



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

**Paranasal Sinüs Tümöründe Moleküler Hedef Oluşturan Genomik Profilin
Belirlenmesi**

Proje No: TGA-2020-22306

Genel Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Sercan GÖDE
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi/ Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü/ Kulak Burun
Boğaz Hastalıkları AD

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ- Tıbbi Biyoloji AD
Prof. Dr. Ali VERAL - Tıbbi Patoloji AD
Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI -Tıbbi Biyoloji AD
Öğr. Gör. Göksel TURHAL - Kulak Burun Boğaz Hastalıkları AD
Arş. Gör. Bakiye GÖKER BAĞCA - Tıbbi Biyoloji AD
Arş. Gör. Neslihan Pınar ÖZATEŞ - Tıbbi Biyoloji AD

Ocak 2022

İZMİR

Önsöz

Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne "Paranasal Sinüs Tümöründe Moleküler Hedef Oluşturan Genomik Profilin Belirlenmesi" isimli projemizi "TGA-2020-22306" numara ile destekleyerek nadir görülen paranasal sinüs kanserlerinde temel moleküler hedeflerin araştırılmasını ve tedavideki potansiyelini araştırmamızı sağladıkları için teşekkür ederiz.

İçindekiler

İçindekiler	4
Tablolar Dizini.....	5
Özet.....	7
1. Giriş	11
2. Genel Bilgiler	12
3. Gereç ve Yöntem.....	17
3.1. Olguların belirlenmesi ve çalışma materyalinin temin edilmesi	17
3.2. Genomik profilin belirlenmesi	17
3.3. Hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi.....	35
3.4. İstatistiksel analizler	41
4. Bulgular.....	42
4.1. Olguların demografik dağılımı	42
4.2. Olguların mutasyon profili.....	44
4.3. Olguların gen ekspresyon profili	52
5. Tartışma	55
6. Sonuç	90
Referanslar.....	91

Tablolar Dizini

Tablo 1. Çalışmaya alınma, dışlama ve çalışmadan çıkarılma kriterleri.....	17
Tablo 2. Varyant ve/ veya kopya sayısı değişimleri değerlendirilen genler	18
Tablo 3. Hedefleme adayı olma potansiyeli taşıyan genlere ait primer tasarımları.....	39
Tablo 4. Olguların demografik özellikleri.....	42
Tablo 5. DNA izolasyon sonuçları	44
Tablo 6. Kütüphane konsantrasyon ve fragment uzunluğu sonuçları	45
Tablo 7. Olgularda en yüksek oranda belirlenen klinik anlamlı varyantlar ($n \geq 20$).....	50
Tablo 8. Tümör dokularında kontrole göre gen ekspresyon değişimleri (fold regulation)	52

Şekiller Dizini

Şekil 1. Genomik profilin belirlenmesi iş akışı.....	18
Şekil 2. CLC Genomics Workbench 20 sistemi ana ekran görüntüsü	33
Şekil 3. QCI Analyze sistemi sonuç ekranı görüntüsü	34
Şekil 4. QCI interpret sisteminin değerlendirme sonucu (b150 kodlu olgu, TP53 geni, patojenik bir varyant için örnek görünüm).....	35
Şekil 5. Hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi iş akışı.....	35
Şekil 6. Hücre yüzeyinde, baş-boyun kanserlerinde ve epitel hücrelerde ifade edildiği belirlenen genlerin sayısı.....	39
Şekil 7. Örneklerden birinin Qiaxcel analiz görünümü. Bu örnek için ortalama fragment uzunluğu 377 bp.	44
Şekil 8. Varyantların gruplandırılması	45
Şekil 9. Genlere ve gen bölgelerine göre varyantların dağılımı	46
Şekil 10. Varyantların ekzonlara göre dağılımı a.Tüm, b.Eşsiz varyantlar	47
Şekil 11. Ekzon, 3'UTR, 5'UTR ve promotör bölgelerinde ortak varyant taşıyan olgu sayısı .	48
Şekil 12. Patojenik ve olası patojenik varyantların ekzonlara göre dağılımı a.Tüm, b.Eşsiz varyantlar.....	49
Şekil 13. Ekzon bölgelerinde patojenik ya da olası patojenik varyant taşıyan olgu sayısı.....	50
Şekil 14. Tüm olgularda en yüksek oranda belirlenen varyantlar ($n \geq 20$)	52
Şekil 15. Gen ekspresyon değişimini gösteren ısı haritası	53
Şekil 16. Gen ekspresyon değişimini gösteren scatter plot	53
Şekil 17. Gen ekspresyon değişimini gösteren volcano plot.....	54

Özet

Paranasal sinüs karsinogenezinde tedavi hedefi oluşturabilecek genomik profilin belirlenmesi

Paranasal sinüs tümörleri nadir ve heterojen bir kanser türüdür. Beş yıllık sağ kalım oranının yüzde ellinin altında olmasının yanında tümör odağının hastanın görme, duyma, beslenme gibi temel fonksiyonlarını yerine getiremeyecek şekilde çıkarılmak zorunda olması, sağ kalan olgular için de yaşam kalitesinin önemli ölçüde düşmesi anlamına gelmektedir. Bu kanserde tedavi seçeneklerinin cerrahi müdahale ve konvansiyonel terapi yöntemleriyle sınırlı olması, hastaların modern “hedefli tedavi” yaklaşımlarından yoksun kalmasına neden olmaktadır. Güncel kanser tedavi yaklaşımları hedefe yönelik tedavilere odaklanmıştır. Bu amaçla tüm kanserlerin genetik profillerinin belirlenmesi, tedavi hedeflerinin ortaya konulması bakımından oldukça önemlidir. Bu bağlamda, çalışmamızın temel amacı var olan kısıtlı güncel genetik bilgiler temel alınarak, hem bir yandan hastalığın moleküler biyolojisini aydınlatmaya ve hastaların klinik sürecine katkıda bulunmaya yarayacak genomik alterasyonların belirlenmesi ve bu hedeflere yönelik ilaç önerilerinin tanımlanması hem de eş zamanlı olarak bu kanser tipi hücrelerine spesifik hücre yüzey markırlarının tanımlanarak hedefe yönelik tedavi stratejisinin sağlanmasıdır.

Bu amaç doğrultusunda, projemizin çalışma materyalini, 29.04.2020 tarihli 20-4.2T/24 numaralı etik kurul onayı alınmış olan örneklerden izole edilen DNA ve RNA materyalleri oluşturmuştur. Yeni nesil sekanslama ile hastalık patolojisinde görev alan mutasyonların belirlenmiş, eş zamanlı olarak gerçek zamanlı PCR çalışmaları ile kanser tipine özgü hücre yüzey belirteçleri saptanmıştır.

Yeni nesil sekanslama analizi sonucunda 30 olguda toplam 28.420 adet varyant (11.353 eşsiz varyant) tanımlanmıştır. Bu varyantların %10'u daha önceden tanımlanmış olmakla birlikte yaklaşık %90'ı ilk defa tanımlanmış varyantlardan oluşmaktadır. Ekzon bölgelerinde patojenik ve olası patojenik özelliğe sahip 1.747 adet eşsiz varyant literatürde ilk defa tanımlanmıştır. Gen düzeyinde değerlendirildiğinde ERBB2 geninde en fazla sayıda varyant, patojenik ve olası patojenik özellikte varyant belirlenmiştir. Olguların tümünde en az bir tane patojenik veya olası patojenik EGFR varyasyonu belirlenmiştir. Ayrıca TP53 geninin 5'UTR ve promotör, KRAS'ın 3'UTR bölgelerinde sık olarak varyasyonlar belirlenmiştir. Gen ekspresyonu sonuçları değerlendirildiğinde VCAM1 geninin ekspresyon düzeyi kontrole göre anlamlı şekilde yüksek olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular paranazal sinüs tümörlerinde tedavi hedeflerinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Bu bulguların, bu nadir kanser türünün kliniği açısından oldukça önemli olacağını öngörmekteyiz.

Abstract

Determination of the genomic profile that might be the treatment target in paranasal sinus carcinogenesis

Paranasal sinus tumors are a rare and heterogeneous type of cancer. The fact that the five-year survival rate is below fifty percent, and that the tumor focus must be removed in such a way that the patient cannot perform basic functions such as vision, hearing and nutrition, means that the quality of life for the survivors decreases significantly. The fact that treatment options in this cancer are limited to surgical intervention and conventional therapy methods cause patients to be deprived of modern "targeted treatment" approaches. Current cancer treatment approaches focus on targeted therapies. For this purpose, determining the genetic profiles of all cancers is very important in terms of revealing the treatment targets. In this context, the main aim of our study is to determine the genomic alterations that will help to illuminate the molecular biology of the disease and contribute to the clinical process of the patients, and to define drug recommendations for these targets, and to simultaneously identify cell specific cells for these cancer cells, based on the limited current genetic information. is to provide a targeted treatment strategy by identifying surface markers.

For this purpose, the study material of our project consisted of DNA and RNA materials isolated from the samples, which were approved by the ethics committee numbered 20-4.2T/24 dated 29.04.2020. Mutations involved in disease pathology were determined by next-generation sequencing, and cell surface markers specific to cancer type were determined simultaneously with real-time PCR studies.

As a result of next generation sequencing analysis, a total of 28,420 variants (11,353 unique variants) were identified in 30 cases. While 10% of these variants have been previously described, approximately 90% are variants identified for the first time. 1,747 unique variants with pathogenic and possibly pathogenic features in exon regions have been described for the first time in the literature. When evaluated at the gene level, the highest number of variants, pathogenic and possibly pathogenic variants were determined in the ERBB2 gene. At least one pathogenic or possibly pathogenic EGFR variation was detected in all cases. In addition, frequent variations were detected in the 5'UTR of the TP53 gene and the 3'UTR of the promoter, KRAS. When the gene expression results were evaluated, the expression level of the VCAM1 gene was determined to be significantly higher than the control.

As a result, our findings are very important in terms of determining the treatment targets in paranasal sinus tumors. We predict that these findings will be very important in terms of the clinic of this rare cancer type.

1. Giriş

Güncel kanser tedavi yaklaşımları, derin moleküler çalışmalar ile desteklenen, hedefe yönelik tedavilere odaklanmıştır. Bu doğrultuda tüm kanserlerin genomik profillerinin belirlenmesi, tedavi hedeflerinin ortaya konulması bakımından oldukça önemlidir.

Nadir ve heterojen bir kanser tipi olan paranazal sinüs tümörlerinde literatür özeti bölümünde detaylandırılan şekilde genellikle olgu bazında bazı genlere ait mutasyonlar araştırılmış ve tanımlanmış olmakla birlikte henüz herhangi bir sürücü mutasyon tanımlanmamış ve hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin ortaya koyulmamış olması nedeniyle güncel tedavi seçenekleri cerrahi müdahale ve bazı durumlarda uygulanan konvansiyonel terapi yöntemleriyle sınırlı kalmış durumdadır. Bu durum hem beş yıllık sağ kalım oranının yüzde ellinin altında olmasına hem de primer tümörün opere edilmesinin ardından hastanın görme, duyma, beslenme gibi temel fonksiyonlarını yerine getiremeyecek bir sürece girmesine neden olmaktadır.

Bu konu kapsamında; sunulan projenin temel amaçları doğrultusunda ilk olarak paranazal sinüs tümörlerinde rol oynayan alterasyonların (mutasyon ve kopya sayısı değişimleri) etik onayı alınmış gönüllü olgulardan alınan arşiv materyali kullanılarak belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mutasyon ve hedefe yönelik ilaç sürecinin tamamlayıcı noktasında ise, bu ilaçların doğrudan ilgilenilen kanser hücrelerini hedeflemesinde kullanılacak hücre yüzey belirteçlerinin tanımlanması gerçekleştirilmiştir.

