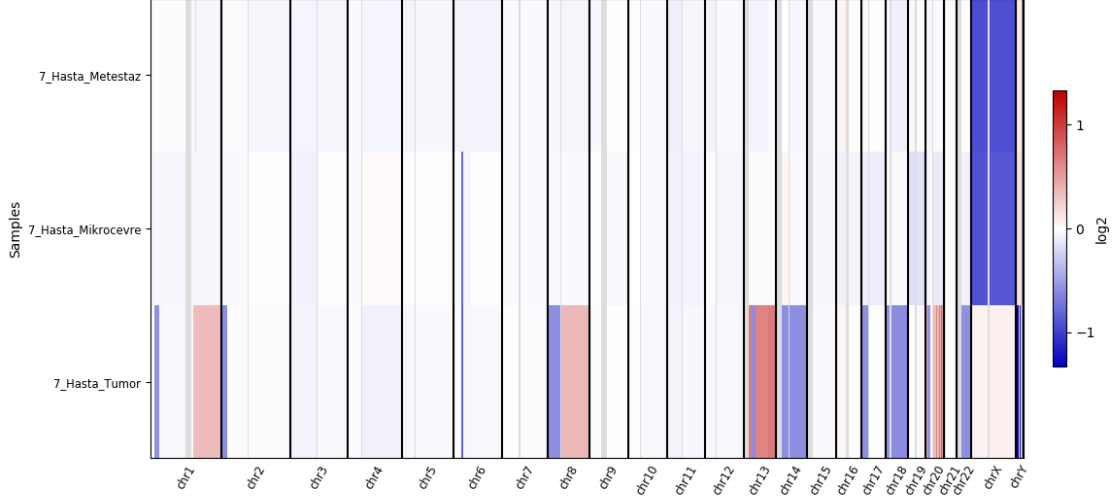
Çizelge 4.58.b Dördüncü Hasta Somatik Veri Uygunsuz DNA Onarım Genleri Varyantları ve Özellikleri

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Fonk.refGene	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	MET	MÇ	TM
chr7	5986591	5986591	-	TGA	intronik	PMS2	.	.	0,4545		0,3846
chr7	5987144	5987144	T	C	ekzonik	PMS2	nonsinonim SNV	0.8407	1	1	1
chr7	5987357	5987357	G	A	ekzonik	PMS2	nonsinonim SNV	0.3879	0,3488	0,5741	0,4455
chr7	5990059	5990059	-	T	intronik	PMS2	.	.		0,5116	0,7333
chr7	5997171	5997171	A	G	intronik	PMS2	.	.	0,3		0,5
chr7	5997232	5997232	C	A	intronik	PMS2	.	.	0,1667		
chr7	5997349	5997349	G	C	ekzonik	PMS2	sinonim SNV	0.8015	1	1	1
chr7	5998990	5998990	A	-	intronik	PMS2	.	.	0,9167	0,875	0,7308
chr7	5998990	5998990	A	-	intronik	PMS2	.	.	0,9167	0,875	0,7308
chr7	5999091	5999091	T	C	intronik	PMS2	.	0.3684	0,2963	0,4314	0,3704
chr7	6002266	6002266	T	C	intronik	PMS2	.	.	0,6788	0,4938	0,5676
chr7	6002891	6002891	C	T	intronik	PMS2	.	.	0,3333	0,5476	0,5484
chr7	6003426	6003426	A	G	intronik	PMS2	.	.	0,6383	0,4286	0,3846
chr7	6003481	6003481	C	T	intronik	PMS2	.	.	1	1	1
chr7	6005754	6005754	T	C	intronik	PMS2	.	.	0,3629	0,4978	0,5698
chr7	6006250	6006250	C	T	intronik	PMS2	.	.	0,5776	0,4156	0,4
chr7	6006303	6006303	T	C	intronik	PMS2	.	.	0,575	0,4529	0,5
chr7	6008555	6008555	G	C	intronik	PMS2	.	.	0,5455	0,56	0,4706

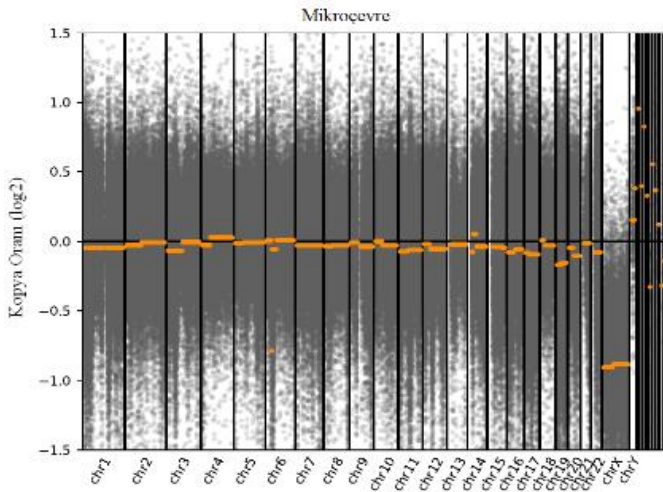
chr7	6008728	6008728	C	T	intronik	PMS2	.	.	0,6	0,3077	0,5484
chr7	6008925	6008925	G	A	UTR5	PMS2	.	.	0,5949	0,4688	0,6017
chr3	37004614	37004614	A	T	intronik	MLH1	.	.		0,1111	
chr3	37025602	37025608	ATATATA	-	intronik	MLH1	.	0,0001		0,25	
chr3	37050319	37050319	G	T	intronik	MLH1	.	.			0,1333
chr2	47414369	47414369	A	C	ekzonik	MSH2	nonsinonim SNV	.			0,1053
chr2	47783349	47783349	G	A	ekzonik	MSH6	nonsinonim SNV	0,1815	1	1	0,9944
chr2	47795761	47795761	A	G	intronik	MSH6	.	.			1
chr2	47795842	47795842	G	T	intronik	MSH6	.	.	1	1	0,9655
chr2	47803319	47803319	G	C	intronik	MSH6	.	.	1	1	1
chr2	47805474	47805474	G	A	intronik	MSH6	.	.		1	1
chr2	47805601	47805601	-	T	intronik	MSH6	.	0,2939	0,5962	0,5714	0,6061
chr2	47805619	47805619	T	G	ekzonik	MSH6	sinonim SNV	8,16E-02	0,1194		
chr2	47805736	47805739	CTAT	-	intronik	MSH6	.	0,6841	0,8651	0,819	0,8152
chr2	47805798	47805798	T	C	intronik	MSH6	.	.	1	1	1
chr2	47806412	47806412	C	G	intronik	MSH6	.	0,7333	1	1	1
chr2	47806752	47806752	T	-	intronik	MSH6	.	.	0,4545		0,5455
chr12	132624855	132624863	AGGAGGCCA	-	intronik	POLE	.	4,58E-03	0,3714	0,4545	0,3664
chr12	132624857	132624857	G	C	intronik	POLE	.	3,44e-05	0,3333	0,1667	0,1266
chr12	132624866	132624866	G	C	intronik	POLE	.	.	0,5	0,5	0,4153
chr12	132635579	132635579	A	G	intronik	POLE	.	.			0,5
chr12	132635796	132635796	G	A	intronik	POLE	.	.	0,625	0,2941	0,5694
chr12	132635996	132635996	G	A	ekzonik	POLE	sinonimSNV	0,1547	0,4118	0,375	0,5161
chr12	132643403	132643403	A	T	intronik	POLE	.	0,0620	0,4545	0,5455	0,519
chr12	132643644	132643644	T	G	intronik	POLE	.	.		0,3333	0,5833
chr12	132649127	132649127	C	T	intronik	POLE	.	.	0,8889	0,4167	0,5472
chr12	132664558	132664558	C	A	intronik	POLE	.	.			0,6129
chr12	132673431	132673431	C	A	intronik	POLE	.	.		0,3333	0,5217
chr12	132676210	132676210	C	G	intronik	POLE	.	0,6235	1	1	1
chr12	132676361	132676361	T	C	intronik	POLE	.	.	0,5	0,75	0,5789
chr12	132676724	132676724	A	G	intronik	POLE	.	.	0,9412	1	0,9756
chr12	132677409	132677409	G	A	ekzonik	POLE	nonsinonim SNV	0,0858	0,54	0,5714	0,4667
chr12	132677409	132677409	G	A	ekzonik	POLE	nonsinonim SNV	0,0858	0,54	0,5714	0,4667
chr12	132677409	132677409	G	A	ekzonik	POLE	nonsinonim SNV	0,0858	0,54	0,5714	0,4667
chr12	132677497	132677497	T	C	intronik	POLE	.	.	0,9722	1	1
chr12	132677943	132677943	C	G	intronik	POLE	.	.			0,75
chr12	132679884	132679884	C	T	intronik	POLE	.	.	0,5	0,5217	0,4
chr12	132680318	132680318	C	T	intronik	POLE	.	.	0,25	0,3333	0,5172
chr12	132681301	132681301	C	T	intronik	POLE	.	0,0871		0,6923	0,4912
chr12	132681414	132681418	GCTCA	-	intronik	POLE	.	.			0,9
chr12	132687239	132687239	G	A	intronik	POLE	.	0,4795			1

Hasta 5

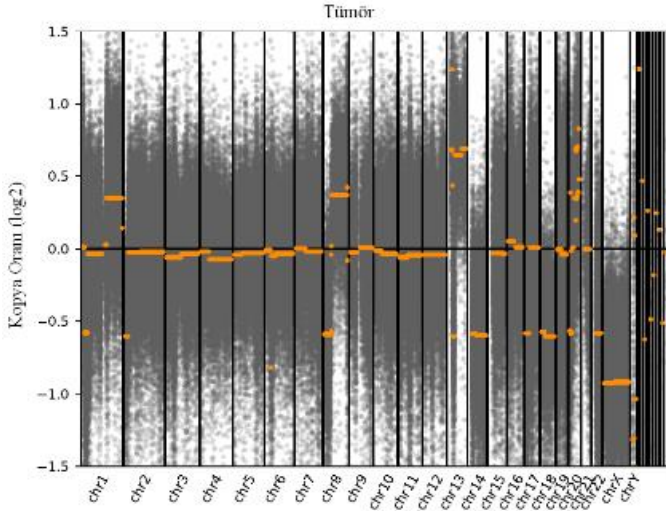
Beşinci hastanın tüm doku örneklerinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri (çizim 4.16), sırasıyla mikroçevre dokusu, polip dokusu, primer tümör ve metastaz dokusu kopya sayısı değişim tablosu ve frekans aralıkları Çizim 4.17’de yer almaktadır.



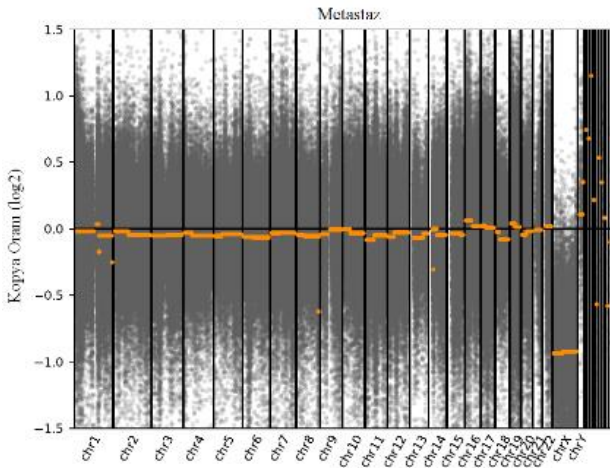
Çizim 4.16 Beşinci hastanın tüm doku örneklerinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.17.a Beşinci Hasta Somatik Veri Mikroçevre doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.17.b Beşinci Hasta Somatik Veri Primer tümör doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri



Çizim 4.17.c Beşinci Hasta Somatik Veri Metastaz doku örneğinde izlenen kromozomal kopya sayısı değişimleri

Beşinci hastada prediksyon araçları ile değerlendirilen varyant verisi sonucunda patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan ,daha önce patojen olarak tanımlanmamış, Alel Frekansı 0,05 in altında ,nadir görülen veya alel frekansı bilinmeyen toplam adet varyant tespit edildi, Sırasıyla sırasıyla mikroçevre dokusu, polip dokusu, primer tümör ve metastaz dokusunda izlenen patojen yada patojenite skoru yüksek varyasyonlar aşağıda mikroçevre dokusu için Çizelge 4.59'de; ,Primer Tümör verisi için Çizelge 4.60'de ve Metastaz dokusu için ise Çizelge 4.61'de bulunduğu kromozom, lokusu, varyasyon tipi ve fonksiyonu, allel frekansı ve bilinen varyantların Cosmic sistemindeki rs kodlu tanımları ile birlikte geniş şekilde özetlenmiştir.

Çizelge 4.59 Beşinci hasta mikroçevre dokusu ekzom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr1-62578972-62578972	T->A	DOCK7	İntronik	0.0003	rs756259590
chr5-162067985-162067985	A->>	GABRG2	Utr5	3.21E-01	rs780201998
chr12-6867480-6867480	G->T	TPI1	Exonic - Stopgain	.	.
chr14-23418294-23418294	G->T	MYH7	Exonic - Nonsynonymous Snv	.	.