2. Genel Bilgiler

Baş-boyun kanserlerinin dünya çapında insidansı yaklaşık 900000, mortalite oranı ise yaklaşık %50' dir (Bray vd., 2018). Tüm kanser vakalarının yaklaşık %5'ini oluşturmakla birlikte oral kavite, tükürük bezleri, kulak, orofarenks, larinks, hipofarinks, nasal kavite ve paranasal sinüslerden köken alan heterojen bir yapıya sahiptir (Stoyanov vd., 2017).

Paranasal sinüsler, solunum sırasında havanın geçtiği burun ve çevresindeki mukus üreten hücrelerle kaplı boşluklardır (Şekil 1). Bu sinüsler, arasında yer aldıkları kemiklere göre birkaç alt tipe ayrılır: Frontal sinüsler alnın alt tarafında burnun üstünde bulunur. Maksiler sinüsler, burnun her iki tarafındaki elmacık kemiklerinde bulunur. Etmoid sinüsler gözlerin arasında, üst burun yanındadır. Sfenoid sinüsler, kafatasının ortasında, burun arkasındadır. Nasal kavite burnun açıldığı boşluktur. Paranasal sinüsler ve nasal kavite, akciğere ulaşmadan önce havayı ısıtır, nemlendirir ve filtre eder. Ayrıca bu solunum organları konuşmaya da yardımcı olmakta ve sahip oldukları özel hücrelerle beyne koku sinyallerinin gönderilmesini sağlamaktadır (Cappello ve Dublin, 2018).

Paranasal sinüs tümörleri insidansı 100000'de 0,56 olan nadir bir kanser türüdür ve baş- boyun bölgesindeki tüm malignitelerin yaklaşık % 3,6' sını oluşturur. Histolojik olarak incelendiğinde PST' lerin yarısından çoğunu skuamoz hücreli karsinom oluşturmakta (%52) ve bunu adenokarsinomlar (%13) takip etmektedir. Anatomik olarak değerlendirildiğinde ise primer tümörlerin %44'ü nasal kavite, %36'sı ise maksiler sinüs orijinlidir (Turner ve Reh, 2012). Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara oranla 1,8 kat yüksektir ve beş yıllık sağ kalım oranı her iki cinsiyet için de %48'dir (Curado vd., 2009). Bölgesel ve uzak metastazlar çok sık görülmemektedir, lenf nodu tutulumu yüzde dokuza ulaşabilmekle birlikte uzak metastaz oranı yüzde onun altındadır (Bossi vd., 2016).

Risk faktörleri ele alındığında, izopropil alkol üretimi, deri tozu, nikel bileşikleri, krom bileşikleri, radyum, talaş tozu gibi etmenlere mesleki maruziyetin paranasal sinüs tümörleri ile güçlü ilişkisi olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Talaş tozu, deri tozu, nikel, radyum, doğal tanenler ve formaldehitin bu kanserle ilişkisi epidemiyolojik verilerle de desteklenmektedir (Charbotel vd., 2014). Mesleki maruziyetin yanında sigara tüketiminin de paranasal sinüs tümörü riskini yaklaşık 3 kat arttırdığı belirlenmiştir (Gandini vd., 2008).

Gerek insidansının düşük olması, gerek heterojen yapısı, gerekse anatomik olarak ulaşılması zor bölgelerden köken alması genetik bilginin sınırlı düzeyde kalmasına neden olmuştur. Günümüze kadar, paranasal sinüs tümörlerini moleküler açıdan inceleyen

araştırmalar daha oldukça sınırlıdır ve patogenezinde rol alan herhangi bir sürücü mutasyon henüz tanımlanmış durumda değildir.

Malign paranasal sinüs tümörlerinin tedavisinde bugün izlenmekte olan protokol zet olarak; semptomları takiben gerçekleştirilen endoskopi, bilgisayarlı tomografi ile görüntüleme, biyopsi, multidisipliner onkolojik değerlendirmenin ardından evreleme, cerrahi müdahale ve eşlik edebilen radyoterapi ya da konvansiyonel kemoterapi uygulaması şeklinde (Lund vd., 2016). Temel tedavi yaklaşımının tümörün eksize edilmesini içermesi, olguların operasyonun ardından beslenme gibi hayati fonksiyonlarının engellenmesine ve yaşam kalitelerinin oldukça düşmesine yol açmaktadır. Gerek nadir görülmesi gerekse köken aldėėı bölgelerin heterojenitesi nedeniyle diğer çoğu kanser türünden farklı olarak tedavi uygulamalarında cerrahi müdahale dışında bir konsensus bulunmaması klinik açıdan karşılaşılan en temel sorundur. Bu alanla ilgilenen klinisyenlerin karşılaştıkları en önemli problemlerden bir diğeri de prognostik bir belirtecin olmamasıdır.

Paranasal sinüs tümörlerinin genetiğine dair tedavi hedefi oluşturma potansiyeli sağlayan güncel literatür bilgisi değerlendirildiğinde özellikle PIK3CA ve TP53 mutasyonlarının varlığı ne çıkmaktadır (Chung vd., 2015). Paranasal sinüs tümörlerinde en yaygın olarak belirlenmiş mutasyonlar PIK3CA geninde tespit edilmiştir. On üç hastanın incelendiği bir çalışmada hasta grubunda %20 oranında PIK3CA mutasyonu belirlenmiştir (Chung vd., 2015). McBride ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise hastaların %16'sında PIK3CA mutasyonu belirlenmiştir (McBride vd.,2014). Benzer şekilde Qui ve arkadaşları inceledikleri olguların %11'inde PIK3CA mutasyonu belirlemişlerdir (Qui vd., 2006). PIK3CA geni PI3K/AKT yolağında görevli bir katalitik proteini kodlamaktadır ve alterasyonları farklı tipte maligniteler ile ilişkilendirilmiştir (ncbi 1). Bu nedenle paranasal sinüs tümörleri ile ilişkisinin tanımlanabilmesi için PIK3CA geninin mutasyon profilinin daha detaylı olarak tanımlanması ve bu sinyal yolağının temel bileşeni olan ve henüz paranasal sinüs tümörlerinde araştırılmamış olan AKT1 geninin mutasyon durumunun belirlenmesi oldukça önemlidir. TP53 geni kritik bir tümör spresrdr ve tüm malignitelerin yaklaşık olarak yarısında bu gene ait mutasyonların varlığı bilinmektedir (ncbi 2). Paranasal sinüs tümörleri açısından incelendiğinde ise farklı olgu gruplarında sırasıyla %15 ve %9 oranında TP53 mutasyonunun varlığını belirlemişlerdir (Chung vd., 2015; Qui vd., 2006). Bununla birlikte incelenen bu kritik iki gen için de araştırmalar belirli ekzon bölgeleri ile sınırlandırılmıştır. Özellikle temel sinyal yolaklarının parçalarını oluşturan bu genlerin daha detaylı olarak araştırılması tedavi hedefi oluşturabilecek yapının aydınlatılması bakımından

önemlidir. EGFR (ERBB), ERBB2 ve ERBB3 genleri EGF ailesine üye tirozin kinazlardır ve bu ailenin genetik alterasyonları pek çok farklı kanser tipi ile ilişkilendirilmiştir (ncbi 3; ncbi 4). Chung ve arkadaşları inceledikleri 13 olguda %10 oranında EGFR mutasyonu tanımlamışlardır (Chung vd., 2015). Benzer şekilde, 22 adet sinonazal skuamoz hücreli karsinom örneği ise EGFR geninin hotspot bölge mutasyonları bakımından değerlendirilmiş ve ekzon 19 ve 22’de mutasyon tespit edilmiştir (Udager vd., 2015). Bununla birlikte bu gene ait hotspot bölgeler dışında kapsamlı şekilde araştırmaya ihtiyaç olduğu açıktır. ERBB2 ve ERBB3 genlerinin incelediğimiz kanser grubundaki mutasyon durumunu belirten herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte, ekspresyon artışı olduğunun belirlenmesi dikkat çekicidir (Lopez vd., 2012). Ras onkogen ailesi, pekçok farklı malignite ile ilişkilendirilmiş GTPaz proteinlerini kodlayan çok sayıda genden oluşmaktadır. Bunlardan en iyi bilinenleri KRAS ve NRAS’tır (Fernández-Medarde ve Santos, 2011). KRAS mutasyonları nazal sinüslerin skuamoz hücreli karsinomlarında henüz tanımlanmamıştır. Ancak bu sinüslerin farklı tip malignitelerinde daha yoğun şekilde mutasyon varlığını göstren çalışmalar bulunmaktadır. Nazal sinüslere ait melanomlarda, adenokarsinomlarda, ve papilomlarda belirlenmiş durumdadır (Szablewski vd., 2013; Udager vd., 2016). NRAS mutasyonları nazal kavite ve sinüslerin melanomlarında değerlendirilmiştir (Zebary vd., 2013; Wroblewska vd., 2019). RAF proto-onkogenleri ise Ras GTPazlarının aşağı-akışında bulunan sinyal molekülleridir (Fernández-Medarde ve Santos, 2011). Kritik bir regülatör olan RAF1 geninin ekspresyon değişimleri ve mutasyonları farklı kanserlerle ilişkilendirilmiştir. Ancak nazal sinüs kanserlerinde henüz araştırılmamıştır. BRAF mutasyonları ise nazal sinüslerin farklı tip melanomlarında ve adenokarsinomlarında tanımlanmıştır (Zebary vd., 2013; Wroblewska vd., 2019). RET tirozin kinazı ise Ras sinyalleşmesinin yukarı-akış regülatörlerindendir (Fernández-Medarde ve Santos, 2011). Bu proto-onkogeninin alterasyonları farklı tip kanserlerde araştırılmış ve tanımlanmış olmakla birlikte nazal/ paranazal sinüs tümörlerinde mutasyon durumunu gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Benzer şekilde MET ve KIT proto-onkogenleri ve ALK reseptör tirozin kinazı da Ras sinyalleşmesinin yukarı-akış regülatörlerindendir (KEGG 1). MET geninin ekspresyon artışı nazal sinüs tümörlerinde belirlenmiştir (Progetti vd., 2015). Bu genin mutasyonları ise karsinosarkomlu bir olguda belirlenmiştir (Ando vd., 2015). KIT nazal sinüslerin melanomları, ALK ise nazal sinüslerin lenfomları ile ilişkilendirilmiştir (Toscano de Mendonça vd., 2018; Chen vd., 2015). Kanser ilişkili diğer temel sinyal yolları açısından bakıldığında; KIT ile benzer şekilde hem Ras sinyalizasyonunun yukarı-akış regülatörü olan hem de sitokin sinyalleşmesinde görev alan

PDGFRA geni dikkat çekmektedir (KEGG 2). Bu gene ait ekzon 12 bölgesinin mutasyonun tespit edildiği bir olgu raporu bulunmakla birlikte, paranazal sinüs tümörlerinde bu genin tümünün mutasyon durumunun araştırıldığı daha geniş örneklem grubunu içeren çalışma bulunmamaktadır (Terada, 2012). G protein ailesine üye GNA11 ve GNAQ genleri tarafından kodlanan proteinler, transmembran sinyalleşme yollarının temel bileşenlerindendir ve genel kanser yolları arasında Ras sinyalizasyonunun yukarı akışında yer almaktadırlar (KEGG 2). Bu iki genin mutasyonları baş boyun melanomlarında belirlenmiştir (Öztürk Sari vd., 2017; Lyu vd., 2016). Genel kanser yolları arasında yer alan Wnt sinyalleşmesinin temel efektör proteini olan B-katenin'i kodlayan CTNNB1 geninin pek çok malignitede rol oynadığı bilinmektedir (KEGG 2; Jung ve Park, 2020). Nazal sinüslerin glomangioperisitom ve teratokarsinosarkomlu olgularında bu genin mutasyonlarının gösterildiği nadir çalışmalar bulunmaktadır (Kono vd., 2019; Birkeland vd., 2017). Isocitrate dehidrogenazlar mitokondriyal elektron transportunda görev almaktadır. Sarkomlar, beyin kanserleri ve hematolojik malignitelerde IDH1 ve IDH2 mutasyonları tanımlanmıştır. IDH1/2 mutasyonları undiferansiye ya da kötü diferansiye nazal kavite karsinomlarında belirlenmiştir (Dogan vd., 2017; Mito vd., 2018). Bununla birlikte çalışmalar genellikle olgu sunumu ile sınırlandırılmıştır ve geniş bir örnekleme değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca mutasyonel açıdan değerlendirilen genlerin genellikle belli ekzonları ya da hotspot bölgelerinin araştırılmış olması da literatür verileri ile altı çizilen bu genlerin daha detaylı araştırılması gerekliliğine dikkat çekmektedir.