Çizelge 4.60 Beşinci hasta primer tümör dokusu ekzom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr2-132878862-132878862	G->A	NCKAP5	Ekzonik -stopgain	.	.
chr2-188994709-188994709	T->>	COL3A1	İntronik	3.26E-01	rs794728036
chr3-48575438-48575438	G->>	COL7A1	Exonic - Frameshift Deletion	2.60E-05	rs780623622
chr5-112840055-112840055	T->>	APC	Exonic - Frameshift Deletion	.	.
chr5-162067985-162067985	A->>	GABRG2	Utr5	0.3209	rs780201998
chr10-88921343-88921343	C->T	STAMBPL1	Ekzonik -stopgain	1.22E-05	rs759767652
chr11-88850094-88850094	G->T	GRM5	Ekzonik -stopgain	.	.
chr12-25245350-25245350	C->A	KRAS	Ekzonik-Nonsinonim Snv	0.00E+00	rs121913529
chr12-25245350-25245350	C->G	KRAS	Ekzonik-Nonsinonim Snv	0.00E+00	rs121913529
chr12-52517691-52517691	G->A	KRT5	Ekzonik-Nonsinonim Snv	4.06E-06	rs61297109
chr17-7673704-7673704	G->A	TP53	Ekzonik -stopgain	.	rs121913344
chr17-10394362-10394362	G->A	MYH8	Ekzonik -stopgain	.	.
chr17-49826773-49826773	G->T	KAT7	Ekzonik - Stopgain	.	.
chr19-41975778-41975778	G->T	ATP1A3	Ekzonik-Nonsinonim Snv	.	.
chr22-46535829-46535829	C->A	CELSR1	Ekzonik -stopgain	0.00E+00	.

Çizelge 4.61 Beşinci hasta metastaz dokusu ekzom verisinde patojen olan ya da patojenite skoru yüksek bulunan varyantlar

Pozisyon	Varyasyon	Gen İsmi	Mutasyon Tipi	gnomAD	ID
chr1-27362200-27362200	G->A	MAP3K6	Ekzonik -stopgain	.	.
chr5-112775626-112775626	T->A	APC	İntronik	5.00E-04	rs587782293
chr5-162067985-162067985	A->>	GABRG2	Utr5	3.21E-01	rs780201998
chr7-116769637-116769637	C->>	MET	İntronik	0.0016	rs587780736
chr9-137986832-137986832	C->T	CACNA1B	Ekzonik-Nonsinonim Snv	4.07E-06	.
chr16-67282262-67282262	G->A	PLEKHG4	Ekzonik -stopgain	4.07E-06	.

Beşinci hastanın normal kolon dokusu dışındaki tüm dokularında üretilen somatik ekzom dizileme verisinde Tümör Süpresör Genler APC, ARID1A, CTNBN1, FBXW7, PTEN, RET, SMAD4, TP53 ile Protoonkogenler BRAF, ERBB2, GNAS, KRAS,

NRAS, PIK3CA ve mikrosatellit instabilite ile ilişkilendirilen Uygun DNA Onarım Genleri MLH1, MSH2, MSH6, PMS2'den meydana gelen varyasyonları araştırdık. Filtreleme işlemleri sonucunda herbir gende ilenen varyasyon ve mutasyonların görüldüğü dokuların listesi ve izlenen varyasyonların ayrıntıları Çizelge 4.62, Çizelge 4.63 ve Çizelge 4.64'da sırasıyla tümör süpresör genler (Çizelge 4.62.a, b), protoonkogenler (Çizelge 4.63.a, b) ve Uygun DNA Onarım genlerinde (Çizelge 4.64.a, b) izlenen tüm varyasyonları içerecek şekilde listelenmiştir.

Çizelge 4.62.a Beşinci Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Genlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

Genler	Metastaz	Mikroçevre	Primer Tümör
AMER1	2	1	
APC	1		2
ARID1A	1		
CTNNB1		4	6
DCC	1	1	3
FBXW7	1	1	1
PTEN		1	
RET	1		
SMAD4	1		2
TP53			1
Genel Toplam	8	8	15

Çizelge 4.62.b Beşinci Hasta Somatik Veri Tümör Süpresör Gen Varyantları ve Özellikleri

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Fonk.refGen	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	ME T	M Ç	TM
chrX	64189488	64189488	G	A	UTR3	AMER1	.	.	0,1		
chrX	64189799	64189799	A	C	UTR3	AMER1	.	.	0,2273	0,2333	
chr5	112775625	112775625	T	A	intronik	APC	.	0,0005	0,1053		
chr5	1128540055	1128540055	T	-	ekzonik	APC	Silinme(Ç.K)	.			0,1967
chr5	112827997	112827997	-	T	ekzonik	APC	Eklenme(Ç.K)	.			0,3125
chr1	26781148	26781148	G	T	UTR3	ARID1A	.	.	0,1429		
chr3	41239982	41239982	A	T	UTR3	CTNNB1	.	.		0,1111	
chr3	41239980	41239980	G	T	UTR3	CTNNB1	.	.		0,1053	
chr3	41239964	41239964	C	T	UTR3	CTNNB1	.	.		0,1333	0,2667
chr3	41239960	41239960	C	T	UTR3	CTNNB1	.	.		0,1875	0,1429
chr3	41239983	41239983	G	A	UTR3	CTNNB1	.	.			0,1875
chr3	41239968	41239968	G	T	UTR3	CTNNB1	.	.			0,1765
chr3	41239964	41239964	C	T	UTR3	CTNNB1	.	.		0,1333	0,2667
chr3	41239963	41239963	A	T	UTR3	CTNNB1	.	.			0,125
chr3	41239960	41239960	C	T	UTR3	CTNNB1	.	.		0,1875	0,1429
chr3	41239947	41239947	A	T	UTR3	CTNNB1	.	.			0,2

chr18	52699763	52699763	-	T	intronik	DCC	.	.	0,1333	
chr18	53063528	53063528	A	T	intronik	DCC	.	.	0,1346	
chr18	53499531	53499531	C	T	intronik	DCC	.	.	0,7941	
chr18	53305462	53305462	C	T	intronik	DCC	.	.	0,28	
chr18	53063532	53063532	C	T	intronik	DCC	.	.	0,1364	
chr4	152347105	152347105	T	A	intronik	FBXW7	.	.	0,1875	
chr4	152326265	152326265	C	A	intronik	FBXW7	.	4,24E-02	0,1111	
chr4	152347088	152347088	A	G	intronik	FBXW7	.	0,0002	0,1667	
chr10	87960902	87960902	G	T	ekzonik	PTEN	nonsinonim SNV	3,98E-02	0,1515	
chr10	43119752	43119752	G	T	intronik	RET	.	.	0,1053	
chr18	51058502	51058502	G	T	intronik	SMAD4	.	4,50E-02	0,1429	
chr18	51058483	51058483	-	TT	intronik	SMAD4	.	0,0002	0,1111	
chr18	51029978	51029978	G	T	upstream	SMAD4	.	.	0,25	
chr17	7673704	7673704	G	A	ekzonik	TP53	stopgain	.	0,6562	

Çizelge 4.63.a Beşinci Hasta Somatik Verisinde Protoonkogenlerde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

Genler	Metastaz	Mikroçevre	Genel Toplam
SOX9	1		1
TCF7L2		3	3
Genel Toplam	1	3	4

Çizelge 4.63.b Beşinci Hasta Somatik Verisi Protoonkogen Varyantları ve Özellikleri

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Fonk.refGene	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	MET	MÇ	TM
chr17	72126365	72126365	T	-	UTR3	SOX9	.	.	0,2647		
chr10	113166066	113166066	A	T	UTR3	TCF7L2	.	.		0,1071	
chr10	113166064	113166064	G	T	UTR3	TCF7L2	.	.		0,1481	
chr10	112950609	112950609	G	A	UTR5	TCF7L2	.	.		0,1053	

Çizelge 4.64.a Beşinci Hasta Somatik Verisinde Uygunsuz DNA Onarım Genlerinde tespit edilen varyasyonların izlendiği dokular

Genler	Metastaz	Mikroçevre	Primer Tümör
MSH6	2		2
POLE		1	2
Genel Toplam	2	1	4

Çizelge 4.64.b Beşinci Hasta Somatik Veri Uygunsuz DNA Onarım Genleri Varyantları ve Özellikleri

Kromozom	Başlangıç	Sonlanım	Referans	Değişim	Fonk.refGene	Gen	Ekzonik Fonk.	gnomAD frk.	MET	MÇ	TM
chr2	47806771	47806771	A	T	intronik	MSH6	.	.	0,1034		
chr2	47806743	47806743	C	A	intronik	MSH6	.	0.0028	0,1		0,1053
chr2	47806751	47806752	CT	-	intronik	MSH6	.	5,13E-03			0,1333
chr2	47806743	47806743	C	A	intronik	MSH6	.	0.0028	0,1		0,1053
chr12	132661162	132661162	T	A	ekzonik	POLE	nonsinonim SNV	.		0,1818	
chr12	132664112	132664112	G	A	ekzonik	POLE	sinonim SNV	8,12E-03			0,1053
chr12	132661129	132664112	T	C	ekzonik	POLE	nonsinonim SNV	.			0,1111

5. TARTIŞMA

Tüm ekzom dizileme (WES) özellikle kanserde sıkça kullanılan ve önerilen bir metottur. Biz ekzom dizileme yöntemini hem hastaların germline dizisini elde etmekte hem de hastada sonradan oluşan varyasyonları gözlemlemek üzere primer tümör dokusunun yanı sıra karaciğer metastaz dokusu, ve tümörün kolonda yerleştiği mikroçevreden alınan örneklerde somatik dizileri elde etmekte kullanılmıştır. Çalışmamızdaki en büyük avantaj hastaların karaciğer metastaz dokularının kolon kanseri tümör örneği ile aynı seansta ve kemo/radyoterapi almadan alınmış olmasıdır. Dolayısıyla dokuların buldukları yer ve histopatolojilerinden ziyade herhangi bir dış etkene maruz kalmamış bir genotip üzerinde çalışma fırsatı tanımıştır.

Germline varyasyon data seti içerisinde özellikle kolorektal kanser ve diğer kanserlerde bilinen tedavide ve tanıda değeri ispatlanmış mutasyonların var olup olmadığı aynı zamanda bilinen mutasyonların izlendiği genlerdeki varyasyon ve muhtemel mutasyonlar araştırılmıştır. Her bir hasta için genler 3 grupta incelendiğinde özellikle hastalarda patojen olarak farklı data setlerde güçlü kanıtlar bulunan mutasyonlar izlenmiştir. (Çizelge 4.5-16) Aynı zamanda data setlerde nadir görülen, frekansı oldukça düşük ancak önemi belirsiz olarak tariflenen varyasyonlar da tespit edilmiştir.

Birinci hastada APC geninde chr5-112840859-112840859 ‘da Guaninin Sitozine dönüştüğü ekzonik sinonim varyasyonun allel frekansı 0,0045’dir. Bir diğer APC varyasyonu intronik bölgede yerleşimli allel frekansı 0,0037 olan chr5-112815623-112815623 Adenin guanine dönüştüğü varyasyondur. Birinci hastada daha dikkat çekici diğer varyasyonlar ARID1A geninde izlenen varyasyonlardır. Çok nadir görülen, (allel frekansı 0,0003 ve 0,00001) olan 2 ekzonik varyasyonun yanında UTR5 de izlenen 0,0054 allel frekanslı varyasyon dikkat çekicidir. Tp53 geninde allel frekansı 0,0111 olan intronik varyasyon tümör

süpresör gruba ait genlerde izlenen bir diğer varyasyondur. GNAS geninde ekzonik nonsinonim tek nükleotid değişimi düşük allel frekansı 0,0013 ile dikkat çekicidir. Ayrıca MYC geninde ekzonik sinonim tek nükleotid varyasyonu 0,0374'lük allel frekansı ile izlenmiştir. İkinci hastada TP53 ve GNas genlerinde, Üçüncü hastada APC, Tp53, MYC da ekzonik, ERBB2'de intronik; dördüncü hastada ARID1A'da, 5. Hastada ise MSH6'da nadir, düşük allel frekanslı ekzonik mutasyonlar görülmüştür. Bu bulgular kısmen kolorektal kanser ile ilişkili genlerde bulunmaları nedeniyle şaşırtıcı olmadığı gibi literatürde daha önce hastalıkla ilişkilendirilmemiş varyantlardır. Bu varyantların varlığı genlerde bildiğimiz ve rutinde kullandığımız mutasyonlar dışında kalan bölgelerde ve mutlaka ekzonik dışı alanlarda da oluşan varyasyonların dikkate alınması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Özellikle intronik alanların henüz tam olarak ne işe yaradığı bilinmediğinden buradaki tespitler mutlaka intronik alanlarında hastalık süreci ile ilişkilendirilmesi gerektiği önerisini desteklemektedir. Ayrıca TCGA datasında yer alan ancak anlamlandırılmamış ve bizim de bulduğumuz bu varyasyonlar bütün halinde somatik verideki devamlılıkları ile başka bir çalışmanın konusu olacaktır. Örneğin APC geni kolorektal kanserde önemi bilinen bir gen dir.(Cancer Genome Atlas Network 2012) Çalışmamız APC genin tüm ekzonik değerlendirmesi sonucunda üretilen veride özellikle intronik ve UTR varyasyonlarının dikkat çekici olduğu sonucunu gösterdi. Özellikle önemi bilinmeyen olarak nitelenen varyasyonları tespit etmiş olduk.

Kanser araştırmalarında tüm ekzom dizilemenin amacı genler üzerine yapılan analizlerin amacı hem mevcut literatür kapsamında bir değerlendirme yapmayı hem de daha önemlisi ve yenilikçi bakış açısıyla genlerin ekzonik alanlarının, mevcut intronik ve UTR alanları da dahil tamamının incelenmesidir. (Koboldt ve diğ 2012).

Aynı hastaların farklı doku örneklerinin germline ve somatik varyasyonlarının bir arada incelenmesi özellikle somatik mutasyonların izlendiği genlerin germline değerlendirilerek prediktif bir varyasyon ya da gene ulaşmak için bir yöntem geliştirebilmek açısından önemlidir. Bu amaçla somatik veride patojen mutasyona sahip genler germline verisinde arandı ve özellikle hücrenin homeostazı ile ilişkili iki farklı gen tespit edildi.