Son yıllarda kanser tedavisi yaklaşımları özellikle hedefe yönelik stratejilere odaklanmıştır. Kanser tedavilerinde konvansiyonel yaklaşımlar yerini hedefli tedavi yaklaşımlarına bırakmaktadır. Bu nedenle kanser tedavisinde etkili olan ve araştırılmaya devam edilen hedefe yönelik tedavi yaklaşımları paranazal sinüs tümörlü hastalar için de umut verici potansiyel taşımaktadır. Ancak diğer kanser tiplerinden farklı olarak tedavi hedeflerinin belirlenmesi konusunda yapılan çalışmalar oldukça sınırlı durumdadır ve hastaların % 50' nin altında olan sağ kalım oranlarının ve yaşam kalitelerinin artırılması; gereksiz tedavi maliyetinin ve iş yükünün azaltılabilmesi için paranazal sinüs tümörlerinde yenilikçi yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu açıktır.

Özet olarak projemizde nadir ve heterojen yapıya sahip bir kanser olan paranazal sinüs tümörlerinin literatürde eksik olan moleküler profilinin genomik düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır. Belirlenen mutasyon profili doğrultusunda bu hastalığın tanısında, izleminde ve hedefe yönelik tedavisinde henüz ortaya koyulmamış olan moleküler yapı kullanılarak

mevcut tanı ve izlemin iyileştirilmesi ve hedefe yönelik tedaviye giden yolda önemli bir adım atılması sağlanacaktır. Cerrahi müdahale dışında tedavi seçeneklerinin sınırlı olması dikkate alındığında, bu nadir kanser türünün temelinde bulunan moleküler yapının aydınlatılması ile bu hastalığa yönelik bir tedavi hedefi belirlenebilmesi hastaların gerek sağ kalım oranlarının yükseltilmesi gerekse operasyonun ardından meydana gelen fonksiyon kayıplarının önüne geçilebilmesi bakımından büyük önem taşımaktadır.

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Olguların belirlenmesi ve çalışma materyalinin temin edilmesi

Çalışma materyalleri, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda paranazal sinüs kanseri tanısı almış, tedavi protokolü çerçevesinde opere edilen 30 (13 Kadın/17 Erkek) olgunun doku örneklerinden oluşmaktadır.

Tablo 1. Çalışmaya alınma, dışlama ve çalışmadan çıkarılma kriterleri

<i>Çalışmaya alınma kriterleri</i>	<i>Dışlama kriterleri</i>
✓ Kanserın patolojik olarak kanıtlanmış olması	× Kanserın patolojik olarak kanıtlanamamış olması
✓ Tümör kitlesinin opere edilebilir olması	× Kitlenin opere edilemez durumda olması
✓ Olgunun çalışmaya dahil olmak için gönüllü olması	× Olgunun gönüllü olmaması ya da çekilmek istemesi
✓ Olgunun 18-85 yaş aralığında olması	× Olgunun 18-85 yaş aralığı dışında olması
✓ Olguda ek malignite olmaması	× Olguda ek malignite varlığı veya gelişmesi

Olguların çalışmaya dahil edilmeleri EÜTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 24.05.2018 tarihli 18-5.1/42 sayılı ve EÜTF Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'nun 29.04.2020 tarihli 20-4.2T/24 sayılı onayları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

3.2. Genomik profilin belirlenmesi

Genomik profilin belirlenmesi, sırasıyla doku örneklerinden DNA izolasyonu, DNA'nın kalite kontrol ve miktar ölçümü, fragmentasyon, barkodların ligasyonu, hedef zenginleştirme ve universal PCR ile kütüphanenin oluşturulması, kütüphanenin kalite kontrolü ve kantitasyonu, yeni nesil sekanslama işlemi ve biyoinformatik analizi içermektedir.



Şekil 1. Genomik profilin belirlenmesi iş akışı

Tablo 2. Varyant ve/ veya kopya sayısı değişimleri değerlendirilen genler
BRAF, EGFR (ERBB1), KIT, KRAS, NRAS, PDGFRA, AKT1, ALK, CTNNB1, ERBB3, ESR1 (ER α), FOXL2, GNA11, GNAQ, IDH1, IDH2, MET, RAF1, RET, ERBB2 (HER-2, NEU), PIK3CA, TP53

DNA örneklerinin hazırlanması

Doku örneklerinden DNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi

EÜTF Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda paranazal sinüs kanseri nedeniyle tedavi protokolü çerçevesinde opere edilen olgulara ait,EÜTF Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda patolojik değerlendirilmesiyapılan parafine gömülü doku örneklerinden DNA izolasyonu GeneRead DNA FFPE Kiti (Qiagen, Katalog No:180134) ve QIAcube izolasyon cihazı (Qiagen, Katalog No: 9001292)kullanılarak yarı otomatize şekilde gerçekleştirilmiştir.

İşlem basamakları:

- Başlamadan önce bütün tamponlar oda sıcaklığına getirilerek hafifçe çalkalanmış, içlerinde çökelti, hava kabarcığı, vb. bulunmadığından emin olunmuştur.
- İlerleyen basamaklarda kullanılacak olan ısıtıcı bloklar (EuroClone, Katalog No: EMK20) uygun sıcaklık ve döngü değerlerine ayarlanmıştır.

- Parafine gömülü doku örneklerinden 10µm kalınlığında üçadet kesit alınmıştır.
- Kesitlerde bulunan doku içermeyen bölümlerdeki fazla parafin yapısı steril bisturi kullanılarak uzaklaştırılmıştır.
- Kesitler 2 ml steril mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 160 µl Deparafinizasyon Solüsyonu eklenmiş, 10 s vortekslenmiş ve kısaca santrifüjlenmiştir.
- Isıtıcı blokta (EuroClone, Katalog No: EMK20) 56°C’de 3 dk inkübe edilerek oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.
- Oda sıcaklığına geldiğinde yoğun katılaşma meydana gelen örnekler yoğunluk durumuna bağlı olarak en çok 160 µl Deparafinizasyon Solüsyonu eklenerek inkübasyon basamağı tekrarlanmıştır.
- Her örneğe 55 µl RNaz içermeyen H₂O, 25 µl FTB Tamponu ve 20 µl proteinaz K eklenerek vortekslenmiş ve kısaca santrifüjlenmiştir.
- Örnekler ısıtıcı blokta (EuroClone, Katalog No: EMK20) 56°C’de 1 sa ve 90°C’de 1 sa inkübe edilmiştir.
- Inkübasyon bitiminde örnekler kısaca santrifüjlenerek tüpün en alt kısmında oluşan şeffaf faz, yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
- Örnekler 115 µlRNaz içermeyen H₂O, 35 µl UNG eklenerek vortekslenmiş ve kısaca santrifüjlenmiştir.
- Örnekler ısıtıcı blokta (EuroClone, Katalog No: EMK20) 50°C’de 1 sa inkübe edilmiştir.

İzolasyon işleminin takip eden basamakları QIAcube (Qiagen, Katalog No: 9001292) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için gerçekleştirilen cihaz hazırlık aşamaları şu şekildedir:

- Örnekleri içeren mikrosantrifüj tüpleri cihazın çalkalayıcı bölümüne sırasıyla yüklenmiştir.

- Her örnek için rotor adaptörün uygun pozisyonlarına birer adet 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü, birer adet filtreli kolon (Qiamp MiniElute column) yerleştirilerek cihazın santrifüj bölümüne yerleştirilmiştir.
- On iki örnek için 34 µl RNaz ve 136 µl H₂O içeren karışım hazırlanarak 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü içerisinde cihazın uygun bölümüne yüklenmiştir.
- İzolasyon sırasında kullanılacak olan tamponları (Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, Absolü etanol, Buffer ATE) içeren şişeler cihazın uygun bölümüne yerleştirilmiştir.
- Cihaz ile uyumlu özellikte olan birer kutu 200 µl ve 1000 µl pipet uçları (Qiacube Filter Tips; Qiagen, Katalog No:990352) cihazın uygun bölümüne yerleştirilmiştir.
- Cihaz çalıştırılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

DNA örneklerinin miktar ölçümü ve saflık değerlerinin belirlenmesi

İzole edilen DNA örneklerinin miktar ölçümleri Qubit 4 Fluorometer (Life Technologies, Katalog No: Q33238) cihazı ve Qubit dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Katalog No: Q32851) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İşlem basamakları:

- Başlamadan önce bütün tamponlar oda sıcaklığına getirilerek hafifçe çalkalanmış, içlerinde çözünmemiş bölüm, hava kabarcığı, vb. bulunmadığından emin olunmuştur.
- Her örnek için son hacim 198 µl, her standart için son hacim 190 µl olacak şekilde 1:200 oranında Qubit dsDNA HS Reaktif: Qubit dsDNA HS Tamponu karışımı hazırlanmıştır.
- Karışım vortekslenmiş ve kısaca santrifüjlenmiştir.
- Qubit cihazına ait tüplere (Life Technologies, Katalog No: Q32856) uygun hacimde karışım pipetlenmiştir.
- Karışım içeren örnek tüplerine iki, standart tüplerine ise 10 µl örnek veya standart pipetlenmiştir.

- Karışım vortekslenmiş, kısaca santrifüjlenmiş, oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyonun ardından cihazdan standartlar seçilerek sırasıyla okutulmuş ve standart eğri çizilmiştir.
- Standartların ardından sırasıyla her örnek tüpü cihaza yerleştirilerek okutulmuştur.
- Örneklerin kullanılabilir olması için minimum konsantrasyon değeri 6,5 ng/μl olmalıdır.

Örneklerin saflık değerleri NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) cihazı ve yazılımı ile ölçülmüştür:

- Ölçüm gerçekleştirilmeden önce, izolasyonda kullanılan elüsyon tamponu (Buffer ATE) ile kör alma işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Bu işlemin ardından 2 μl DNA örneği cihazın üzerindeki ölçüm haznesine pipetlenmiştir.
- Cihazın bağlı olduğu bilgisayarda bulunan NanoDrop yazılımı kullanılarak örneklerin 230, 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri elde edilmiştir.
- Örneklerin kullanılabilir olması için A260/280 değerinin yaklaşık 1,8; A260/230 değerinin ise 1,8–2,2 aralığında olması gerekmektedir.

Kütüphane hazırlanması

Saflık ve miktar açısından uygun DNA örnekleri; moleküler barkodlama teknolojisi ile yeni nesil sekanslamaya uygun kitler kullanılarak (Human Actionable Solid Tumor Panel, Qiagen DHS101Z, Katalog No: 333502) fragmentasyon, hedef zenginleştirme, universal PCR, klonal amplifikasyon ve ardından MiniSeq Mid Output Kit (Illumina, FC-420-1004) ile sekans işlemlerine tabi tutularak Illumina MiniSeq (Illumina) cihazı aracılığıyla yeni nesil sekanslama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Fragmentasyon, uç tamiri ve adenin kuyruğu eklenmesi

Bu basamakta DNA örnekleritek bir enzimatik reaksiyon aracılığıyla sırasıyla yaklaşık 350 baz çiftlik fragmentler halinde kesilmiş, oluşan uçlarda baz eşleşmesi yapmamış bölgenin kalmaması amacıyla uç tamiri işlemi uygulanmış ve uçlar küt hale getirilmiş, ardından sonraki

basamaktaki adaptör ve barkodların eklenmesini sağlayacak adenin bazlarından oluşan kuyruğun ligasyonu gerçekleştirilmiştir.