Kolorektal kanserde ailesel sendrom ve hastalıklarla ilişkilendirilen temel germline mutasyonlar hastalarımızda izlenmemiştir. Ancak daha önce data setlerde yer almayan ve bizim datamızda her 5 hastada da ortak izlenen ve daha önemlisi popülasyonda görülme sıklığı oldukça nadir olan bu iki mutasyon PRAMEF10 ve SLC9B1 genlerinde izlenmiştir. (Çizelge 4.4)

DATA SETTE TESPİT EDİLEN ORTAK GERMLİNE VARYASYONLAR

PRAMEF10 Chr1:12893335 (T)-(G)

Birinci kromozomun p36.21 de izlenen PRAMEF10 ekzonik nonsinonim SNV (amino asit değişikliğine yol açan tek nükleotid değişim varyasyonu,) mutasyonu hastaların tamamında izlenmiş ortalama 473 X kapsama ile dizilenmiştir. İkinci hastada her iki allelde izlenen mutasyon diğer hastalarda tek allelde görülmüştür. Mevcut varyasyon Varsome (Aggarwal ve diğ 2012) veri setinde önemi belirsiz olarak işaretlenmekle birlikte aynı zamanda patojenite açısından şüpheli olarak sınıflanmıştır. Biyoinformatik araç patojenitedeki şüpheliyi Gnom AD (Karczewski ve Francioli 2017) exom datası, 1000 genom projesi ve Ekzom konsorsiyumu ekzom dizileme projelerinde kontrol gruplarında görülmemesine bağlamıştır ayrıca ExAC (Karczewski ve diğ 2016) ve 1000 genom projelerinin de içinde yer aldığı 35 farklı tüm ekzom ve tüm genom dizileme projelerinin 77,781 farklı bireye ait verisini içeren Kaviar data setinde de bu varyanta 3 ün üzerinde allel sayısı ile rastlanmıştır. ISB Kaviar Versiyon 4 Şubat 2016 ya göre allel frekansı: 0.00000643 olarak, ciddi nadir görülen bir varyant olarak tanımlanmıştır. Önemi belirsiz olarak sınıflanmasının nedeni özellikle kanser data setlerinde varyasyonun Hg 38 için tanımlanmamış olmasıdır. Bu nedenle bilgisayar programlarında benign öngörüsüne karşılık verecek bir patojenik prediktör bulunmamaktadır. Bu nedenle benign/ patojenik öngörüsünün net olabilmesi için data setlerin hg 38de büyümesi gerekmektedir. Öte yandan literatür tarandığında aynı genin farklı varyasyonları örneğin özefagus skuamöz hücreli kanserin germline verisi içinde gösterilmiştir (Deng ve diğ 2019) Aynı genin ekspresyon seviyelerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada nonalkolik hepatosteatosis lehine basit steatosis arasında ekspresyon farkı olduğu görülmüş. (Arendt ve diğ 2015) Kolorektal kanserin karaciğer metastazı yapabilmesi için altta yatan farklı biyolojik sebepler vardır. (Ki ve diğ 2007) Popülasyonda oldukça nadir görülen bu varyasyonun araştırmamıza dahil olan karaciğer metastatik kolorektal kanser hastalarının tamamında bulunması bu varyasyonun bu açıdan da değerlendirilip üzerinde çalışabilir bir varyasyon olduğu fikrini güçlendirmektedir.

Pramef 10 geni ve ekspresyonu gen bazında incelendiğinde 474 aa, 55.2 kDa büyüklüğünde bir protein ürününden söz edilmektedir. Consensus data setinde(Konsensüs data seti HPA, GTEx ve FANTOM5 adlı üç transkriptomik veri setinden alınan verilerin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur) karaciğer dokusunda ekspresyonu gösterilen Pramef 10 aile üyesi proteini intraselüler bir protein olarak MDM ve MDSeq araçları tarafından öngörülmüştür.(The Human Protein Atlas) Protein ile ilgili bilgi transkripsiyon seviyesinde

mevcuttur. Gen ontolojisine baktığımızda hücre proliferasyonun pozitif regülasyonu, Apoptotik sürecin negatif regülasyonu, Hücre diferansiasyonunun negatif regülasyonu ve transkripsiyonun negatif regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir (genontology.org) Hücre hatlarında değerlendirildiğinde SCLC-21 H (Küçük hücreli akciğer kanseri-21 H) hücre hattında ekspresyonu izlemiştir. Kansere özel ekspresyon datalarına bakıldığında ise TCGA datasında karaciğer kanserinde eksprese olduğu görülmüştür. Beyin dokusu ve kanda ise ekspresyonu tespit edilmemiştir. (The Human Protein Atlas)

SLC9B1 Chr4:102901326 (AC)- (...)

4. Kromozomun 4q.24 de yer alan SLC9B1 ekzonik çerçeve kaymasına neden olan bir silinme mutasyonudur. 102901326 nolu lokalizasyonda bulunan AC nükleotidlerinin silinmesi ile oluşmuştur. Varyasyon hastaların tamamında izlenmiş ortalama 170 X kapsama ile dizilenmiştir. Tüm hastalarda tek allelde görülmüştür. Mevcut varyasyon Varsome veri setinde önemi belirsiz olarak işaretlenmekle birlikte Kaviar data setinde de bu varyanta 3 ün üzerinde allel sayısı ile rastlanmıştır. ISB Kaviar Versiyon 4 Şubat 2016 ya göre frekansı: 0.0000514 olarak, ciddi nadir görülen bir varyant olarak tanımlanmıştır. Önemi belirsiz olarak sınıflanmasının nedeni özellikle kanser data setlerinde varyasyonun hg 38 için tanımlanmamış olmasıdır. Bu nedenle benign/ patojenik öngörüsünün net olabilmesi için data setlerin Hg 38de büyümesi gerekmektedir.

SLC9B1 (NHA1, NHEDC1) gen ürünü sodyum hidrojen pompası işlevine sahip bir transmembran proteindir. Farklı altiplere sahip bu proteini kodlayan genin farklı transkriptleri mevcuttur. Bizim data setimizde tüm hastalarda rastladığımız bu varyant 516 aa den oluşan proteinin 446 ve 447. ci aminoasitlerinde değişikliğe sebep olmaktadır. Data setlerde nadir izlenen bu varyasyona ait literatürde makale yoktur. SLC9 gen ailesi Na + / H + transporter proteini olarak memeli bağırsağında ve ayrıca sindirim organlarının diğer emici ve salgı epitelinin elektron değişiminde kritik bir rol oynar. Bu transmembran transporter proteinler, transepitelyal Na + ve su emilimine, hücre içi pH ve hücre hacim düzenlemesinin yanı sıra, sistemik seviyede elektrolit, asit-baz ve sıvı hacmindeki homeostaza katkıda bulunur. Ayrıca, diğer membran nakil mekanizmalarının işlevini etkiler, hücre çoğalmasını ve apoptozu, hücre göçünü, hücre dışı matrikse yapışmayı ve doku onarımını etkiler. Ek olarak, diğer besin emilimini kolaylaştırmak ve bağırsak mikrobik ortamını düzenlemek için hücre dışı ortamı düzenlerler. (Xu ve diğ 2011) Na + / H + değişimi, gastrointestinal hastalıklarda veya enfeksiyöz ajanlar ve ilişkili bakteriyel toksinler tarafından inhibe edilebilir. Bozulmuş Na + / H + değişimi aktivitesi sadece lokal ve sistemik

elektrolit dengesizliğine değil, aynı zamanda çoklu mekanizmalar yoluyla hastalık şiddetine de katkıda bulunabilir. SLC9 ailesi üyeleri . Na + / H + transporterları yanında SLC9B1 in ekspresyonundan sorumlu olduğu . Na + / H + antitaşıyıcı proteinden de sorumludur. NHA1 olarak bilinen bu proteini Na + / H + değişim aktivitesini tuz yükünden korumak yönünde sağlar. Drosophila'nın bağırsak epitelinde, lümendeki yüksek Na + yüküne karşı koruma sağlayarak yaşam için esansiyel olma özelliği gösterir. Ayrıca NA+/ Cl – kotransporter görevini de sahiptir. Bu yüzden hücre ph 'nın ayarlanması, ozmotik stres ve Na + toleransına cevapta rol aldığı ,hemostasda görevli olduğu düşünülmektedir. Nha1 (Slc9b1) and Nha2 (Slc9b2) tarafından eksprese edilen ve biri susturulduğunda yaşam sürerken her ikisi susturulduğunda letal olan birbirlerini kompanse edebilme fonksiyonuna sahiptirler.(Chintapalli ve diğ 2015) Bu bilgi özellikle bu gen ailesinin ekspresyon ürünlerinin koordinasyonu ve birbirinin destekleyebilme özelliğini ortaya koyar.

Germline veri setinde tüm hastalarımızda izlenen bu varyasyonun somatik veride aynı gen ailesinde 212, SLC9B1 geninde ise 44 varyasyon ile devam ettiği , bu varyasyonlardan 4 tanesinin nonsynonim, 3 tanesinin de stopgain mutasyon olduğu görülmüştür. Özellikle hipermutasyona sahip 4 numaralı hastanın metastaz ve mikroçevre dokusunda ağırlıklı olmakla birlikte primer tümöründe de görülmektedir. (Çizelge 4.53,54,55) Ayrıca bir numaralı hastanın metastaz dokusunda da belirgin izlenmektedir (Çizelge 4.37)

Özellikle sindirim sistemi hastalıklarında ve kolon epitel – lümen ilişkisinde elektrolit dengesi ve Ph dengesinde meydana gelecek bir bozukluk epitelyal bütünlüğü bozup daha ileri sorunları yaratabilir. Her bir canlının yaşam alanının canlının özelliklerini ve yaşama süresini, ve kalitesini belirlediği gibi, mikroçevre de tümörün özelliklerini yaşam süresini ve metastaz kabiliyeti de dahil tümörün özelliklerini, yaşam süresini ve letalitesini belirleyebilmektedir.(Quail ve Joyce 2013) Tümörün kansere dönüştüğü epitel diferansiyasyon tablosunda özellikle hastalığın yerleşim yeri, anatomik ve histolojik pozisyonu kıymetlidir. Burada iki teori düşünülebilir. Birincisi kanser hücresinin yaşamak için uygun ortamı indüklediği teorisi ki bu bilim dünyasında büyük oranda kabul görmektedir; ikincisi ise mikroçevrede hayatta kalabilmek için hücrenin kanserleşmesi teorisi. İkinci teori temelde bozulmuş bir doğal mikroçevrede (örneğin ph'ı normal olmayan, ozmotik dengesi bozuk) hayatta kalmak isteyen hücrede, evrimsel perspektiften bakıldığında çevreye uyum sağlama, doğal seleksiyondan kurtulma telaşı olarak düşünülebilir.(Goubran ve diğ 2014). Örneğin kolon kanseri için beslenme, çevresel faktörler, mikrobiyata değişimleri veya viral bir patojen nedeniyle bozulmuş bir epitelyal

mukozal yüzeyde hücreler arası bağlantıların zayıfladığı ve permeabilitenin arttığı, hücrelerin rutin ve normal şartlar dışında bir yaşam alanında hayatta kalabilmek için farklı adaptasyon mekanizmaları oluşturması gerektiği ve bu nedenle hücrenin maruz kaldığı uyaranların da etkisi ile tamamen savunma ve hayatta kalma amaçlı mutasyonların ve hücre membranından hücrenin metabolizmasına kadar yeniden şekillenmeye gidecek bir protein, lipid ve karbonhidrat metabolizma sürecinin başladığı, yeterli mineral ve vitaminlere ulaşamadıkça fizyolojik süreçlerin yerini patolojik alternatiflerinin aldığı bir organizasyon düşünülebilir. Elbette burada sadece bir gen ailesi sorumlu tutulamaz ancak germline bir yatkınlık ve sonrasında farklı etkenlerle ortaya çıkabilecek somatik mutasyonların bu senaryoyu destekleyebileceği speküle edilebilir. Bu konuda germline bir yatkınlık, bu gen ailesi ve transkriptleri üzerinden daha geniş bir hasta topluluğunda çalışılmalıdır.

SOMATİK DATA ANALİZLERİ

Çalışmamız kolorektal kanser ile karaciğer metastazı arasındaki benzerlikler ve farklılıkları aynı zamanda da mikroçevrenin bu tablodaki rolünü incelemektir. Bu bağlamda ürettiğimiz data seti özellikle tespit ettiğimiz ortak ve hastaların en az %60 ında izlenen varyasyonlar üzerine eğilmemizi sağladı. 252282 varyasyonu kapsayan bu büyük veri üzerinden Çizelge 4.21’de özellikleri verilen varyantlar allel frekanslarının düşük olması ve nadir görülmeleri, en az 3 hastada tespit edilmiş olmaları özellikleri üzerinden seçildi. Çalışmamızda en dikkat çekici varyantlardan ilki FAM25C genindeki ekzonik mutasyondur.

FAM25C 47995404 (C) - (T)

10. kromozom 10q11.22 bandında ekzonik 47995404 bölgesinde sitozinin timin nükleotidine dönüşmesi sonucu oluşmuş nonsinonim bir varyasyondur. GnomAD Exomes Version: 2.1.1’e göre allel frekansı $f = 0.0000138$ olarak belirtilmiştir. Varyasyon 3 hastanın dokularının tamamında ortalama %15 lik bir oranda izlenmiş somatik bir varyasyondur. Tüm hastalarda tek allelde görülmüştür (Çizelge 4.21) Mevcut varyasyon Varsome veri setinde önemi belirsiz olarak tanımlanmıştır. Bu varyasyonun önemi belirsiz olarak sınıflanmasının nedeni özellikle 1000 genom, eksom dizileme projesi ve eksom agregasyon konsorsiyumunun veri setlerinde kontrollerde rastlanmamış olmasıdır. Ayrıca patojenik olma öngörüsünde varyasyon için mevcuttur.

FAM25C geni, gen ürünü açısından değerlendirildiğinde stoplazmada olduğu MDM ve MDSEC sistemlerince öngörülen 89 aa uzunluğunda ve 9.3 kDa kütleyle sahip bir proteini eksprese eder. Genin ontolojisi hakkında yapılmış çalışma yoktur. RNA ekspresyonuna bakıldığında meme, barsaklar, lenfoid doku ve ciltte eksprese olduğu gözlenmiştir (The

Human Protein Atlas) TCGA datası incelendiğinde özellikle baş boyun kanserleri ile ilişkilendirildiği ancak diğer kanser türlerinde de ekspresyonuna rastandığı raporlanmıştır (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). İmmunohistokimyasal olarak çoğu kanser dokusu nükleer veya membranöz boyanma ile birlikte, orta derecede sitoplazmik boyanma sergilemiştir. Özellikle karaciğer, ürotelyal ve renal kanser vakalarında güçlü boyanma izlenmiştir. Periferik kanda kan hücrelerinde gen ekspresyon ürünü tespit edilememiştir. Ref X8 İnsan genomun%4,5'ini oluşturan, PTEN tümör baskılayıcı genini ve RET protoonkogenini barındıran 10. Kromozomda (Deloukas ve diğ 2004) yer alan FAM25C geninde tespit ettiğimiz ekzonik non sinonim nadir varyasyon ikinci, üçüncü ve dördüncü hastalarda hem primer tümör, hem metastaz ve hem de mikroçevrede yaklaşık %10 luk görülme sıklığı ile hem karsinogenez hem de diagnostik açıdan değerlendirmeye uygun bir varyant olarak izlenmektedir.

FAM25C geni yada gen üzerindeki varyasyonlara ait yayın literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamızda kanser dokularında tespit edilen FAM25C genindeki varyasyon kolorektal kanser patogenezi ve metastaz mekanizması kapsamında incelenmesi gereken bir alanı oluşturmaktadır ayrıca mikroçevrede yer alması nedeniyle de hem karsinogenezde hem de diagnostik açıdan değerlendirmeye uygun bir varyant olarak izlenmektedir.

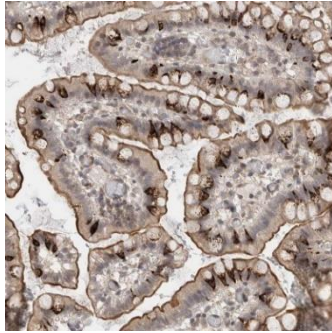
FAM25C genin yer aldığı insan 10. kromozomda (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) 85 hastalık lokusu bulunmuş, (Deloukas ve diğ 2000) ve zaman içinde bu sayı yaklaşık %45 artmıştır. Bu lokusların birçoğu, aynı gendeki mutasyonların neden olduğu çoklu hastalık fenotiplerini içeren ; FGFR2 PTEN ve proto-onkogen RET genleridir. PTEN'in ilk kez beyin, meme ve prostat kanserlerinde mutasyona uğradığı gösterilmiştir(Li ve diğ 1997). 10. Kromozomda tümör oluşumunda rol oynayan, lenfatik neoplazmlarda, kromozomal translokasyonların veya amplifikasyonların neden olduğu TLX1, NFkB2 veya BMI1'in deregülasyonu da tespit edilmiştir. Tüm bu gerekçeler ve veri setimizdeki görülme sıklığı nedeniyle FAM 25C varyasyonları ileri araştırmalarının yapılması gerekmektedir.

ZNF704 3'UTR 80638590 / A- ./

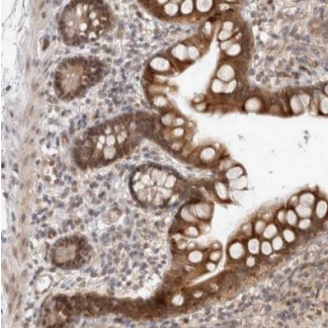
3 'çevrilmemiş bölge (3' UTR) genlerin son ekzonun bitiminden sonraki dizilerdir. Transkripte olan ancak translasyonu olmayan bölgelerdir. Genellikle, mRNA'nın stabilitesine aracılık ederek gen ifadesinin post-transkripsiyonel düzenlenmesinde yer alan kilit düzenleyici unsurları içerir. 3'-UTR bölgelerinde yüksek derecede evrimsel koruma

mevcuttur bu durum bu bölgede önemli unsurların varlığı açısından bir kanıt olarak değerlendirilebilir. (Nussbaum ve diğ 2015) Bu nedenle data setimizde somatik veride en fazla hasta ve dokuda izlenen varyasyon 8.kromozomun 8q21.13 bandında ,3'UTR 80638590 bölgesinde adenin nükleotidinin silinmesi sonucu oluşmuş bir varyasyondur. ISB Kaviar 3Version: 4-Feb-2016 ya göre allel frekansı $f = 0.003374$ olarak belirtilmiştir. Varyasyon 3 hastanın dokularının tamamında ortalama %10 luk bir allel frekansı ile izlenmiş somatik bir varyasyondur (Çizelge 4.21) Tüm hastalarda tek allelde görülmüştür. Mevcut varyasyon Varsome veri setinde önemi belirsiz olarak tanımlanmıştır. Bu varyasyonun önemi belirsiz olarak sınıflanmasının nedeni özellikle 1000 genom, eksom dizileme projesi ve eksom agregasyon konsorsiyumunun veri setlerinde kontrollerde rastlanmamış olmasıdır. Bu nedenle patojenik olma öngörüsü de varyasyon için mevcuttur. (Kopanos ve diğ 2019)

ZNF704 gen ürünü intrastoplazmikdir. Bu protein birçok organda eksprese edildiği gibi mevcut antikoları ile yine birçok organda tespit edilebilmektedir. Hücrelerde özellikle nükleoplazmada tespit edilmiştir. Gen ürününün transkripsiyon regülasyonunda ve nükleik asitlerin bağlanmasında rol aldığı öngörülmektedir. (The human Protein Atlas)Yapılan çalışmalar sonucunda proteinin ince barsaklarda goblet hücrelerinde güçlü stoplazmik pozitiflik (Çizim 5.1) ile glandüler hücrelerde hem nükleer hem de stoplazmik güçlü pozitiflik (Çizim 5. 2) tespit edilmiştir. (Human Protein Atlas)



Çizim 5.1.a İmmunohistokimyasal yöntem ile ZNF704 proteinin İnsan ince barsak goblet hücrelerinde güçlü stoplazmik pozitiflik görüntüsü (The Human Protein Atlas)



Çizim 5.1.b İmmunohistokimyasal yöntem ile ZNF704 proteinin insan ince barsak glandüler hücrelerde hem nükleer hem de stoplazmik güçlü pozitiflik görüntüsü(The Human Protein Atlas)

Kolon ve karaciğer dokuları incelendiğinde kolonda özellikle glandüler hücrelerde yüksek, endotelde ise düşük antikor pozitifliği izlenmiştir. Kolonda bazı vakalarda endotelde hiç ekspresyon izlenmemiştir. Karaciğerde ise safra kanalı hücreleri ve hepatositlerde düşük antikor pozitifliği tespit edilmiştir.(Human Protein Atlas).

Reactome (Fabregat ve diğ 2015)yolak analizi aracı kullanıldığında özellikle ZNF704 geninin, gen ekspresyonu ve transkripsiyonu ile ilgili yollarda etkisi olduğu öngörülmüştür. Ayrıca DNA onarım yolları, RNA metabolizması ve hücre siklusunda da etkin olduğu daha düşük bir olasılıkla öngörülmüştür (reactome.org). ZNF704 gen ürünü kanser veri setlerinde araştırıldığında tüm kanserlerde tespit edilmekle birlikte TCGA datasında kolorektal kanserde yüksek oranda ekspresyon izlendiği görülmüştür. En önemlisi renal kanserlerde özellikle prognoz açısından prediktif olabileceğine dair araştırmaların mevcut olmasıdır. (The Human Protein Atlas) Renal kanserde olduğu gibi akciğer kanserinde de ekspresyon artışının kötü prognoz ile ilişkisini savunan araştırmalar vardır. (Liu ve Zhao H.2019). 2018 yılında yayınlanan başka bir çalışmada ZNF704 geninin hepatoselüller kanser gelişiminde hücre hatlarının maligneleşmesinde anahtar rol oynadıkları ve bunu özellikle DNA metilasyon ve miRNA ların regülasyonu altında yapan genlerden biri olduğu ve hücre siklusu ve hücre bölünmesini etkileyen genlerden biri olduğu gösterilmiştir. (Chen ve diğ 2018). Hepatik onkogenezen sorumlu tutulan bu genin bizim data setimizde hem mikroçevre, hem primer tümör, hem de metastaz dokularında izlenmiş olması ve tüm örneklerin %60 ında izlenmiş olması kolorektal kanser ve onun karaciğer metastazında da etkin olabileceği öngörüsünü desteklemektedir. Ayrıca prostat kanserinde metastatik ve lethal hastalığı predikte ettiğini ifade eden Ekim 2019 da yayınlanan makalede prediktif 4 lü gen transkript skorunun içinde de ZNF704 yer almaktadır. (Cheng ve diğ 2019).

ZNF704 geni literatürde kanser dışında , sağlık yaşlanma indeksi ve genom varyantları arasındaki ilişki araştırılırken kadınlarda yaşlanma için potansiyel bir aday gen olarak tanımlanmış ancak bu bölgedeki varyantlarla ilişkilendirme net olarak yapılamamıştır. (Minster ve diğ 2015). Literatürde ZNF704 ile ilgili iki farklı varyant rs7000234, rs60894313 ile Amerika Birleşik Devletleri gazilerinde Amyotrofik Lateral Skleroz arasında bir ilişki rapor edilmiştir (Kwee ve diğ, 2012). Başka bir araştırmada domuzlarda GWAS ve ekspresyon QTL analizinde, ZNF704 ile kas kalitesi arasında ilişki tespit edilmiştir. (Ponsuksili ve diğ,2014). Uzun yaşayan ailelerin araştırıldığı bir çalışmada aynı gen istisnai bir sağ kalım fenotipi ile ilişkilendirilmiş , fiziksel fonksiyonların (kavrama kuvveti, yürüme hızı ve toplam fiziksel aktivite) ve pulmoner özellikleri belirleyebileceği yönünde görüş bildirmişler ancak bulgularının bu gen için bilinmeyen bir role ya da kadınlarda yaşlanma ve solunum fonksiyonlarıyla ilgili mekanizmalarda komorbidite ile ilişkilendirilebileceğini de öne sürerken ilişkiyi doğrulamak için ek çalışma gerekliliğini ifade etmişlerdir. (Minster ve diğ 2015). Bizim data setimizde 3 hastada rastladığımız bu varyant hastaların hem mikroçevre, hem primer tümör hem de metastaz dokularında izlenmiştir. Bu 3 hastanın ortak özelliği (1,2,7. hastalar) hastalıklarının sol kolonda olması ve karaciğer metastatik olmasıdır. Özellikle bahsi geçen varyasyonun nadir bir varyasyon olması ve genin ekspresyon seviyelerinin prognostik önemini gösteren yayınlar bir arada değerlendirildiğinde, hücrede transkripsiyon regülasyonu üzerinde etkin bir proteini kodlayan genin düzenleyici UTR3 bölgesindeki bu varyasyonun daha ayrıntılı çalışılması gerekliliği sonucuna varılmıştır.

EEF1A1 Chr6 73518751 C-T

6. kromozomda ekzonik 73518751'de sitozinin timin nükleotidinde dönüşmesi sonucu oluşmuş bir varyasyondur. GnomAD Exomes Version: 2.1.1'e göre allel frekansı $f = 0,004062$ olarak belirtilmiştir. Varyasyon 3 hastanın primer tümör, mikroçevresinde ve bir hastanın polip dokusunda izlenmiştir. Metastaz dokularında varyasyon görülmemiştir. Dokularının tamamında ortalama %12 lik bir oranda izlenmiş somatik bir varyasyondur. Tüm hastalarda tek allelde görülmüştür. Mevcut varyasyon Varsome veri setinde önemi belirsiz olarak tanımlanmıştır. Bu varyasyonun önemi belirsiz olarak sınıflanmasının nedeni özellikle 1000 genom, eksom dizileme projesi ve eksom agregasyon konsorsiyumunun veri setlerinde kontrollerde rastlanmamış olmasıdır. Ayrıca predikasyon testlerinde (DEOGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, M-CAP, MutationTaster and PrimateAI)patojenik olma öngörüsünde varyasyon için mevcuttur.

Gen özelliklerini değerlendirdiğimizde eEF1A1, embriyonik gelişim boyunca her

yerde bulunur, fakat doğum sonrası nöronlarda, kardiyomiyositlerde ve miyositlerde eEF1A2 ile yerini alır ve genin ekspresyonu baskılanır. (Khalyfa ve diğerleri, 2001).

Protein sentezinde eEF1A'nın fonksiyonu açısından benzer özellikleri göz önüne alındığında, izoformlar arasındaki geçişin, belirli hücre tiplerinin örneğin

aktin ile etkileşime girmek için farklılaşması ile açıklanır.(Soares, Barlow, Newbery, Porteous ve Abbott 2009). Gerçekten de, aktine bağlanma ve demetlenmede bu iki izoform arasında farklılıklar görülür.(Novosylina ve diğerleri 2017). Özellikle nöronal gelişimde anahtar rol oynayan bu iki izoformun nöronlardaki farklı hücre iskelet etkileşimlerini değiştirecek şekilde etkilerinin olduğu düşünülmektedir. (Abbott ve diğerleri 2009). Bununla birlikte, tüm omurgalılarda görülen bu yüksek oranda korunan anahtarın, terminal olarak farklılaşmış, nöronlar gibi uzun ömürlü hücrelerde protein sentezinin bir yönüne yönelik farklı ihtiyaçlara cevap olarak ortaya çıktığı fikrini dışlamak mümkün değildir. Bir diğer olasılık ise kanser hücresinde özellikle yeni tanımlanmaya başlanan nörogenesis gibi bir yapının varlığını desteklemek olabilir (Albo ve diğ 2011) . Günümüzde karsinogenezde en belirsiz ancak şüphesiz üzerinde çalışılması gereken alanı ise nöral invazyon, nörogenesis yada nöral regülasyon oluşturur.