İşlem basamakları:

- Tüm örnekler 150 ng DNA içerecek şekilde nükleaz içermeyen H₂O kullanılarak 16,75 µl final hacmine getirilmiştir.
- Ardından soğuk blok üzerinde, her DNA örneğine 2,5 µl 10×Fragmentasyon Tamponu, 0,75 µl FERA Solüsyonu ve 5 µl Fragmentasyon Enzim Karışımı eklenerek pipetlenmiş, kısaca santrifüjlenmiştir.
- Örnekler, 4°C'ye getirilerek bekleme durumuna alınmış konvansiyonel PCR cihazına (SensoQuest GmbH, Katalog No: 012-103) yerleştirilmiş; "4°C 1 dk, 32°C 14 dk, 72°C 4 dk, 4°C ∞"programı çalıştırılarak fragmentasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Adaptör ligasyonu ve ürünlerin temizlenmesi

Bu aşamada UMI (12 bazın rastgele diziminden oluşan eşsiz etiketlerdir, sekans işleminin güvenilirliğinin denetlenmesi açısından önem taşımaktadır) içeren adaptörler (her örneğin tanımlanmasını sağlayan işaretçi baz dizileri) ile her örneğin eşsiz şekilde işaretlenmesi gerçekleştirilmiştir. Ardından oluşan ürün, manyetik tabanlı yaklaşım ve etanol ile yıkanmıştır.

İşlem basamakları:

- Örnek içeren mikrosantrifüj tüpleri, soğuk blok üzerine alınarak, 10 µl 5× LigasyonTamponu, 2,8 µl IL-N7adaptör, 5 µl DNA Ligaz, 7,2 µl LigasyonSolüsyonu eklenerek son hacim 50 µl'ye getirilmiştir.
- Her örnek pipetlenerek karıştırılmış ve kısaca santrifüjlenmiştir.
- Örnekler, konvansiyonel PCR cihazında (SensoQuest GmbH, Katalog No: 012-103) 20°C'de 15 dk inkübe edilerek adaptör ligasyonu gerçekleştirilmiştir.
- Adaptör bağlanan DNA'nın temizlenmesi için örnekler 1,5 ml LoBind tüplere (Eppendorf, Katalog no: 022431021) aktarılmış, nükleaz içermeyen H₂O eklenerek son hacim 100 µl'ye tamamlanmıştır.

- QIAseq manyetik boncukları oda sıcaklığına getirilerek en az 1 dk vortekslenmiş, kapakta damlacık kalmaması için kısaca santrifüjlenmiştir.
- Her örneğe 100 µl boncuk eklenerek kısaca vorteks ve döndürme işlemi uygulanarak 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Ardından tüpler manyetik raf (DynaMag; Invitrogen, Katalog No:12321D) üzerine alınarak, solüsyon tamamen berraklaşana kadar en az 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Tamamen şeffaflaşan süparnatant kısım, DNA'yı bağlamış olan boncuklara temas etmeyecek şekilde dikkatlice uzaklaştırılmıştır.
- Manyetik raf üzerinde bulunan boncuklara 200 µl %80'lik etanol (Merck, Katalog No: 1085430250) eklenmiş, tüpler kendi etrafında dört kez döndürülmüş, ardından boncuklara temas edilmeden alkol uzaklaştırılmıştır.
- Son basamak tekrarlanmış, alkolün tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- Boncukların kuruması için yaklaşık 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Manyetik raf üzerindeki kurumuş boncuklara 52 µl nükleaz içermeyen H₂O eklenmiş, raftan uzaklaştırılarak iyice pipetlenmiş ve boncukların homojen bir solüsyon oluşturması sağlanmıştır.
- Solüsyon içeren tüpler yeniden manyetik raf üzerine yerleştirilerek solüsyon berraklaşana kadar oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- DNA'yı içeren temiz faz yeni bir 1,5 ml LoBind tüpe (Eppendorf, Katalog no: 022431021) aktarılmış ve üzerine 65 µl boncuk eklenerek kısaca vorteks ve santrifüj işlemi uygulanarak 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Ardından tüpler manyetik raf üzerine alınarak, 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Tamamen şeffaflaşan süparnatant kısım, DNA'yı bağlamış olan boncuklara temas etmeyecek şekilde dikkatlice uzaklaştırılmıştır.

- Manyetik raf üzerinde bulunan boncuklara 200 µl %80'lik etanol (Merck, Katalog No: 1085430250) eklenmiş, tüpler kendi etrafında dört kez döndürülmüş, ardından boncuklara temas edilmeden alkol uzaklaştırılmıştır.
- Son basamak tekrarlanmış, alkolün tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- Boncukların kuruması için yaklaşık 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Manyetik raf üzerindeki kurumuş boncuklara 12 µl nükleaz içermeyen H₂O eklenmiş, raftan uzaklaştırılarak iyice pipetlenmiş ve boncukların homojen bir solüsyon oluşturması sağlanmıştır.
- Solüsyon içeren tüpler yeniden manyetik raf üzerine yerleştirilerek solüsyon berraklaşana kadar oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- DNA'yı içeren temiz fazdan 9,4 µl yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktararak temizlenmiş DNA elde edilmiştir.

Hedef zenginleştirme basamağı ve ürünlerin temizlenmesi

Barkod ve adaptör ligasyonu gerçekleştirilen örneklerde, hedeflenen DNA bölgelerinin zenginleştirilmesi amacıyla hedef zenginleştirme basamağına geçilmiştir. Bu aşamada hedefli DNA paneli (Targeted DNA Panel; Qiagen, Katalog No:DHS-101Z) primerleri aracılığıyla istenilen bölgelerin zenginleştirilmesi sağlanmıştır.

İşlem basamakları:

- Bir önceki basamakta elde edilen 9,4 µl örneğin üzerine 4 µl 5× TEPCR Tamponu, 5 µl hedefli primerleri içeren solüsyon (QIAseq Targeted DNA Panel), 0,8 µl ileri primer (IL-Forward Primer) ve 0,8 µl HotStarTaq DNA Polimeraz eklenerek pipetlenmiş ve kısaca santrifüjlenmiştir.
- Reaksiyon karışımı içeren tüpler konvansiyonel PCR cihazına (SensoQuest GmbH, Katalog No: 012-103) yerleştirilmiş; “13 dk 95°C, 2 dk 98°C denatürasyon basamağı, 98°C 15s, 68°C 10 dk (8 döngü) amplifikasyon basamağı, 72°C 5 dk ve 4°C 5 dk” basamakları ile hedef zenginleştirme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

- Hedef zenginleştirmesi yapılan örneklerin temizlenmesi için örnekler 1,5 ml LoBind tüplere (Eppendorf, Katalog no: 022431021) aktarılmış, nükleaz içermeyen H₂O eklenerek son hacim 100 µl'ye tamamlanmıştır.
- Manyetik boncuklar oda sıcaklığına getirilerek en az 1 dk vortekslenmiş, kapakta damlacık kalmaması için kısaca santrifüjlenmiştir.
- Her örneğe 100 µl boncuk eklenerek kısaca vorteks ve santrifüj işlemi uygulanarak 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Ardından tüpler manyetik raf üzerine alınarak, solüsyon tamamen berraklaşana kadar 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Tamamen şeffaflaşan süparnatant kısım, DNA'yı bağlamış olan boncuklara temas etmeyecek şekilde dikkatlice uzaklaştırılmıştır.
- Manyetik raf üzerinde bulunan boncuklara 200 µl %80'lik etanol (Merck, Katalog No: 1085430250) eklenmiş, tüpler kendi etrafında dört kez döndürölmüş, ardından boncuklara temas edilmeden alkol uzaklaştırılmıştır.
- Son basamak tekrarlanmış, alkolün tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- Boncukların kuruması için yaklaşık 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Manyetik raf üzerindeki kurumuş boncuklara 16 µl nükleaz içermeyen H₂O eklenmiş, raftan uzaklaştırılarak iyice pipetlenmiş ve boncukların homojen bir solüsyon oluşturması sağlanmıştır.
- Solüsyon içeren tüpler yeniden manyetik raf üzerine yerleştirilerek solüsyon berraklaşana kadar oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- DNA'yı içeren temiz fazdan 13,4 µl yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak temizlenmiş DNA elde edilmiştir.

Üniversal PCR basamağı ve ürünlerin temizlenmesi

Zenginleştirilen örneklerin çoğaltılması ve kütüphanenin hazır hale getirilmesi için üniversal PCR işlemi uygulanmış, bu aşamada hem ikinci bir moleküler indeksin bağlanması hem de

çoğaltma işleminin gerçekleştirilmesi sağlanmış, son ürünlerin manyetik tabanlı yöntem ile yıkanmasının ardından kütüphane örnekleri elde edilmiştir. Kütüphane örneklerinin kalite kontrol basamaklarından geçirilmesi ve kantitasyonu ile sekans aşaması için örnekler hazır hale getirilmiştir.

İşlem basamakları:

- Bir önceki basamakta elde edilen 13,4 µl örnek, liyofilize IL-S5 adaptör içeren plak kuyucuğuna pipetlenmiş, üzerine 4 µl 5× UPCR Tamponu, 1,6 µl nükleaz içermeyen H₂O ve 1 µl HotStarTaq DNA Polimeraz eklenerek karıştırılmış, karışım 0,2 ml mikrosantifüj tüplerine aktararak kısaca santrifüjlenmiştir.
- Reaksiyon karışımı içeren tüpler konvansiyonel PCR cihazına (SensoQuest GmbH, Katalog No: 012-103) yerleştirilmiş; 13 dk 95°C, 2 dk 98°C denatürasyon basamağı, 98°C 15s, 68°C 2 dk (25 döngü) amplifikasyon basamağı, 72°C 5 dk ve 4°C 5 dk basamakları ile universal PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.
- Universal PCR reaksiyonunun ardından örneklerin temizlenmesi için örnekler 1,5 ml LoBind tüplere (Eppendorf, Katalog no: 022431021) aktarılmış, nükleaz içermeyen H₂O eklenerek son hacim 100 µl'ye tamamlanmıştır.
- Manyetik boncuklar oda sıcaklığına getirilerek en az 1 dk vortekslenmiş, kapakta damlacık kalmaması için kısaca santrifüjlenmiştir.
- Her örneğe 100 µl boncuk eklenerek kısaca vorteks ve santrifüj işlemi uygulanarak 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Ardından tüpler manyetik raf üzerine alınarak, solüsyon tamamen berraklaşana kadar 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Tamamen şeffaflaşan süpernatant kısım, DNA'yı bağlamış olan boncuklara temas etmeyecek şekilde dikkatlice uzaklaştırılmıştır.
- Manyetik raf üzerinde bulunan boncuklara 200 µl %80'lik etanol (Merck, Katalog No: 1085430250) eklenmiş, tüpler kendi etrafında dört kez döndürülmüş, ardından boncuklara temas edilmeden alkol uzaklaştırılmıştır.

- Son basamak tekrarlanmış, alkolün tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- Boncukların gözle görülür şekilde kuruması için yaklaşık 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Manyetik raf üzerindeki kurumuş boncuklara 30 µl nükleaz içermeyen H₂O eklenmiş, raftan uzaklaştırılarak iyice pipetlenmiş ve boncukların homojen bir solüsyon oluşturması sağlanmıştır.
- Solüsyon içeren tüpler yeniden manyetik raf üzerine yerleştirilerek solüsyon berraklaşana kadar oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- DNA'yı içeren temiz fazdan 28 µl yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktararak temizlenmiş kütüphaneelde edilmiştir.