Biriken kanıtlar, ökaryotik translasyon uzama faktörü 1 alfa 1'in (eEF1A1) kanserde mevcudiyetini gösterirken, özellikle renal hücreli Kanserde EF1A1'in ekspresyon seviyeleri üzerinden araştırıldığı bir çalışmada, eEF1A1 geni susturularak, hücre çoğalması ve apoptozisi araştırılmış ve eEF1A1'in renal hücreli kanser dokularında yüksek oranda eksprese edildiği ve kötü prognozla ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur. EEF1A1'in susturulmasının, proliferasyonu hafifletip ve renal hücreli kanser hücrelerinin apoptozunu arttırdığı, AKT ve ERK'nin fosforilasyon seviyesini azalttığı gösterilmiştir. (Bao ve diğ,2019). Bu gen, aminoasit tRNA'ların ribozoma enzimatik olarak verilmesinden sorumlu olan uzama faktörü-1 kompleksinin alfa alt biriminin bir izoformunu kodlar. Gen ürünü protein, protein biyosentezi sırasında aminoasit-tRNA'nın ribozomların A bölgesine GTP'ye bağımlı bağlanmasını destekler. PARP1 ve TXK ile, yardımcı T lenfosit 1 (Th1) hücresine özgü transkripsiyon faktörü olarak görev yapan ve transkripsiyonunu doğrudan düzenlemek için IFN-gama promotörünü bağlayan ve bu nedenle Th1 sitokin üretiminde önemli rol oynayan bir kompleks oluşturur. (Yamagishi ve Kaneko 2016) Barsaklar immun sistemin ve sitokinlerin yoğun olarak bulunduğu organlardır. (Waldner ve diğ 2006) Bu nedenle EEF1A1 geninin yardımcı T lenfositlerin sitokin üretimindeki etkisi düşünüldüğünde sindirim sisteminin inflamasyona bağlı bozuklukları ve kanserlerinde özellikle araştırılması gerekliliği ortaya çıkar.

EEF1A1 gen ürününün ilk izoformu (alfa 1) beyin, plasenta, akciğer, karaciğer, böbrek ve pankreasta ifade edilirken diğer izoform (alfa 2) beyin, kalp ve iskelet kaslarında ifade edilir. Bu izoform, Felty sendromlu (romatoid artrit, splenomegali ve nötropeniye yol açan nötrofillerin periferik yıkımı arasındaki ilişki ile karakterize bir hastalık) hastaların% 66'sında otoantijen olarak tanımlanır.(RefSeq 2008). Burada datamızda rastladığımız varyantın nonsinonim bir varyant olması ve ekspresyon ürünü üzerindeki etkisinin net olmaması nedeniyle özellikle otoimmünite mekanizmaları ve kanser ilişkisi açısından da ayrı bir araştırma alanı konusu olabileceği öngörülmektedir.

Gen ürünün hücre içi yerleşimli protein ekspresyonu MDM ve MDSEC sistemlerince predikte edilmektedir ve transmembranal bir komponente henüz rastlanmamıştır. FANTOM, HPA ve GTEx data setlerinde periferik kan dahil birçok organda ekspresyonu raporlanmıştır. İnsan Beyin RNA ekspresyonu data setine göre özellikle sinir sisteminde purkinje hücreleri dahil olmak üzere nöron alt gruplarında protein tespit edilmiştir. Aynı zamanda ekspresyon datası ile hastaların klinik verisi değerlendirildiğinde EEF1A1'in prognostiktik olduğu, karaciğer kanserinde yüksek ekspresyonunun sağkalımı olumsuz etkilediği, genin ekspresyonun yüksek olduğu grupta 5 yıllık sağ kalımın %37, düşük olduğu grupta ise %52 olduğu bildirilmiştir. ((The Human Protein Atlas)

Özellikle hepatoselüler kanserlerde artmış ekspresyon seviyeleri immunohistokimyasal olarak da gösterilmiş. (Çizim5.2)



Çizim 5.2 İmmuno histokimyasal yöntem ile EEF1A1 proteinin ekspresyonunun hepatoselüler kanser hücrelerinde güçlü pozitiflik görüntüsü (The Human Protein Atlas)

EEF1A1 geni TCGA data setinde incelendiğinde farklı kanser türleri içinde kolorektal

kanser ve karaciğer kanserlerinin de bulunduğu geniş bir grupta yüksek ekspresyonu görülmüştür. Kanser dokuları orta ila güçlü stoplazmik boyama göstermişler sadece birkaç lenfoma ve yumurtalık kanseri vakası zayıf boyanma ve negatif olarak raporlanmıştır.

Çalışmamızda hem kolorektal kanser primer tümör dokusunda hem de mikroçevre dokusu ve polipde izlenen ancak metastaz dokularında görülmeyen nonsinonim varyasyon karsinogenezde özellikle primer tümör oluşumunda daha etkin bir role sahip olabileceği speküle edilerek ekprese edilen protein üzerindeki etkileri açısından mutlaka incelenmesi gerektiği görülmüştür. Kolorektal kanser dokularında küçük bir grupta hiç ekspresyon izlenmemekle birlikte hastaların %75 in üzerinde bir oranda yüksek oranda ekspresyona sahip olduğu görülmüştür ancak prognoz ile istatistiksel olarak çok düşük bir ilişki kurulmuş ve sonuç olarak anlamlı bir ilişki olarak yorumlanmamıştır. (The Human Protein Atlas)

İnsan EEF1A proteininin birincil yapısı 1986 yılında belirlendiğinde 462-amino asitten meydana gelen proteinin, maya ve Artema Ef1-alfa ile karşılaştırıldığında %80'den fazla korunduğu gösterildi. (Brands ve diğ 1986). Bu bilgi evrim açısından önemli olduğu kadar özellikle gende meydana gelecek mutasyonların hastalıkların ortaya çıkmasına etkili bir aktör olmak açısından da kanıt olarak sunulabilir.

İmmünofloresan analizi EEF1-alfanın, insan sünnet derisi fibroblastlarında güçlü nükleer boyanma ve dağınık sitoplazmik boyanma gösterdiğini bulmuşlardır. Buna karşılık, EEF1-beta, -gamma ve -delta, bir perinükleer dağılım gösterip endoplazmik retikulum ilişkili bulunmuştur. (McLachlan ve diğ 2019). Bu kanıtta özellikle tümör mikroçevresinde yer alan farklı hücre grupları ve dokuların gen ürününe sahip olduğu ve farklılıklara maruz kalma potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir.

CCS3 Eklenti Varyantı:

2006 yılında CCS3 olarak adlandırılan bir EEF1A1 ek varyantını klonlanmıştır. (Rho ve diğ. (2006) Çıkarılan 361-amino asit CCS3 proteini, tam uzunlukta EEF1A1'in 101 N-terminal amino asidinden yoksun bulunmuştur. Western blot analizleri ile ,insan hücre hatlarında hem CCS3 hem de tam uzunlukta EEF1A1 tespit edilmesi sonrasında insan protein atlası projesi ile genin protein kodlayan 11 transkripti olduğu öğrenilmiştir.

Başka bir çalışma CCS3'ün, insan rahim ağzı kanseri hücre kültürleri ve insan rahim ağzı kanserinde normal insan hücre kültürleri ve dokularla karşılaştırıldığında ekspresyonunun azaldığını göstermiştir. CCS3'ün aşırı ekspresyonunun, apoptozu indükleyerek hücre büyümesini inhibe ettiği (Rho ve diğ 2006) ve CCS3'ün transkripsiyonel bir baskılayıcı olarak görev yaptığı sonucuna varılmıştır.

Isı şoku transkripsiyon faktörü HSF1 stressiz hücrelerde inaktif bir monomerik formda bulunur ve ısı ve diğer stres uyarıcıları tarafından aktive edilir. HSF1 aktivasyonu, belirli ısı şok proteinleri ile etkileşimle negatif olarak düzenlenen, bölgeye özgü bir DNA bağlama aktivitesinin trimerizasyonunu ve edinilmesini içerir. (Shamovsky ve diğ 2006), ısı şokuyla HSF1 aktivasyonunun, eEF1A translasyon uzama faktörü içeren bir ribonükleoprotein kompleksi ve ısı şoku RNA-1 olarak adlandırdıkları daha önce bilinmeyen kodlayıcı olmayan bir RNA tarafından aracılık edilen aktif bir işlem olduğunu göstermiştir.

HSR1 insan ve kemirgen hücrelerinde yapısal olarak eksprese edilir ve homologları fonksiyonel olarak değiştirilebilir. Hem HSR1 hem de eEF1A, in vitro HSF1 aktivasyonu için gereklidir; antisens oligonükleotitler veya HSR1'e karşı kısa RNA'lar, in vivo ısı-şok tepkisini bozarak hücreleri termosensitif hale getirir. Araştırmalar HSR1'in ısı şoku sırasındaki merkezi rolünün, bu RNA'yı hedeflemenin, kanser, iltihaplanma ve HSF1 deregülasyonu ile bağlantılı diğer koşullar için yeni bir terapötik model olarak hizmet edebileceği anlamına geldiğini öne sürmektedir. (Shamovsky ve diğ 2006),

Bir başka araştırma kütle spektrometri analizini kullanarak, eEF1A'yı, Legionnaire hastalığına neden olan ajan olan Legionella pneumophila ile enfeksiyondan sonra glikozile edilmiş protein ekspresyonu yapan gen olarak tanımlamıştır (Belyi ve ark 2006). Glukozilasyon, EF53'deki GTPase bölgesinde ser53'te meydana gelmekte ve ökaryotik protein sentezi ve hedef hücre ölümünün inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu veriler eEF1a1 geninin kanser ilişkilendirilmesi için pozitif kanıtlardır.

MUC2: Chr11 1095865 C-A

11. kromozomun 11p15.5 bandında, ekzonik 1095865 bölgesinde sitozinin adenin nükleotidine dönüşmesi sonucu oluşmuş kodlamayan bir varyasyon olduğu tahmin edilmekle birlikte kesin olarak gösterilememiştir. GnomAD Exomes Version: 3'e göre allel frekansı $f = 0.000398$ olarak belirtilmiştir. Varyasyon 3 hastanın mikroçevre ve metastaz dokularında ortak olarak izlenmiştir. Bir hastanın primer tümöründe de mevcuttur. Dokuların tamamında ortalama %12 lik bir oranda izlenmiş somatik bir varyasyondur. Tüm hastalarda tek allelde görülmüştür. Mevcut varyasyon Varsome veri setinde önemi belirsiz olarak tanımlanmıştır. Bu varyasyonun önemi belirsiz olarak sınıflanmasının nedeni özellikle 1000 genom, eksom dizileme projesi ve eksom agregasyon konsorsiyumunun veri setlerinde kontrollerde rastlanmamış olmasıdır. Özellikle kodlamayan ekzonik bir varyant olarak tanımlanmış olması nedeniyle varsome veri setinde patolojik olma öngörüsü verilememiştir. Bizim datamızdaki görülme sıklığı ve allel frekansının popülasyonda düşük olması nedeniyle önemi olabilecek varyantlar arasında yer almıştır.

MUC2 gen ürününün barsakların, solunum yollarının ve diğer mukus tabakası içeren organların epitellerini kaplıyor olması ile , Mukoza yüzeyindeki parçacıklara ve bulaşıcı maddelere karşı koruyucu, kayganlaştırıcı bir bariyer oluşturduğu düşünülmektedir. Kolonun hem iç hem de dış mukus katmanlarının ana bileşeni ve bakterilerin iç mukus katmanından çıkarılmasında rol oynayabileceği araştırmalarda öne sürülmüştür (Johansson ve diğ 2009).Bu nedenle bulunan varyantın kolon kanseri ve metastazı açısından özellikle mikroçevrenin önemini bildirir bir özelliğe sahip olabileceği öngörülerek varyasyonun ve genin incelenmesine karar verilmiştir.

Genin hücre içi yerleşimli bir proteini eksprese ettiği MDM ve MDSEC tarafından öngörülmektedir. Gastrointestinal sistem, böbrek ve üriner sistem, lenfoid doku ve kemik iliğinde ekspresyonu tespit edilen genin, eksprese olduğu dokuların ortak özellikleri açısından immun sistem ile ilişkilendirilebileceği speküle edilebilir. TCGA datası ile değerlendirildiğinde genin kolon, mide, pankreas, meme ve lenf kanserlerinde artmış ekspresyonlarına rastlandığı rapor edilmiştir. Buradaki önemli nokta kolorektal ve prostat kanserlerinin yanında özellikle müsinöz over, mide ve pankreas kanserlerinde izlenmiş olmasıdır. (The Human Protein Atlas)

Sindirim sisteminin temel işlevi olan sindirim ve emilimin devam edebilmesi için en önemli faktörlerden birisi intestinal permeabilitedir. İntestinal permeabiliteden kasıt fonksiyonel ve kontrollü bir mukoza yapısı ile oluşturulan bariyer fonksiyondur. (Arrieta ve diğ, 2006) Sindirim sisteminin mikrobiyal flora ve özellikle immun modülasyondaki rolü hala araştırma konusu olmakla birlikte yukarıda sayılan komponentlerle olan tamamlayıcı işbirliği kabul edilmek zorundadır.

Tarif ettiğimiz bütün içinde özellikle veri setimizde kanserde anlamlı olabileceğini speküle ettiğimiz MUC 2 varyantının MUC2 gen ürünü üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir. İnsanın dış dünya ile yaklaşık 100 m² lik alanda etkileşimde olduğu sindirim sistemi mukozası hem immun sistemin de yardımıyla bariyer görevi hem de emilim ve salınım işlerinin yapılabildiği aktif ve pasif transport işlemlerinin yapıldığı renal tübül benzeri yapılardır. Bu nedenle mukozal bariyer fizyolojik fonksiyonların sürdürülmesi ve hastalıklardan korunmada elzemdir. (Hollender ve diğ 1986). MUC 2 geninde izlediğimiz varyasyonun bu bakış açısı ile değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

RGPD4 :107860072 (T)-(G)

2. Kromozomda 107860072' de T--- G dönüşümü ile meydana gelen intronik

varyasyon veri setimizde 4 hastada ortak olarak izlendi. Metastaz, mikroçevre ve primer tümör dokularında izlenen varyasyon varsome biyoinformatik değerlendirmesinde patojen olabilme ihtimali ekzom datalarında kontrollerde izlenmemesine bağlanarak, önemi bilinmeyen varyasyon olarak sınıflandırılmıştır. İntronik varyasyonlar günümüzde henüz fonksiyonu anlaşılamamış varyasyonlardır. Ancak özellikle somatik olarak ortaya çıkan ve oldukça nadir bir frekansla izlenen bu ve benzer intronik varyasyonlar dikkate değer olduklarını göstermektedirler. (Takahashi ve diğ 1990).