Kütüphanenin kalite kontrolünün gerçekleştirilmesi

Kütüphanelerin kalite kontrolü iki ayrı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

QIAxcel ile kontrol

Elde edilen kütüphanelerin fragment uzunluklarının ve konsantrasyonlarının belirlenebilmesi için otomatize kapiller jel elektroforez sistemini içeren QIAxcel Advanced System (Qiagen, Katalog No: 9002123), QIAxcel ScreenGel Software (Qiagen, Katalog No: 9001941) ve QIAxcel DNA High Resolution Kit (Qiagen, Katalog No: 929002) kullanılmıştır. Kütüphanelerin yeni nesil sekanslama işleminde kullanılabilmesi için dağılımın 300–1000 baz çifti (bp) bölgesinde ve pikin tepe noktasının yaklaşık 350 bp bölgesinde olması gerekmektedir.

İşlem basamakları:

- Kit içeriğinde bulunan jeli içeren kartuş (QIAxcel DNA High Resolution Gel Cartridge) ve Dilüsyon Tamponu oda sıcaklığına getirilmiştir.
- Kartuş, bulunduğu jel haznedan çıkarılarak kapiller bölümünde bulunan fazla jel bir peçete yardımı ile uzaklaştırılmış, kartuşun üzerinde bulunan N₂ enjeksiyonunun

yapılacağı bölümde bulunan etiket çıkartılmış ve kartuş, cihazın uygun bölmesine dikkatlice yerleştirilerek kartuşa bağlı olan çip uygun sokete takılmıştır.

- Cihaza bağlı bilgisayardaki yazılım (QIAxcel ScreenGel Software; Qiagen, Katalog No: 9001941) üzerinden yükleme pozisyonu seçilerek örneklerin ve işaretçilerin yükleneceği alanın ulaşılabilir hale gelmesi sağlanmıştır.
- Hizalama işaretçisi (QX Alignment Marker; 15 bp– 3kb; Qiagen, Katalog No: 929522) 12’li şerit tüplerin her kuyucuğuna 15 µl eklenerek, cihazın yükleme tablası üzerinde gösterilen ilgili alana yerleştirilmiştir.
- DNA boyut işaretçisi (QX DNA Size Marker; 50–800 bp; 100 ng/µl; Qiagen, Katalog No: 929561) Dilüsyon Tamponu ile 20 ng/µl konsantrasyona getirilmiş, 10 µl hacminde 0,2 ml’lik şerit tüplere eklenmiştir.
- Beşer µl örnek 0,2 ml’lik şerit tüplere Dilüsyon Tamponu ile 1/2 oranında dilüe edilerek eklenmiştir.
- Cihaza bağlı bilgisayardaki yazılım (QIAxcel ScreenGel Software; Qiagen, Katalog No: 9001941) üzerinden süreç profili bölümü yüksek çözünürlüklü DNA olarak seçilmiş, çalışma parametreleri bölümünde örneklerin ve işaretçinin bulunacağı pozisyonlar işaretlenmiş, beklenen fragment büyüklüğü yaklaşık 350 bp ve giriş DNA konsantrasyonu 10–100 ng/µl aralığında olduğundan yöntem için en uygun olan 0M500 yöntemi işaretlenmiş böylece örnek enjeksiyon voltajı 5kV, örnek enjeksiyon süresi 10 s, ayırma voltajı 5 kV, ayırma süresi ise 500 s olarak belirlenmiştir. İşaretçi bölümünde kullanılacak iki işaretçi de uygun şekilde seçilmiş, konsantrasyon değerleri yazılmıştır. Örnek bilgisi bölümünde örneklerin yükleme pozisyonlarına göre isimleri sisteme eklenmiştir.
- Çalışma kontrolü aşamasının ardından çalışma başlatılmıştır.
- Çalışma bitiminde analiz sekmesi ile jel görüntülenmesi sağlanmış, fragment büyüklükleri ve miktar ölçüm değerleri elde edilmiştir.

QIAseq Library Quant System ile kantitasyon

Elde edilen kütüphanelerin hem kalite kontrolünün gerçekleştirilmesi hem de kantitasyonu amacıyla gerçekleştirilmiştir.

İşlem basamakları:

- Başlamadan önce bütün tamponların buz üzerinde çözünmesi sağlanmış, kısaca vortekslenmiş ve santrifüjlenmiştir.
- DNA standardından (illumina DNA Standard),Dilüsyon Tamponu kullanılarak, seri dilüsyonla 1:10 oranında 5 adet DNA standardı hazırlanmıştır. Bunun için 45 µl Dilüsyon Tamponuna 5 µl standart (illumina DNA Standard ya da bir önceki basamaktaki standart) eklenerek iyice pipetlenmiş ve kısaca santrifüjlenmiştir.
- Kütüphanelerden Dilüsyon Tamponu kullanılarak sırasıyla 1:50, 1:5000 ve 1:50000 oranında üç set dilüsyon hazırlanmıştır. Bunun için 1 µl kütüphaneye 49 µl Dilüsyon Tamponu eklenmiş iyice pipetlenmiş ve kısaca santrifüjlenmiştir. Elde edilen 1:50 dilüsyonasaahip kütüphaneden 2 µl alınarak 198 µl Dilüsyon Tamponu eklenmiş iyice pipetlenmiş ve kısaca santrifüjlenmiştir. Elde edilen 1:5000 dilüsyona sahip kütüphaneden 4 µl alınarak 36 µl Dilüsyon Tamponu eklenmiş iyice pipetlenmiş ve kısaca santrifüjlenerek tüm dilüsyon setleri hazırlanmıştır.
- Standartlar üçer tekrarlı olacak şekilde, örnekler ise 1:5000 ve 1:50000 dilüsyonlarını içeren toplamda iki tekrarlı olacak şekilde örnek sayısı hesaplanmış, DNA içermeyen kontrol (NTC) örneği de eklenerek son örnek sayısı belirlenmiştir.
- Her bir örnek için 6,7 µl nükleaz içermeyen H₂O, 10 µl enzim- floresan boya karışımı (SYBR Green Master Mix), 0,8 µl 10 µM Primer içeren karışım hazırlanmış, kısaca vortekslenip santrifüjlenmiştir.
- Hazırlanan karışımdan 17,5 µl ve 2,5 µl örnek (kütüphane ve standartların belirtilen dilüsyonları ve NTC) Rotor Gene cihazının tüplerine(Strip Tubes; Qiagen, Katalog No: 981103) pipetlenerek Rotor Gene (Qiagen, Katalog No: 9001580) cihazına yüklenmiştir.
- Reaksiyon 95°C'de 10 dk enzim aktivasyonu basamağı, 95°C'de 15 s, 68°C'de 5 s, 65°C'de 5 s, 60°C'de 60 s (30 döngü) amplifikasyon basamağı içerecek şekilde gerçekleştirilmiştir.
- Veri toplanması 60°C'de yeşil kanal (FAM) ile gerçekleştirilmiştir.

- Reaksiyon bitiminde eşik değeri 0,2 olarak ayarlanmıştır.
- Eşik döngüsü (C_T) değerleri cihazdan alınarak <https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/QIAseq-library-quant-system/#resources> adresinden ulaşılabilecek “GeneRead Library Quant Kit or Array Data Analysis Template, 96-well for Illumina” Excel tabanlı sistem üzerine aktarılarak uygun konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır.

Yeni nesil sekanslama işlemi

Kalite kontrolden geçen ve konsantrasyon ölçümleri gerçekleştirilen kütüphanelerin MiniSeq System (Illumina) cihazı ile sekanslanma işlemi gerçekleştirilmiştir.

İşlem basamakları:

- Başlamadan önce MiniSeq Mid Output Kit (Illumina, Katalog No: FC-420-1004) içinde bulunan kartuş ve indeks kiti (Nextera XT Index Kit v2; Illumina, Katalog No: FC-131-2001) içindeki HT1 Hibridizasyon Tamponu yavaşça çözdürülmüştür.
- Kartuşun iki kuyucuğuna yükleme yapılmaktadır. Bunlardan biri 1,5 pM konsantrasyonundaki havuz diğeri ise 0,3 μ M konsantrasyonundaki primerdir. Bu iki karışımın hazırlanması ilerleyen basamaklarda detaylandırılmıştır.
- Havuz hazırlamak için, tüm kütüphanelerin konsantrasyonu nükleaz içermeyen H_2O ile önce 50 nM’a, ardından 10 nM’a getirilmiştir.
- Konsantrasyonları eşitlenerek 10 nM’a getirilen kütüphaneler, megahavuz oluşturmak üzere iyice pipetlenerek eşit hacimde(5’er μ l) alınarak bir tüpe toplanmıştır.
- On nM’lık megahavuzdan 10 μ l alınarak 90 μ l nükleaz içermeyen H_2O ’ya eklenmiş, böylece 100 μ l’de 1 nM’lık megahavuz elde edilmiştir.
- Megahavuzdan 5 μ l alınarak üzerine 5 μ l 0,1N NaOH (Merck, Katalog No: 43617-1L) eklenmiş, kısaca vorteks ve santrifüj yapılarak oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun hemen ardından megahavuz ve NaOH içeren tüpe 5 μ l TrisHCl (Merck, Katalog No: 10812846001) eklenmiştir.

- Ayrı bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 985 µl HT1 Hibridizasyon Tamponu eklenmiş, üzerine son hacmi 15 µl olan megahavuz eklenerek 1 ml hacimde 5 pM'lık megahavuz oluşumu sağlanmıştır.
- Ayrı bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 350 µl HT1 Hibridizasyon Tamponu eklenmiş, 5 pM'lık megahavuzdan 150 µl eklenerek 500 µl hacimde 1,5 pM'lık havuz oluşumu sağlanmıştır. Havuz karışımının tamamı kartuşun 16. pozisyonuna yüklenmiştir.
- Kartuşa yüklenecek diğer bileşen olan primerin hazırlanması için, 1,5 ml'lik tüpün içine 997 µl HT1 Hibridizasyon Tamponu eklenmiş üzerine 3 µl 100 µM konsantrasyonundaki primer (QIAseq A Read1 Primer I) eklenerek iyice pipetlenmiş, tamamı kartuşun 15. pozisyonuna yüklenmiştir.
- MiniSeq System (Illumina) cihazı açılarak çalışma başlatmak için öncelikle ana sayfadaki sekans seçeneğine tıklanmıştır. Giriş yapılmış, ardından çalışma seçilerek örneklerin numaraları, barkodları ve çalışmanın özellikleri girilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmanın özellikleri doğrultusunda okuma bölümleri 151, indeks bölümleri ise 8 olarak girilmiştir. Sonraki basamakta yükleme aşamasına gelindiğinde cihazın üst bölümünde bulunan akış hücresi (tüm reaksiyonun üzerinde gerçekleşeceği nanohaznelerden oluşan cam düzenek) kapağı açılarak herhangi bir kirlilik ve hava kabarcığı bulunmayan akış hücresi buraya yerleştirilerek kapak kapatılmıştır. Ardından cihazın ön bölümündeki kapak açılarak kartuşun yüklenmesi sağlanmış ve kapak kapatılmıştır. Çalışma kurulumu basamağında seçilen parametrelerin kontrolü bizim tarafımızdan; Kontrol basamağında ise sistemin kendi kontrolü cihaz tarafından gerçekleştirilerek son kontroller yapılmış ve herhangi bir sorun bulunmamasının ardından sekans basamağına gelinerek sekanslama işlemi başlatılmıştır.
- Çalışmanın tamamlanmasının ardından, analiz basamağında kullanılacak sonuçların alınması için cihaz üzerinde bulunan Yerel Çalışma Yöneticisi bölümüne giriş yapılmıştır. Örnekler ve sonuçlar seçeneğinden, çalışmaya ait “.fastq”(nükleotit dizilimleri) dosyaları dışa aktararak alınmıştır.

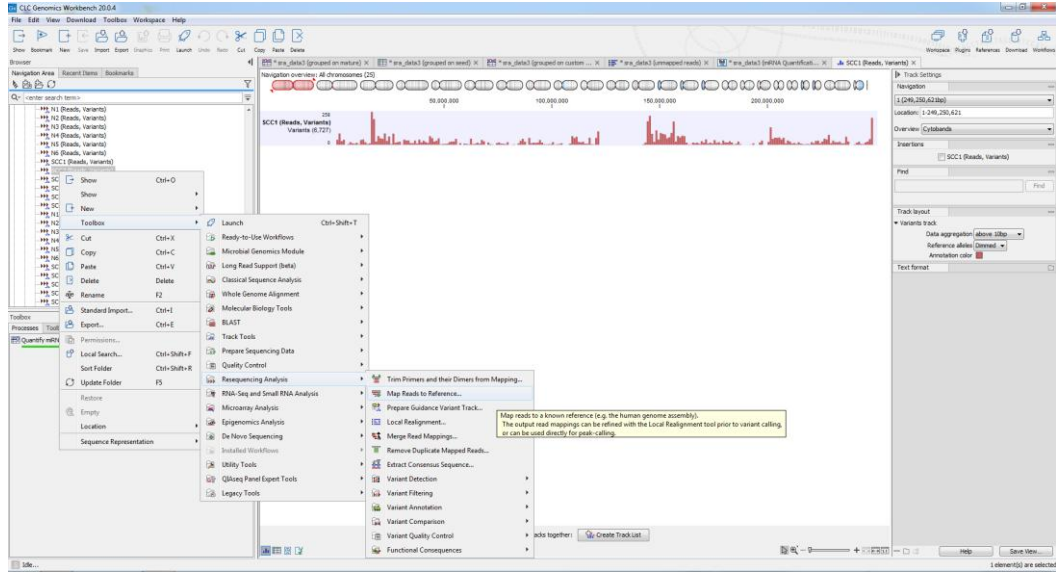
Sonuçların biyoinformatik analizi

Verilerin varyantlara dönüştürülmesi sürecinde öncelikle sekans cihazından alınan veriler CLC Genomics Workbench 20 (Qiagen Bioinformatics) sistemine aktarılmış, daha sonra

uygun sekans analizleri ve filtrelemeler uygulanarak analiz gerçekleştirilmiştir. Bu yazılımın yanı sıra verilerin kopya sayısı değişimlerinin (CNV) belirlenebilmesi için QCI analyze (Qiagen) sistemi, klinik anlamı bilinen varyantların yorumlanabilmesi için QCI interpret (Qiagen) sistemi ve daha önce tanımlanmamış, yeni varyantların tanımlanabilmesi amacıyla VarSome veritabanından yararlanılmıştır.

Okumaların kırılması, hizalanması, varyantlara dönüştürülmesi

- CLC Genomics Workbench 20 (Qiagen Bioinformatics) yazılımına “.fastq” dosyaları içe aktarılmıştır (Import/Illumina/Illumina High Throughput Sequencing Import).
- Aynı örneğe ait ileri ve geri primerler tarafından gerçekleştirilen iki okuma dosyası (R1.fastq ve R2.fastq) eşleştirilmiştir.
- Eşleştirilen okumaları içeren dosya, CNV analizinde (QCI Analyze basamağı) kullanılmak için “.fastq” formatında dışa aktarılmıştır.
- Eşleştirilen okuma dosyaları, barkodları, adaptörleri, indeksleri, primerleri ve spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak amacıyla kırılmıştır (Launch/ Trim Reads). Kırpma işleminde kalite puanı 0,05 belirsiz nükleotit sınırı iki olarak belirlenmiştir.
- Kırılmanın ardından elde edilen sekans dizilimleri referans genomu hizalanmıştır (Toolbox/Resequencing Analysis/ Map Reads to Reference). Referans genom versiyon “Homo sapiens (hg19) sequence” olarak seçilmiştir.
- Sekans dizilimi varyantlara dönüştürülmüştür (“Toolbox/ Resequencing Analysis/ Variant Detection/ Low Frequency Variant Detection”). Elde edilen varyantlar klinik anlamı bilinen ve daha önce tanımlanmamış olan varyantlar açısından bu basamaktan itibaren iki ayrı grup olarak değerlendirilmiştir.

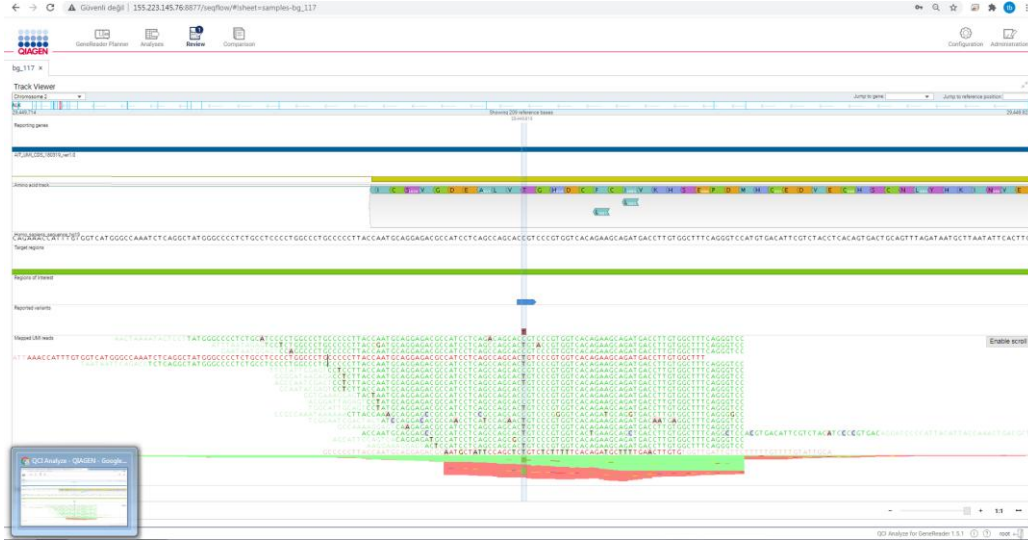


Şekil 2. CLC Genomics Workbench 20 sistemi ana ekran görüntüsü

Klinik anlamı bilinen varyantların elde edilmesi ve analizi

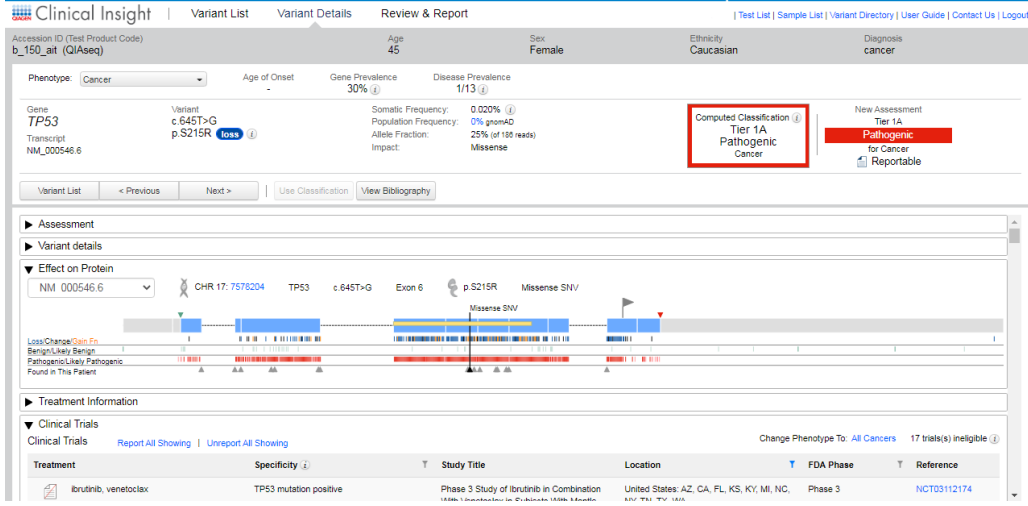
- Belirlenen varyantlar sadece klinik anlamı bilinen varyantları içerecek şekilde filtrelenmiştir (Toolbox/ Resequencing Analysis/ Variant Detection/ Identify Known Mutations from Mappings/ Keep variants with exact match in the track of known variants/ Homo sapiens (hg19) clinical variants in dbSNP; hg19-2020-01-20-12-01 versiyonu).
- Marjinal varyantlar uzaklaştırılmıştır (Toolbox/ Resequencing Analysis/ Variant Filtering/ Remove Marginal Variants).
- Çalışma ekranının alt bölümündeki tablo görünümü ile okuma sayısı 10'un, genel kalite puanı 50'nin üzerinde olanlar seçilerek “.vcf” (variant call format) formatında dışa aktarılmıştır.
- Örneklerde meydana gelen, amplifikasyon ve delesyondan oluşan CNV'leri belirlemek amacıyla CLC Genomics Workbench 20 (Qiagen Bioinformatics) yazılımından elde edilen eşleştirilmiş okumalara ait “.fastq” uzantılı dosyalar QCI Analyze (Qiagen, Katalog No: 188001) sistemine aktarılmıştır (QCI Analyze/ Analyses/ Start Analysis) .
- İş akışı bölümünden, çalışılan panel (Human Actionable Solid Tumor Panel, Qiagen DHS101Z, Katalog No: 333502) ve örnek tipi seçilerek analiz başlatılmıştır.

- CNV sekmesine girilerek amplifikasyon ve delesyon meydana gelen örnekve bu CNV'lere ait kat değişimlibelirlenerek QCI Interpret sistemine yüklenmek üzere dışa aktarılmıştır.



Şekil 3. QCI Analyze sistemi sonuç ekranı görüntüsü

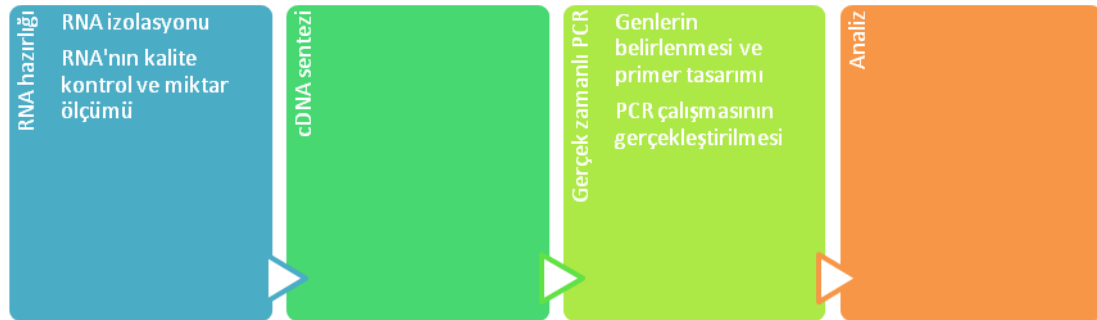
- Örneklerde meydana gelen mutasyonların klinik olarak değerlendirilmesi için QCI Interpret sistemi kullanılmıştır. Bu sistemle varyantlar; ACMG/AMP 2015 kılavuzu, AMP/ASCO/CAP2017 kılavuzuna göre; patojenite özelliklerine (patojenik, olası patojenik, kesin olmayan varyant, olası benign ve benign) ve uygulanabilirlik sınıflandırmasına (Tier1–4) göre gruplandırılmıştır (M. M. Li vd., 2017; Richards vd., 2015).
- CLC Genomics Workbench 20 (Qiagen Bioinformatics) yazılımından elde edilen “.vcf” uzantılı dosyalar Qiagen Clinical Insight (QCI) Interpret sistemine yüklenmiştir (Upload Sample/ Submit).
- Örnek bilgileri (yaş, cinsiyet, kanser tipi, bölge) sisteme girilmiştir.
- Sistemin belirlediği tüm varyantlar dışa aktarılmıştır.