Gen ürünü MDM and MDSEC prediksiyon sistemlerince G1/ S geçişinde görevli, protein bağlama, GTP az aktivitesinin pozitif regülasyonundan sorumlu hücre içi protein olarak değerlendirilmiştir. Doku ekspresyonuna bakıldığında özellikle testis dokusunda ekspresyonu yüksek olduğu görülmüştür. Kanda özellikle T lenfositler ağırlıklı olmak üzere, monositlerde, B lenfositlerde ve NK hücrelerinde ekspresyonu izlenmiş bir protein ürününe sahiptir. Hücre açısından değerlendirildiğinde , özellikle hücre içi bir protein ürününe sahip olduğu ve bunun nükleus membranı ile veziküllerde yoğun oranda izlendiği görülmüştür. Hücre setlerine bakıldığında periferik kan orjinli lenfoid doku kanser hücre seti olan U-266/70 de yoğun olarak protein ekspresyonu izlenmiştir.TCGA 'da RNA ekspresyon datasında anlamlı bir doku tanımı yapılmamakla birlikte, protein datasında karaciğer, akciğer, karsinoid tümör, testis, meme ve deri kanserlerinde bazı vakalarda artmış ekspresyona rastlanmıştır. (The Human Protein Atlas) Bu genin özellikle NK ve B lenfositlerde artmış ekspresyonu immun sistem ile kanser arasındaki bağlantıyı aklı getirmektedir. (Mantovani ve diğ 2010)

Genin nükleer fonksiyonu; Nükleositoloplazmik taşınma, hücre döngüsü ilerlemesi, nükleer düzen ve nükleer zarf (NE) düzeneğine dahil olan korunmuş bir Ras benzeri GTP bağlayıcı protein olan Ran ile seçici ve kovalent olmayan bir şekilde etkileşime girme olarak öngörülmüştür. GTPaz aktivitesini pozitif olarak regüle ettiği ve hücre çekirdeğine protein taşınımından sorumlu olabileceği düşünülmektedir. (UniProtKB).Bu gene dair bir diğer literatür bilgisi ise popülasyon genetiğinde özellikle Luhya (Afrika Popülasyonu) ile diğer popülasyonlar arasındaki potansiyel seçinimde belirgin bir fark göstermiş olmasıdır.(Raska ve Zhu 2011)

Özellikle kanser hastalığı için düşünüldüğünde benzer şekilde farklı popülasyonlarda daha nadir ya da yoğun izlenmesine bağlı olarak değişik bulgular verebilir. Yaşadığımız coğrafyada henüz genetik anlamda bölgesel verilerin üretilmemiş olması nedeniyle bulunan varyasyonların tarandığı data setlerde izlenmemiş olması anlamsız bir varyasyonu işaret etmeyeceği anlamına gelebilir. Bulunan varyasyonlar mutlaka yaşadığımız coğrafyanın

verileri üzerinden de değerlendirilmelidir.

METASTAZ DOKULARINDA ORTAK OLARAK İZLENEN SOMATİK VARYASYONLAR.

FAM25C’de izlenen varyasyon tüm dokularda metastaz, primer ve mikroçevrede ortak olarak izlenen mutasyonlardan en dikkat çekici olanıdır. Ayrıca mikroçevre ve metastaz dokularında ortak olarak 3 varyasyon daha bulunmuştur. (Çizelge 4.22) MUC 2 ve daha önce data setlerde tanımlanmamış bir microRNA nın yanı sıra intergenik bir varyasyon da izlenmiştir. Sadece metastaz dokusunda allel frekansı düşük anlamlı olabilecek 2 eksonik 2 de intronik mutasyon tespit edilmiştir. (Çizelge 4.22) Bu varyasyonlardan en önemlisi APOBR genindeki varyasyondur.

APOLİPROTEİN B RECEPTOR (APOBR): 28496096 (A)-(G)

16. kromozomda (16p12.1) 28496096 lokusunda adenin nükleotidinin guanine dönüşmesi ile oluşan exonic nonsinonim tek nükleotid varyasyonudur. BravoVersion: Freeze5’e göre allel frekansı: $f = 0.00000796$ ’dır. Mevcut varyasyon Varsome veri setinde önemi belirsiz olarak tanımlanmıştır. Bu varyasyonun önemi belirsiz olarak sınıflanmasının ve patojenik olabilme olasılığının nedeni özellikle 1000 genom, eksom dizileme projesi ve eksom agregasyon konsorsiyumunun veri setlerinde kontrollerde rastlanmamış olmasıdır.

Hofbauer, Kupffer ve Langerhans hücrelerinin yanı sıra periferik lökositleri, dalağın kırmızı pulpasındaki hücreleri ve kalın bağırsak glandüler hücrelerini içeren makrofajlarda seçici sitoplazmik ekspresyona sahip olan APOBR geni akla immun sistem, makrofajlar ve metastaz arasındaki bağlantıyı getirir. (Qian, and Pollard 2010), (Pollard 2004), (Mantovani ve Sica 2010). Son dönemde üzerinde giderek artan sayıda çalışma olan doku makrofajları aracılı metastaz hipotezini destekler nitelikte bir gen ve etkisinden bahsedebiliriz. Datamızdaki varyantın en önemli özelliği sadece metastaz dokularında yaklaşık %30 luk bir allel frekansı ile görülmüş olmasıdır.

Apolipoprotein B48 reseptörü, diyet trigliseritlerden zengin lipoproteinlerin bağlandığı bir makrofaj reseptörüdür. Bu reseptör retikuloendotelial hücrelere esansiyel lipitler, lipitte çözünen vitaminler ve diğer besinleri sağlayabilir. Plazmada trigliserit düzeylerinin aşırı artması durumunda apolipoprotein B48 reseptörü köpük hücre oluşumuna, endotel disfonksiyonuna ve aterotrombogeneze katkıda bulunabilir. (Brown ve diğ 2000). Gen ontolojisine bakıldığında ; reseptör bağımlı endositoz, lipid metabolizması, lipid

transportu alanlarında görevi olduğu öngörülmektedir (Gaudet ve diğ, 2011). APOBR gen ürünü olan makrofaj reseptörüne, diyet trigliseritlerinin apolipoprotein B48'i (APOB) ya da hipertrigliseridemik çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (HTG-VLDL) APOB benzeri bölgelerine bağlanarak dolaşımdaki makrofajın dolaşımdaki lipidleri endositoz yoluyla almasını sağlar. Bu mekanizma aterosklozu açıklayabildiği gibi barsaklarda ise Makrofajların APOE'den yoksun olan şilomikronların, HTG-VLDL ve tripsinize edilmiş VLDL'nin hızlı afinite alımına aracılık eder. Gianturco ve diğ,1998).

APOBR gen ürünü 105 organda ifade edilir, kanda en yüksek ifade seviyesi Apolipoprotein B reseptörü (APOBR dimer), makrofajların yüzeyindeki dimerik bir lipit bağlayıcı reseptördür. (Gaudet ve diğ 2011). Hidrofobiklikleri nedeniyle, lipitler insan vücudunun hücre dışı boşluklarında öncelikle lipoprotein kompleksleri formunda bulunur. Şilomikronlar ince bağırsakta oluşur ve diyet lipidlerini vücuttaki diğer dokulara taşır. Karaciğerde çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL) oluşur ve orada sentezlenen triaçilgliserol vücudun diğer dokularına taşınır. Dolaşırken, VLDL, kan damarlarının endotel yüzeyleri üzerindeki lipoprotein lipazları, dokular tarafından alınacak yağ asitlerini ve gliserolü serbest bırakarak ilk önce VLDL'yi orta yoğunlukta lipoproteinlere (IDL) ve sonra düşük yoğunluklu lipoproteinlere (LDL'ye dönüştürür) dönüştürür. IDL ve LDL, vücutta esas olarak karaciğer hücrelerinin yüzeylerinde bulunan spesifik bir hücre yüzey reseptörü yoluyla dolaşımdan temizlenir. Öncelikle karaciğer tarafından oluşturulan yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) partikülleri, dokular ile diğer lipoproteinler arasında birkaç çeşit lipit barındırır. Makrofajlar aracılı taşınma lipitlerin periferik dokulardan karaciğere ulaşmasından sorumludur. Lipit metabolizması insan için elzem sinyal yollarına steroid üzerinden sitokin ve hormonal üretimi, enerji metabolizmasının temelini oluşturmaları ile metabolizmayı yani aslında hücrelerin ve dokuların hemostazından sorumludur. Singh ve diğ ,2009)

APOBR geni reactome sinyal yolları setinde araştırıldığında Lipoprotein fonksiyonunun üç yönü karşımıza çıkmaktadır: i. şilomikron aracılı lipit aktarımı, ii.LDL endositoz ve LDL yıkımı ve iii.HDL aracılı lipit aktarımı mekanizmaları üzerinden lipit metabolizması ile karşılaşılır (Reactome 2019)

Diyetle alınan şilomikronların çoğunluğu apoE yoluyla karaciğer tarafından temizlenen kalıntılara lipolize edilse de, küçük ama önemli bir şilomikron fraksiyonunun doğrudan kemik iliğinde ve dalakta makrofajlar gibi retikuloendotelyal hücreler tarafından temizlendiği görülmüştür. (Redgrave 2004). Burada retikuloendotelyal sistemin önemli komponenti olan makrofajlardaki reseptörlerin hem lipit metabolizması üzerindeki etkisi

hem de karaciğere barsaktan gelen lipidler aracılı taşıyıcı görevi düşünüldüğünde özellikle karaciğer metastazı yapan bir kolorektal kanserde etkili olabileceği düşünülerek tespit ettiğimiz APOBR gen varyantının mutlaka bu açıdan çalışılması gerektiğini düşünmekteyiz.

SOMATİK TÜM EGZOM DİZİSİ SÜRÜCÜ GENLER , FİLOGENETİK AĞAÇ, KOPYA SAYISI DEĞİŞİMLERİ VE PATOJENİK VARYASYONLAR.

Her bir hasta için sürücü genlerin tespiti sırasında dikkat çekici bir veri izlenmiştir. Özellikle tüm hastaların birbirinden bağımsız olarak farklı sürücü genlere sahip olduğunu farklı dokulardaki belirgin sürücü varyantları gösteren ısı haritası (Çizim 4.1)ve tüm dokuları değerlendiren varyasyon benzerlik matrisi (Çizim 4.2) ile belirlenmiştir.

Bu tablolar üzerinden hastaların dokularının da dördüncü hasta haricinde birbirlerine benzemediği ortaya çıkmıştır. Her bir süreç özgündür. Data analizi sadece dördüncü hastada ve muhtemel hipermutasyon profili nedeniyle özellikle kanser primer dokusu ve metastazının benzerlik oranının arttığını göstermiştir (Çizelge 4.30) Bu durum hipermutasyon ile dokuların benzerlik katsayılarının arttığını ve bir anlamda daha homojen bir hastalık ile mücadele etmek anlamına gelebileceğini düşündürmüştür. Hipermutasyona sahip hastalarda tedavi yanıtlarının daha iyi olduğu rapor edilirken (Cancer Genome Atlas Network. 2012) bu durum mutasyon yükü arttıkça ilaçların etki edeceği alanı yakalama olasılığının artması veya özellikle metastatik hastalıkta primer tümör ve metastazda aynı mutasyona karşı aynı ajanların kullanılmasına bağlanabilir. Ancak bu genel kaniya rağmen datamızda dördüncü hastanın tedavi sonrası yaşam süresi öngörülenin aksine 7 ay gibi kısa bir süre olmuştur. Buradaki bir diğer önemli nokta Jacob benzerlik katsayısı gösteren çizelgelerde görüldüğü üzere primer tümöre ile olandan daha fazla yüzde oranı ile mikroçevre dokusu ile metastaz dokusu arasındaki benzerlik katsayısının tespit edilmesi ve aslında bu oranların genel anlamda çok düşük olmasına bağlı olarak her dokunun özgün olmasıdır. Bu da kanserin dokular arasındaki moleküler heterojenliğini gösteren bulgulardan birisidir. (Çizelge: 4.24, 4.26,4.28,4.30,4.32)

Özellikle hastaların her birine özel tespit edilen patojenik varyantların diğer hastalarda izlenmemesi de önemlidir. Bu her hastaya ayrı bir hastalık gibi yaklaşmanın gerekliliğini ortaya koymaktadır. Hastaların profillerindeki farklılık tedavi planlarını belirleyecektir.

Kromozomal kopya sayısı değişimleri ile ilgili sonuçlar ekzom datası üzerinden tüm genom datası ile kıyaslanamayacak limitli bir data ile oluşturulmuş veriden elde edilmiştir. Burada metastaz dokusunun primer tümöre göre kromozomal instabilitesinin mikroçevre ile olan benzerliği dikkat çekicidir. Bu benzerlik primer tümördeki yoğun kromozomal

instabiliteden uzaktır (Çizim 8-17). Bu da metastazın primer tümör'den ziyade mikroçevre ile olan kromozomal benzerliğinin belki de kanser metastazı için primer tümörden bağımsız mikroçevrenin etkinliği ile açıklanabilir. (Egeblad ve diğ 2010), (Hu ve Polyak 2008) Aynı zamanda mikroçevrenin ve karaciğer metastazının somatik mutasyon profilinin benzerliği de daha önce farklı çalışmalarda da dile getirilen ancak henüz tam olarak ispatlanamayan kanserin erken evresinde primer tümör oluşurken eş zamanlı sirkülasyona dağılan hücrelerin metastazdan sorumlu olabileceği teorisini desteklemektedir. Bu teori primer tümör mikroçevresi ile karaciğer metastazı arasındaki somatik mutasyonel benzerliği açıklayabilir.