Şekil 4. QCI interpret sisteminin değerlendirme sonucu (b150 kodlu olgu, TP53 geni, patojenik bir varyant için örnek görünüm)

3.3. Hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi

Hücre yüzey proteinleri hücre tipleri ve kanserlere göre farklılık gösterdiğinden hedefe yönelik tedaviler için önem taşımaktadır. Çalışma kapsamında paranazal sinüs tümör hücrelerinin yüzey proteilerini kodlayan genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için sırasıyla tümör ve normal doku örneklerinden RNA izolasyonu, RNA'nın kalite kontrol ve miktar ölçümü, cDNA sençalışmainin gerçekleştirilmesi, gerçek zamanlı PCR çalışmasının gerçekleştirilmesi ve verilerin analzi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5. Hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi iş akışı

RNA örneklerinin hazırlanması

RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda paranazal sinüs tümörü tanısı nedeniyle tedavi protokolü çerçevesinde opere edilen olgulara ait taze doku örneklerinden RNA izolasyonu RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Katalog No:74134) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İşlem basamakları:

- Doku rneklerinin homojenizasyonu için, PBS ile yıkanan doku örnekleri 1.4 mm çapında seramik boncukları içeren 2 ml'lik özel tüplere (MagNA Lyser Green Beads, Roche, Kat No: 03358941001) alınmış, 600 l RLT Buffer eklenerek MagNA Lyser cihazı (Roche, Kat No: 03358976001) ile homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Homojenize doku örnekleri 14000g'de 3 dk santifjlenerek süpernatant gDNA Eliminator spin column'a aktarılmıştır.
- Süpernatanı içeren filtreli tüpler 8000g'de 30 s santrifüjlenerek, filtre uzaklaştırılmış, collection tüpte biriken örneğın üzerine 600 l %70'lik ethanol eklenerek pipetlenmiştir.
- Bu karışım RNeasy spin column'a aktararak 8000g'de 15 s santrifüjlenmiş, filtreden geçen bölüm uzaklaştırılmıştır.
- Filtrenin yıkanması için 700 l RW1 tamponu eklenerek 8000g'de 15 s santrifüjlenmiş, filtreden geçen bölüm uzaklaştırılmıştır.
- Filtrenin yıkanması için 500 l RPE tamponu eklenerek 8000g'de 15 s santrifüjlenmiş, filtreden geçen bölüm uzaklaştırılmıştır.
- Tekrar 500 l RPE tamponu eklenerek 8000g'de 2 dk santrifüjlenmiş, filtreden geçen bölüm uzaklaştırılmıştır.
- Filtreden alkolün uzaklaştırılması amacıyla herhangi bir solüsyon eklemeden 14000g'de 1 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilerek filtre temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yereştirilmiştir.

- Filtreye bağlanan RNA'nın çözünmesi amacıyla filtre üzerine 50 µl nuclease-free H₂O eklenerek 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş, 8000g'de 1 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır.

RNA örneklerinin miktar ölçümü ve saflık değerlerinin belirlenmesi

RNA örneklerin miktarları ve saflık değerleri NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) cihazı ve yazılımı ile ölçülmüştür:

- Ölçüm gerçekleştirilmeden önce, izolasyonda kullanılan nuclease-free H₂O ile “blank” işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Bu işlemin ardından 2 µl RNA örneği cihazın üzerindeki ölçüm haznesine pipetlenmiştir.
- Cihazın bağlı olduğu bilgisayarda bulunan NanoDrop yazılımı kullanılarak örneklerin 230, 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri ve sırasıyla birinci ve ikinci saflığın belirlenmesinde kullanılan A260/280 ve A260/230 oranları elde edilmiştir.
- Örneklerin kullanılabilir olması için A260/280 değerinin yaklaşık 1,8; A260/230 değerinin ise 1,8- 2,2 aralığında olması gerekmektedir.

cDNA sentezinin gerçekleştirilmesi

Uygun miktar ve saflık değerlerine sahip RNA örneklerinden cDNA sençalışmai RT² First Strand Kit (Qiagen, Kalalog No:330401) ile gerçekleştirilmiştir.

İşlem basamakları:

- RNA örnekleri final miktarı 100 ng, final hacmi 8 µl olacak şekildenuclease-free H₂O ile ayarlanmıştır.
- Su ve RNA içeren tüplere, genomik DNA'nın eliminasyonu amacıyla 2'şer µl GE buffer eklenerek kısaca santrifüjlenmiştir.
- Tüpler konvansiyonel PCR cihazına (SensoQuest GmbH, Katalog No:012-103) yerleştirilerek 42°C'de 5dk inkübe edilmiş, ardından buz üzerine alınarak 1 dk bekletilmiştir.

- Her örnek için 4 µl 5x Buffer BC3, 1 µl Control P2, 2 µl RE3 Reverse Transcriptase Mix, 3 µl nuclease-free H₂O içeren karışım hazırlanmış ve örneklerin üzerine dağıtılarak kısaca santrifüjlenmiştir.
- Tüpler konvansiyonel PCR cihazına (SensoQuest GmbH, Katalog No:012-103) yerleştirilerek 42°C’de 15 dk ve 95°C’de 5 dk inkübe edilmiş, ardından 91 µl nuclease-free H₂O eklenerek pipetlenmiştir.

Gerçek zamanlı PCR

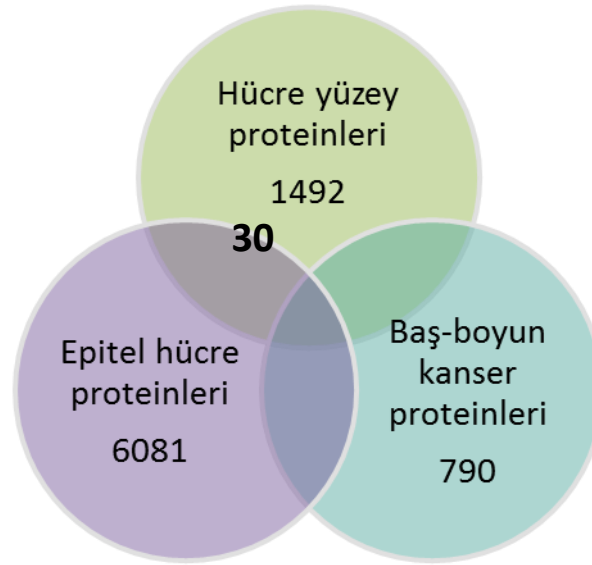
Genlerin belirlenmesi ve primer tasarımı

Hücre yüzeyinde tedavi hedefi oluşturma potansiyeli olan aday genlerin belirlenebilmesi için farklı veritabanlarından yararlanılmıştır.

İşlem basamakları:

- Ekspresyonu valide edilmiş olan tüm hücre yüzey proteinleri (“surfaceome”) Cell Surface Protein Atlas (<https://wlab.ethz.ch/cspa/#abstract>) kullanılarak tanımlanmıştır (n=1492).
- Baş ve boyun kanserlerinde ifade edildiği valide edilmiş olan proteinleri kodlayan genler The Pathology Atlas (<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/pathology>) kullanılarak tanımlanmıştır (n=790).
- Epitel hücrelerinde ifade edildiği valide edilmiş olan proteinleri kodlayan genler The Single Cell Type Atlas (<https://www.proteinatlas.org/humanproteome/celltype/epithelial+cells>) kullanılarak tanımlanmıştır (n=6081).

- Her üç sınıflandırmada da ortak şekilde bulunan genler gruplandırılmıştır (n=30) (Şekil x).



Şekil 6. Hücre yüzeyinde, baş-boyun kanserlerinde ve epitel hücrelerde ifade edildiği belirlenen genlerin sayısı

- Belirlenen 30 gene ve referans olarak kullanılacak *ACTB* genine ait primer tasarımları gerçekleştirilmiştir (Tablo x).

Tablo 3. Hedefleme aday olma potansiyeli taşıyan genlere ait primer tasarımları

Gen	Gen ID	Forward Primer			Reverse Primer		
		Tm	%GC	Sekans	Tm	%GC	Sekans
<i>ACAA1</i>	ENSG00000060971	60	55	cgggagaagcaggatacctt	60	53	agcttggaacagcccttg
<i>AQP1</i>	ENSG00000240583	59	58	ccttcctcctttgtgctc	60	58	gggtgctcaattccctctg
<i>AREG</i>	ENSG00000109321	59	50	tgatcctcacagctgttgc	59	39	tccattctctgtcgaagttct
<i>BCHE</i>	ENSG00000114200	59	61	ggtgggtgccctaggatt	59	50	taaacccatgttccctggag
<i>CD59</i>	ENSG00000085063	60	48	aatctcctccagtgaggt	59	32	ttgaatatccatctaactgtgcaat
<i>COL7A1</i>	ENSG00000114270	60	57	ctcagcagctatcacctggac	59	63	agctggccttaggacactc
<i>CXADR</i>	ENSG00000154639	59	50	tcatgccttgagatctgtgg	59	36	gaaaaatatcacctgggaactatga
<i>CYTH1</i>	ENSG00000108669	59	58	agctgtccttgccctaga	59	50	tcttctgctcctgtgttca
<i>DSG2</i>	ENSG00000046604	60	58	gaacaccacggtgtctgga	59	39	tgaccagattcctctaaacaaa
<i>FGFR2</i>	ENSG00000066468	60	50	gacccaaatgggagttcc	60	56	gaccacttgccaaagca
<i>ITGA3</i>	ENSG00000005884	60	50	caaccaggatggattcagg	59	55	cagtgccagcttcttccat
<i>ITGA6</i>	ENSG00000091409	60	45	tatttttggtgtggtgact	59	50	aggatgtcacctgagtgcaa
<i>ITGAL</i>	ENSG00000005844	59	61	gtcctgcaggtcggaac	60	58	aggcttctgtgtgttcc
<i>L1CAM</i>	ENSG00000198910	59	45	aaagattggttctccagca	60	58	ccaagcacaggcatcacagg
<i>MET</i>	ENSG00000105976	59	56	ggctgcttcagcaggtt	59	52	actctggagacactggatgg
<i>MOXD1</i>	ENSG00000079931	59	42	gagagctgcatacatgtgacataa	60	58	tggtgccctattggagtc

<i>PLA2G3</i>	ENSG00000100078	59	45	tgagaatggggaaagggtaa	59	57	tgtacctctctctgggtactgc
<i>PLAU</i>	ENSG00000122861	59	56	gcttgcttgggtcaatcc	59	43	tccatttagacagtcacagttcg
<i>PLXNB1</i>	ENSG00000164050	59	53	tttgacctgctgatgagc	60	55	tccagaacctcagaggcaag
<i>PRSS23</i>	ENSG00000150687	60	45	agcaggttcagcatttttg	60	55	cagccctggataacttcac
<i>SEMA3C</i>	ENSG00000075223	59	56	tgtcagtggtcgagctcat	59	32	tcattgtttataggagcatgatt
<i>SEMA4A</i>	ENSG00000196189	60	55	cattccagagggagggaac	59	43	tgaagcagttggaaggagaaa
<i>SEMA5A</i>	ENSG00000112902	59	43	tgtgcaagaacgatattggtg	60	50	tcataatgtggtccaggtg
<i>SERPINH1</i>	ENSG00000149257	60	52	ggggctgactagaaggatttg	59	50	accctgcagtactccaagaac
<i>SGCE</i>	ENSG00000127990	60	50	aagaccagacaggccaacaa	59	58	ccgacggaggtgtaccttg
<i>SLITRK6</i>	ENSG00000184564	59	55	agctccagcctgataggag	59	39	ttccattaactcagctcttcgt
<i>TGFB3</i>	ENSG00000069702	60	55	ctgtcgggtctcagttggtt	59	45	agtgccttttccaatctca
<i>TMEM87B</i>	ENSG00000153214	59	50	gccatagctgtatgcacagga	59	55	agctgctcagtagccctaggta
<i>TNFRSF25</i>	ENSG00000215788	59	55	tctccactccaagcctcact	59	50	tggaggagcctttaacgaga
<i>VCAM1</i>	ENSG00000162692	59	55	cccacttgccatcctactct	60	50	gcccttgaagtttctccaat
<i>ACTB</i>	ENSG00000075624	59	60	agagctacgagctgcctgac	60	61	cgtggatgccacaggact

PCR çalışmasının gerçekleştirilmesi

Çalışma kapsamında bulunan gen ekspresyonlarının değişiminin belirlenmesinde gerçek zamanlı PCR cihazı (LightCycler 480 Instrument II, Roche) ve RT2 SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen, Katalog No: 330502) kullanılmıştır. Bu mastermix reaksiyon sırasında yeni oluşan DNA'nın küçük ve büyük oluklarına bağlanarak 497/520 nm'de ışıma sağlayan SYBR green boyası, HotStart DNA Taq polimeraz enzimi ve diğer PCR bileşenlerini içermektedir.