6. SONUÇ:

Datamızda hastalarda ortak izlenen mutasyonlar ve karaciğere spesifik olabilecek mutasyonlar incelendiğinde genlerin çeşit ve fonksiyonundaki çeşitlilik dikkat çekicidir. Ayrıntılı olarak genlerin özellikleri incelendiğinde her birinin farklı sistemler ve fonksiyonlarla ilişkili olduğu görülmüştür. MUC2'nin mukozal bariyer ve immun sistem ile olan ilişkisi, APOBR'nin lipit metabolizması üzerinden enerji metabolizması ve diyetle alınan şilomikronaların kolondan karaciğere taşınmasından sorumlu makrofaj resptörü olarak kolondan karaciğere bir taşıyıcı fonksiyonu yoluyla, RGP4 ve EEF1A1 genlerindeki varyasyonların özellikle immun sistem ,makrofaj ve sitokinler ile olan ilişkisi üzerinden henüz tam olarak anlaşılmamış kompleks süreçlerle tespit edilen varyasyonların kolon kanserinin karaciğer metastazında etkin olabilecekleri sonucuna varılmıştır.

Kolon kanseri ve karaciğer metastazlarında meydana gelen tespit edebildiğimiz (ekzonik data ile elde edilebilen) her çeşit varyasyonu katarak bütüncül bir yaklaşımla hem DNA üzerindeki ekzom, intron ve UTR alanlarının önemini hem de immun sistem ile birlikte primer tümör mikroçevresinin rolünü anlamak gerekmektedir. Bu açıdan UTR3 alanında tespit ettiğimiz varyasyonu ile ZNF704 geni özellikle hepatik karsinogenezdeki rolü açısından yapılan yayınlar da göz önüne alındığında araştırmamızın ileride çalışılması gerekliliğini öngördüğü önemli genlerden biridir.

Kolorektal kanser mikroçevresinin en az metastaz dokusu kadar mutasyonel değişikliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Özellikle somatik varyasyonları gösterilmiş mikroçevre varlığının, germline bir yatkınlık taşınması durumunda karsinogenez sürecini destekleyeceği bilinmektedir. Bu noktada germline varyasyonlarda izlediğimiz PRAMEF10 ve SLC9B1 genlerindeki iki varyasyonun özellikle hücre hemostazı üzerine etkilerinin olduğu araştırmamızın önemli tespitleri içinde yer almaktadır. Bizim datamızın özgün

bulgularından en önemlisi FAM25C geni varyasyonudur. FAM25C geni 10. Kromozomda tümör süpresör ve onkogenlere komşu yerleşimli , geniş data setlerde sıkça rastlan ancak henüz literatürde araştırılmamış önemli bir gendir ve çalışmamızda tarif edilen varyantın mutlaka bu açıdan çalışılması gerekliliği ortaya koyulmuştur.

7. KISITLILIKLAR

Tüm ekzom dizileme verisinde okuma derinliği arttıkça özellikle tespit edilen varyasyonlara ek olarak daha nadir izlenen ancak etkin olabilecek yeni varyasyonlar tespit edilebilir. Ortalama 60 X okuma derinliği ile oluşturduğumuz datamız bu yönüyle daha derin bir okuma seviyesi ile daha fazla etkin varyasyonu tespit edebilme potansiyeline sahiptir.



KAYNAK DİZİNİ

- Aggarwal CC, Zhai C. Mining text data. *Springer Science & Business Media*.2012; 21: 95-110.
- Albo D, Akay CL, Marshall CL ve diğ. Neurogenesis in colorectal cancer is a marker of aggressive tumor behavior and poor outcomes. *Cancer*. 2011; 117(21): 4834-45.
- Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC ve diğ. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013; 500(7463): 415
- AlixPanabières C, Pantel K. Circulating tumor cells, liquid biopsy of cancer. *Clinical chemistry*. 2013; 59(1), 110-18.
- Arendt BM, Comelli EM, Ma DW ve diğ. Altered hepatic gene expression in non alcoholic fatty liver disease is associated with lower hepatic n-3 and n-6 poly unsaturated fatty acids. *Hepatology*. 2015; 61(5): 1565-78.
- Arrieta MC, Bistritz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut*. 2006; 55(10), 1512-20
- Bao Y, Zhao TL, Liang XL ve diğ. High eukaryotic translation elongation factor 1 alpha expression promotes proliferation and predicts poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Neoplasma*. 2019; 44(45):125-35
- Bardelli A, Corso S, Bertotti A ve diğ. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer discovery*. 2013; 3(6): 658-73.
- Bendas G, Borsig L. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *International journal of cell biology*. 2012; 65(27):125-96
- Bernstein BE, Stamatoyannopoulos JA, Costello JF ve diğ. The NIH road map epigenomics mapping consortium. *Nature biotechnology*. 2010; 28(10): 1045.
- Bick D, Dimmock D. Whole exome and whole genome sequencing. *Current opinion in pediatrics*. 2011; 23(6):594-600.
- Brabletz S, Schmalhofer O, Brabletz T. Gastrointestinal stem cells in development and cancer. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 2009; 217(2): 307-317.
- Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA ve diğ. EMT in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2018; 18(2): 128.
- Brands JH, Maassen JA, Van Hemert F J ve diğ. The primary structure of the α subunit of human elongation factor 1: Structural aspects of guanine-nucleotide-binding sites. *European journal of biochemistry*. 1986; 155(1): 167-171.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I ve diğ. Global cancer statistics GLOBOCAN estimates of incidence and mortality World wide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018; 68(6): 394-424.
- Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature review scancer*. 2005; 5(2): 231.
- Brown ML, Ramprasad MP, Umeda PK. A macrophage receptor for apolipoprotein B48: cloning, expression, and atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97(13): 7488-93.
- Burkey TE, Skjolaas KA, Minton JE. Board-invited review: porcine mucosal immunity of the gastrointestinal tract. *Journal of animal science*. 2009; 87(4): 1493-1501.

- Buttigieg PL, Morrison N, Smith B, Mungall CJ, Lewis SE, EnvoConsortium. The environment ontology: contextualising biological and biomedical entities. *Journal of biomedical semantics*. 2013; 4(1): 43.
- Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012; 487(7407): 330.
- Cantor JR, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer discovery*, 2012; 2(10): 881-98.
- Carlson JJ, Roth JA. The impact of the Oncotype Dx breast cancer assay in clinical practice: a systematic review and meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2013; 141(1): 13-22.
- Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *The Lancet*. 1993; 341(8855): 1251-4.
- Chaffer CL and Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011; 331(6024): 1559-64.
- Chang L, Chang M, Chang HM, Chang F. Microsatellite instability: a predictive biomarker for cancer immunotherapy. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2018; 26(2): e15-e21.
- Chen HQ, Zhao J, Li Y, He LX ve diğ. Gene expression network regulated by DNA methylation and microRNA during microcystin-leucine arginine induced malignant transformation in human hepatocyte L02 cells. *Toxicology letters*. 2018; 289: 42-53.
- Cheng A, Zhao S, FitzGerald LM ve diğ. A four-gene transcript score to predict metastatic-lethal progression in men treated for localized prostate cancer: Development and validation studies. *The Prostate*. 2019.
- Chin L, Andersen JN, Futreal PA. Cancer genomics: from discovery science to personalized medicine. *Nature medicine*. 2011; 17(3): 297.
- Chintapalli VR, Kato A, Henderson L. Transport proteins NHA1 and NHA2 are essential for survival, but have distinct transport modalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015; 112(37): 11720-5.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420(6917): 860.
- Cunanan KM, Gonen M, Shen R. Basket trials in oncology: a trade-off between complexity and efficiency. *Journal of Clinical Oncology*. 2017; 35(3): 271.
- De Leon MP, DiGregorio C. Pathology of colorectal cancer. *Digestive and Liver Disease*. 2001; 33(4): 372-88.
- Deloukas P, French L, Meitinger T, Moschonas NK. Report of the third international workshop on human chromosome 10 mapping and sequencing 1999. *Cytogenetic and Genome Research*. 2000; 90(1-2): 1-12.
- Deloukas P, Earthwail ME, Grafham DV. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 10. *Nature*. 2004; 429(6990): 375.
- Denbow DM. Gastrointestinal anatomy and physiology. In: Sturkie's avian physiology. *Academic Press*. 2015; (pp. 337-366).
- Deng J, Weng X, Ye J ve diğ. Identification of the Germ line Mutation Profile in Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Whole Exome Sequencing. *Frontiers in genetics*, (2019); 10, 47.
- Dodson EO. The kingdoms of organisms. *Systematic Zoology*. 1971; 20(3), 265-281.
- Egeblad M, Nakasone, ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire

- organism. *Developmental cell*. 2010; 18(6), 884-901.
- Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature reviews Clinical oncology*. 2017; 14(10), 611.
- Fabregat A, Sidiropoulos K, Garapati P ve diğ. The actome pathway knowledge base. *Nucleic acids research*. 2015; 44(D1), D481-D487.
- Finne L, Vogt S, Fukui T ve diğ. Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2009; 36(1), 88-94.
- Franks LM, Knowles MA. What is cancer. *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. 2005; 4, 4-9.
- Gaudet P, Livstone MS, Lewis SE ve diğ. Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Briefings in bioinformatics*. 2011; 12(5), 449-462.
- Genotoloji kaynağı, <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO>
- Ghoneim DH, Myers JR, Tuttle E ve diğ. Comparison of insertion/deletion calling algorithms on human next-generation sequencing data. *BMC research notes*, 2014; 7(1), 864.
- Gianturco SH, Ramprasad MP, Song R ve diğ. Apolipoprotein B-48 or apolipoprotein B-100 equivalent media test the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the unique human monocyte-; macrophage receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998; 18(6), 968-976.
- Goubran HA, Kotb RR, Stakiw J. Ve diğ. Regulation of tumor growth and metastasis: the role of tumor micro environment. *Cancer growth and metastasis*. 2014; 7, CGM-S11285.
- Gridelli C, Peters S, Sgambato, A ve diğ. ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer treatment reviews*. 2014; 40(2): 300-306.
- Hanahan, D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-74.
- Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E. Ve diğ. Increase in intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives: a possible etiologic factor. *Annals of internal medicine*. 1986; 105(6): 883-85.
- Hou J.P, Ma J. DawnRank: discovering personalized driver genes in cancer. *Genome medicine*. 2014; 6(7): 56.
- Hu M, Polyak K. Micro environmental regulation of cancer development. *Current opinion in genetics & development*. 2008; 18(1): 27-34.
- Human Protein Atlas Consortium, 2019. Erişim: 10 Ekim 2019, <https://www.proteinatlas.org/>
- Issa AM Personalized medicine and the practice of medicine in the 21st century. *Mc Gill Journal of Medicine: MJM*. 2007; 10(1): 53.
- Johansson ME, Thomsson KA, Hansson G.C. ve diğ. Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc 2 mucin, is strongly bound to the Fcγbp protein. *Journal of proteome research*, 2009; 8(7): 3549-557.
- Kamps R, Brandão RD, Bosch, BJ ve diğ. Next-generation sequencing in oncology: genetic diagnosis, risk prediction and cancer classification. *International journal of molecular sciences*. 2017; 18(2): 308.
- Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B. Ve diğ. The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic acids research*. 2016; 45(D1), D840-D845.
- Karczewski K, Francioli L. The genome Aggregation Database (gnomAD). *MacArthurLab*. 2017.

- Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF- β signaling and epithelial–mesenchymal transition in cancer progression. *Current opinion in oncology*. 2013; 25(1): 76-84.
- Ki DH, Jeung, HC, Park C.H ve diğ. Whole genome analysis for liver metastasis gene signatures in colorectal cancer. *International journal of cancer*. 2007; 121(9): 2005-2012.
- Kim JK., SamaranyakeM, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and molecular life sciences*. 2009; 66(4): 596.
- Kim YW, Koul D, Kim SH ve diğ. Identification of prognostic gene signatures of glioblastoma: a study based on TCGA data analysis. *Neuro-oncology*. 2013; 15(7): 829-39.
- Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE ve diğ. Scan 2: somatic mutation and copynumber alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome research*. 2012; 22(3): 568-76.
- Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A ve diğ. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatic*. 2019; 35(11): 1978.
- Lee EY, Muller, WJ. Oncogenes and tumor suppress orgenes. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2010; 2(10): 003236.
- Lee YC, Kurtova AV, Xiao J ve diğ. Collagen-rich airway smooth muscle cells are a metastatic niche for tumor colonization in the lung. *Nature communications*. 2019; 10(1): 2131.
- Li J, Yen C, Liaw D ve diğ. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997; 275(5308): 1943-947.
- Liu H, Zhao H. Prognosis related miRNAs, DNA methylation, and epigenetic interactions in lung adenocarcinoma. *Neoplasma*. 2019; 66(3): 487-493.
- Mantovani A, Sica, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Current opinion in immunology*. 2010; 22(2): 231-37.
- Mantovani A, Savino B, Locati M ve diğ. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010; 21(1):27-39.
- Marzouk O, Schofield J. Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer. *Cancers*. 2011; 3(2): 2767-810.
- Marzuka A, Huang L, Theodosakis N ve diğ. Melanoma treatments: advances and mechanisms. *Journal of cellular physiology*. 2015; 230(11): 2626-633.
- Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*. 2016; 529(7586): 298-306.
- Misale S, Arena S, Lamba S ve diğ. Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Science translational medicine*. 2014; 6(224) :224-26
- Misale S, Yaeger R, Hobor S. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012; 486(7404): 532.
- Morozova O, Marra MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*. 2008; 92(5): 255-64.
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010; 11(3): 220.
- Nussbaum R L, McInnes RR, Willard HF. Thompson &Thompson genetics in medicine e-book. Elsevier Health Sciences.USA,2015

- Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic alterations in colorectal cancer: emerging biomarkers. *Gastroenterology*. 2015; 149(5): 1204-25.
- Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4(1): 71.
- Ponder BA. Cancer genetics. *Nature*. 2001; 411(6835): 336.
- Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010; 141(1): 39-51.
- Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*. 2013; 19(11):1423.
- Reactome,2019. Erişim: 10 Ekim 2019,<https://reactome.org/PathwayBrowser>
- Redgrave TG. Chylomicron metabolism. Elsevier Health Sciences,USA, 2004;
- Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine*. 2006; 12(9): 440-50.
- Rosai J. Rosai and Ackerman's surgical pathology e-book. Elsevier Health Sciences, 2011
- Rutherford SL. From genotype to phenotype: buffering mechanisms and the storage of genetic information. *Bio essays*. 2000; 22(12): 1095-1105.
- Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Current opinion in genetics and development*. 2005; 15(1): 87-96.
- Schuster SC. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature methods*. 2007; 5(1): 16.
- Sharpe AH. Introduction to check point inhibitors and cancer immunotherapy. *Immunological reviews*. 2017; 276(1): 5.
- Shay JW, Wright WE. Telomerase activity in human cancer. *Current opinion in oncology*. 1996; 8(1): 66-71.
- Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2000; 1(1): 72.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y ve diğ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009; 458(7242): 1131.
- Strachan T, Read A. Human Molecular Genetics, Garland Science, 2015
- Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009; 458(7239): 719.
- Sun X, Maquat LE. mRNA surveillance in mammalian cells: the relationship between introns and translation termination. *Rna*. 2000; 6(1): 1-8.
- Takahashi T, D'Amico D, Chiba I ve diğ. Identification of intronic point mutations as an alternative mechanism for p53 inactivation in lung cancer. *The Journal of clinical investigation*. 1990; 86(1): 363-69.
- Tamborero D, Gonzalez-Perez A, Perez-Llamas C ve diğ. Comprehensive identification of mutational cancer driver genes across 12 tumor types. *Scientific reports*. 2013; 3: 2650.
- Thomas A, Liu SV, Subramaniam DS ve diğ. Refining the treatment of NSCLC according to histological and molecular subtypes. *Nature reviews Clinical oncology*. 2015; 12(9): 511.

- Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemporary oncology*. 2015; 19(1A):A68.
- Topalian SL. Targeting immune check points in cancer therapy. *Jama*. 2017; 318(17): 1647-48.
- Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM. Sabiston Textbook of Surgery E-Book: The Biological Basis of Modern Surgical Practice. Elsevier Health Sciences. USA, 2016.
- UniProtKB,2019,Erişim:10 Ekim2019, <https://www.uniprot.org/uniprot/Q7Z3J3>
- vanWaes C. Cell adhesion and regulatory molecules involved in tumor formation, hemostasis, and wound healing. *Head & neck*. 1995; 17(2): 140-47.
- Waldner M, Schimanski CC, Neurath MF. Colon cancer and the immune system: the role of tumor invading T cells. *WJG*. 2006; 12(45): 7233.
- Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB ve diğ. Cancer Genome Atlas Research Network. The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nature genetics*. 2013; 45(10): 1113.
- Wittekind C, Neid M. Cancer invasion and metastasis. *Oncology*. 2005; 69(Suppl. 1): 14-16.
- Xu H, Ghishan FK, Kiela PR. SLC9 Gene Family: Function, Expression, and Regulation. *Comprehensive Physiology*. 2011; 8(2): 555-83.
- Yamagishi R, Kaneko H. Data from comprehensive analysis of nuclear localization signals. *Data in brief*. 2016, 6: 200-203.
- Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR ve diğ. Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *Journal of the NIH*. 2000; 92(21): 1717-30.
- You YN, Rustin RB, Sullivan JD. Oncotype DX® colon cancer assay for prediction of recurrence risk in patients with stage II and III colon cancer: A review of the evidence. *Surgical oncology*. 2015; 24(2): 61-66.

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı : Duygu ALTINOK DİNDAR
- Doğum yeri ve tarihi :İstanbul/1982
- Uyruğu :TC
- Medeni Durumu :Evli
- Çalıştığı kurum : Sağlık Bakanlığı
- İletişim Adresi ve telefonu : Seyit Ömer Mah. Vani Dergah Sok NO:50/4 FATİH/İST

2. Eğitimi (tarih sırasına göre)

2006: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi (Lisans)

2014: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi İhtisası

- Yabancı dili : İngilizce

3. Unvanları : Uzman Hekim

4. Mesleki Deneyimi : 12 yıl Tıp Doktoru, 5 yıl Uzman Hekim

5. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar :

- Türk Tabipler Birliği , İstanbul, Türkiye
- Türk Cerrahi Derneği ,Ankara, Türkiye
- Türk Biyokimya Derneği , Ankara.Türkiye
- Avrupa Komisyonu Uluslararası Kişiselleştirilmiş Tıp Konsorsiyumu, ICPeMed/Almanya,
- Avrupa Biyokimya Dernekleri Federasyonu , FEBS, UK(Birleşik Krallık)
- DSÖ Uluslararası Kanser Araştırmaları Merkezi (IARC), Kanser Tarama ve Erken Tanı Programı Çalışma Grubu

6. Bilimsel Etkinlikler

1. Bilimsel Makaleler:

‘TP53 (rs1042522)Polymorphism in Breast Cancer’

Nihal Üren, Tuğcan Korak, Duygu Altınok, Emel Ergul, Bahadır Güllüoğlu, Turgay Şimşek, Zafer Cantürk, N.Zafer Utkan, Ali Sazcı
Journal of Health Sciencesof Kocaeli University January 2016,Vol 2,No:1 pp 28-31

‘RAD51 (rs1801320)Gene polymorphism and breast cancer risk in Turkish

Population ’

IJCEP0045041,received 11-24-2016,accepted 11-28-2016, Original Article

Tuğcan Korak, Duygu Altınok, Emel Ergul, Nihal Üren, Bahadır Güllüoğlu, Turgay Şimşek, Zafer Cantürk, N.Zafer Utkan, Ali Sazcı

‘The Importance of Cancer Stem Cells in Gastrointestinal Cancers’,

Duygu Altınok Dindar , Gulsah Albayrak , Ahmet Ozet,, Critical Reviews in Oncogenesis , 2019

‘Breast Metastasis of Renal Cell Carcinoma Presenting as a Breast Lump in Male

Patient'

Wafi Attaallah, M. Ümit Uğurlu, Duygu Altınok, Emine Baş Bozkurtlar, Cumhuriyet Yeğen; Breast Case ,2012;1(1):17-19

'Dexamethasone Reduces Postoperative Emesis By Decreasing PGF2 alpha and

LTC4 Levels', Duygu Altınok, Tolga Saracoğlu, Medeni Arpa, Ozgur Baykan, A. Ozdemir Aktan Eupoean surgery Vol. 44/

Supp247 -2012

2. Basım/ Hazırlık Aşamasında Olan Bilimsel Makaleler:

'The diagnostic and prognostic value of resistin and visfatin in colorectal cancer survival', Duygu Altınok, Nihal Üren, Medeni Arpa, Özgür Baykan, Emel Ergül

'Is there a benefit of survival with simultaneously organ resections with gastrectomy of locally advanced gastric cancer' Duygu Altınok, Wafi Attaallah, Ender Dulundu, S. Cumhuriyet Yeğen

'The role of P53 codon 72 Polimorphism at the recurrence of colorectal cancer after adjuvant chemotherapy' Duygu Altınok, Nihal Üren, Emel Ergül, S. Cumhuriyet Yeğen.

'CCND1-G870A and TP53 Pro72Arg Polymorphisms in Breast Cancer.'

Duygu Altınok Dindar, Nihal Üren, Ayşen Aslı Hızlı Deniz, Emel Ergül

3. Kongre Ve Bilimsel Toplantı Sunum Ve Sözlü Bildiriler:

6. Cerrahi Araştırma Kongresi Aralık 2011 Sözlü Bildiri:

***'Meme Kanseri Cerrahisi Sonrası Hastayı Erken Dönem Drenle Taburcu Etmek Dezavantaj Yarattır mı?'** Duygu Altınok, Yasemin Nazlı, Leyla Semiha Şen, Gökhan Tazegül, Bahadır M. Güllüoğlu

18. Ulusal Cerrahi Kongresi Mayıs 2012 Sözlü Bildiri:

***'Lokal İleri Mide Kanserlerinde Genişletilmiş Organ Rezeksiyonlarının Sağkalım Üzerinde Etkisi Var mıdır?'** Duygu Altınok, Wafi Attaallah, Ender Dulundu, Ş. Cumhuriyet Yeğen

***'Tıkanma Sarılığı Etyolojisinde Laboratuvar Bulgularının Ayırıcı Tanıdaki Yeri'**

Duygu Altınok, Elif Özçimen, Asım Cingi, Ş. Cumhuriyet Yeğen

16. Annual Meeting of the European Society of Surgery Oral Presentation:

***'Dexamethasone Reduces Postoperative Emesis By Decreasing PGF2 alpha and LTC4 Levels,** Duygu Altınok, Tolga Saracoğlu, Medeni Arpa, Ozgur Baykan, A. Ozdemir Aktan

19. Ulusal Cerrahi Kongresi Nisan 2014 Sözlü Bildiri:

***‘Kolorektal Kanserde P53 codon 72 Polimorfizminin Tümör Evresi ve Adjuvan Kemoterapi Sonrası Nükslerdeki Rolünün Araştırılması’**, Duygu Altınok, Nihal Üren, Salih Demircioğlu, Ferhat Yıldız, Emel Ergul, Şevket Cumhuriyet Yeğen

Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD , Kocaeli

***‘Obezite Cerrahisinin Yaşam Kalitesi ve Yandaş Hastalıklar Üzerine Etkileri’**

Duygu Altınok, Asım Cingi, Hayriye Baykan

16. Türk Kolorektal Cerrahi Kongresi Nisan 2016 Sözlü Bildiri:

‘The diagnostic and prognostic value of resistin and visfatin at colorectal cancer’

Duygu Altınok, Wafı Attaallah, Salih Demircioğlu, Nihal Üren, Medeni Arpa, Özgür Baykan

FEBS Advanced Course: Emerging issues of breast cancer research - tumour heterogeneity, immunotherapy, and cellular metabolism April 4-6, 2018 Budapest, Hungary

***CCND1-G870A and TP53 Pro72Arg Polymorphisms in Breast Cancer.**

Duygu Altınok Dindar, Ayşen Aslı Hızlı Deniz, Nihal Üren, Emel Ergül

4.Organizasyonunda Yer Alınan Veya Davetli Konuşmacı Olarak Katılım Sağlanan Toplantı Ve Kongreler:

24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 8. Klinik Farmakoloji Sempozyumu ve 7. Klinik Toksikoloji Sempozyumu, 17 - 21 Ekim 2017, ‘Kanser Genom Projesi’ Opr. Dr. Duygu Altınok Dindar

“Doğru Tıbbi Uygulamalar (*Precision Medicine*) ve Dönüşümsel Tıp (*Translational Medicine*) nedir? Kişiselleştirilmiş Tıbbın (*Personalized Medicine*) önemi ve Türkiye’de Yapılması Gerekenler” 13 Mart 2018 TÜBİTAK/ ANKARA

“Doğru Tıbbi Uygulamalar ve Dönüşümsel Tıp adına Atılması Gereken Adımlar” Opr. Dr. Duygu ALTINOK DİNDAR

IV. Türk Tıp Dünyası Kurultayı 2017, Ankara ,Kanser Çalıştayı , ‘Kanserde Klinik Araştırmalar Ve Uygun Ekosistem’ Opr. Dr. Duygu Altınok Dindar

Computational Genomics and Health Informatics Workshop Digitalization of Medicine Today and Tomorrow, 2018 Sehir University /Istanbul

‘Translational Medicine or How Cancer Therapy Evolved in time? Opr. Dr. Duygu Altınok Dindar

V. Türk Tıp Dünyası Kurultayı ; Kanser & Diyabet Çalıştayı ; Çalıştay Bilimsel Sekreteryası Opr. Dr. Duygu Altınok Dindar

İstinye Üniversitesi 2.Moleküler Kanser Zirvesi / 23-24 Mart 2019 ‘Türkiyede Kanser Tanı Ve Tedavisinde Yeni Nesil Dizileme’ Uzm. Dr. Duygu Altınok Dindar

Gebze Teknik Üniversitesi Biyoinformatik Forumu Mayıs 2018; Panelist Opr. Dr. Duygu Altınok Dindar

HealthTECH World Cancer Day Gebze Teknik Üniversitesi Şubat 2018 , Panelist Opr. Dr. Duygu Altınok Dindar

Hedef Kanser Sempozyumu 2019, KIBRIS, Türkiye Meme Kanseri Çalışma Grubu, Panelist Opr. Dr. Duygu Altınok Dindar

5.Aldığı Ödüller

2012 Yılı TCD Prof. Dr. Ahmet Yayıoğlu Proje Yarışması 1. lik Ödülü

‘Kortikosteroidlerin Postoperatif Emezis Üzerindeki Antiemetik Etki Mekanizmasının Araştırılması Projesi’

6.Cerrahi Araştırma Kongresi Sözlü Bildiri 3.lük Ödülü

‘Meme Kanseri Cerrahisi Sonrası Hastayı Erken Dönem Drenle Taburcu Etmek Dezavantaj Yararır Mı?’ Duygu Altınok, Yasemin Nazlı, Leyla Semiha Şen, Gökhan Tazegül, Bahadır M. Güllüoğlu

2018 FEBS Genç Araştırmacı Destek Ödülü

‘Meme Kanseriinde CCND1-G870A and TP53 Pro72Arg Polimorfizmi Araştırması , 2018 Duygu Altınok Dindar, Nihal Üren, Emel Ergül, Ali Sazci, Bahadır M. Güllüoğlu