İşlem basamakları:

- Her reaksiyon için 5 µl RT2 SYBR Green qPCR Mastermix, 0,5 µl nuclease-free H₂O, 1 µl forward primer, 1 µl reverse primer ve 2,5 µl cDNA, 96 kuyucuklu plakanın ilgili kuyucuğuna pipetlenerek reaksiyon karışımı hazırlanmış, plaka yapışkan şeffaf folyo ile kapatılarak kısaca santrifüjlenmiştir.
- 10 dk 95°C HotStart DNA Taq Polymerase aktivasyonu, 15 s 95°C ve 1 dk 60°C 45 döngüden oluşan cycling basamağını içeren program kullanılmıştır. Ramp rate 1,5°C/s olarak ayarlanmış, 60°C'de veri toplanmıştır.
- Light Cycler Software üzerinden CT (cycling threshold) değerleri .txt formatında dışa aktırılmıştır (export).

PCR verilerinin analizi

PCR verilerinin analizi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Her örnek için hedef genlerin Ct değerlerinden referans genin Ct değeri çıkarılmış, ardından tümör örnekleri için elde edilen değerlerden normal örnekler için elde edilen değerlerin çıkarılmasıyla $\Delta\Delta Ct$ değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sayıların 2'nin eksi kuvveti şeklinde alınmasıyla kat düzenlenmesi ("fold regulation") değerleri hesaplanmıştır.

3.4. İstatistiksel analizler

Belirlenen varyasyonların sağ kalım ile ilişkisinin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 6 (Graph Pad) programı ve Kaplan-Meier Survival analizi yapılmıştır. Varyasyonların tümör T, N, evre ve nüks ile ilişkisinin değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis H testi ile PASW Statistics 18 (SPSS) yazılımı kullanılmış, anlamlılık için $p < 0,05$ kabul edilmiştir. Gen ekspresyonu verilerinin istatistiksel değerlendirmesi her örnek için tüm değerlerin student t testi ile değerlendirilmesi sonucu p değeri belirlenmiştir. p değeri 0,05'ten küçük olanlar anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

4. Bulgular

4.1. Olguların demografik dağılımı

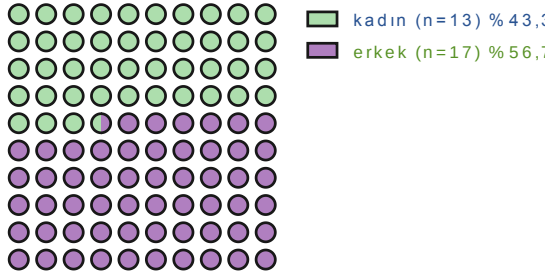
Olguların yaş ortalaması 68,5'tir. Olguların %43,33'ü (n=13) kadın, %56,67'si (n=17) erkektir. TNM evreleme sistemine göre değerlendirildiğinde olguların %40'ı (n=12) T1, %20'si (n=6) T2, %23,33'ü (n=7) T3, %16,67'i (n=5) T4'tür. Lenf nodu tutulumu açısından değerlendirildiğinde olguların %93,33'ü (n=28) N0, %3,33'ü (n=1) N1, %3,33'ü (n=1) N2'dir. Olguların %40'ı (n=12) evre 1, %13,33'ü (n=4) Evre 2, % 26,67'si (n=8) Evre 3, %20'si (n=6) Evre 4'tür. Olguların %80'inde (n=24) nüks görülmemekle birlikte, %20'sinde (n=6) nüks bulunmaktadır. Ortalama takip süresi 32,7 aydır. Olguların demografik özellikleri Tablo 1'de ve Grafik 1'de gösterilmiştir

Tablo 4. Olguların demografik özellikleri

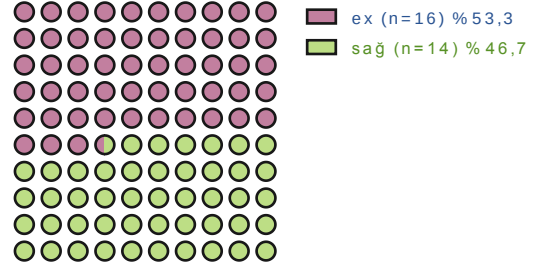
Parametre		Sayı (n)	Yüzde (%)
Cinsiyet	Kadın	13	43,33
	Erkek	17	56,67
T	T1	12	40,00
	T2	6	20,00
	T3	7	23,33
	T4	5	16,67
N	N0	28	93,33
	N1	1	3,33
	N2	1	3,33
Evre	Evre 1	12	40,00
	Evre 2	4	13,33
	Evre 3	8	26,67
	Evre 4	6	20,00
Nüks	Var	6	20,00
	Yok	24	80,00
Sağ kalım	Ex	16	53,33
	Sağ	14	46,67
Terapi	Kemoradyoterapi	9	30,00
	Radyoterapi	9	30,00
	Yok	12	40,00
Ameliyat	Inferior maksillektomi	12	40,00
	Inferomedial maksillektomi	7	23,33
	Medial maksillektomi	1	3,33
	Orbita ekzantrasyonu ve maksillektomi	1	3,33

	Total maksillektomi			9	30,00
Yaş	36	72	85	68,5	12,40
Takip süresi (ay)	0	26	143	32,7	32,15
	Minimum	Medyan	Maksimum	Ortalama	Std.Sapma

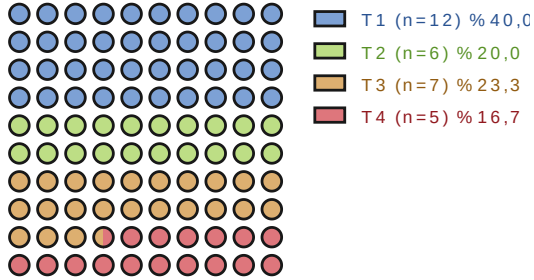
Cinsiyet



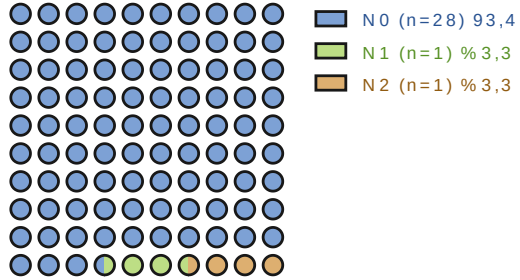
Sağ Kalım



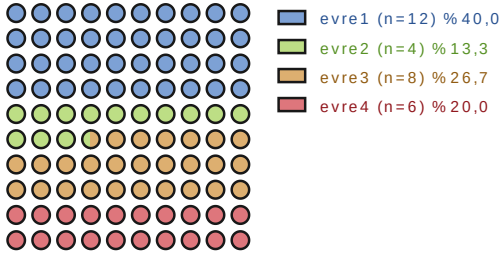
T evre



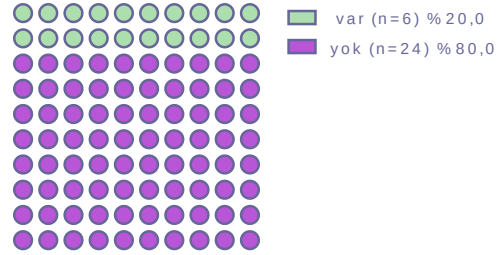
Lenf nodu tutulumu

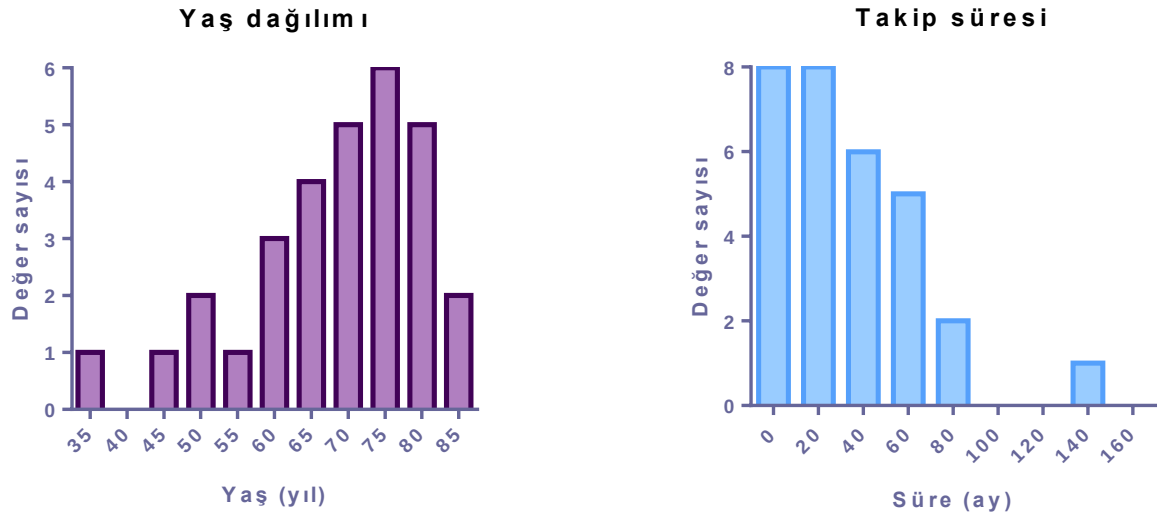


TNM



Nüks



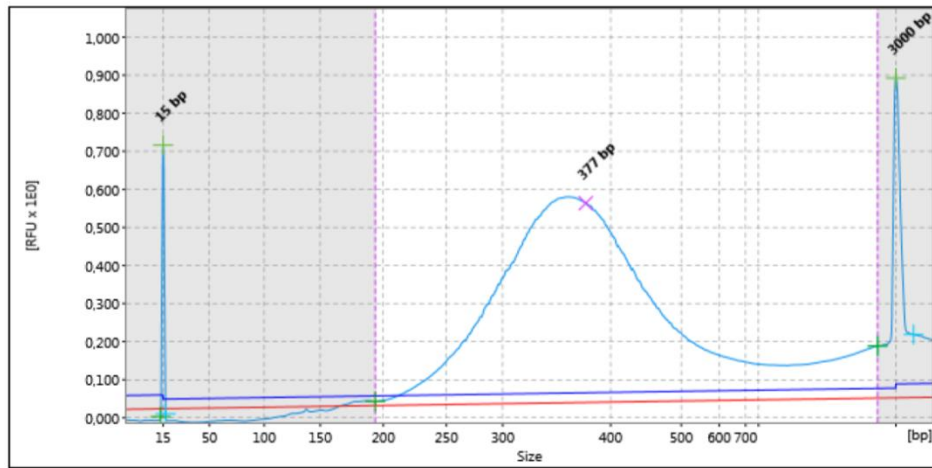


Grafik 1. Olguların demografik özellikleri

4.2. Olguların mutasyon profili

Tablo 5. DNA izolasyon sonuçları

	Ortalama Konsantrasyon (ng/μl)	Ortalama A260/280	Ortalama A260/230
DNA (n=30)	28,9 ±16,4	1,9 ±0,4	2,1 ±0,8



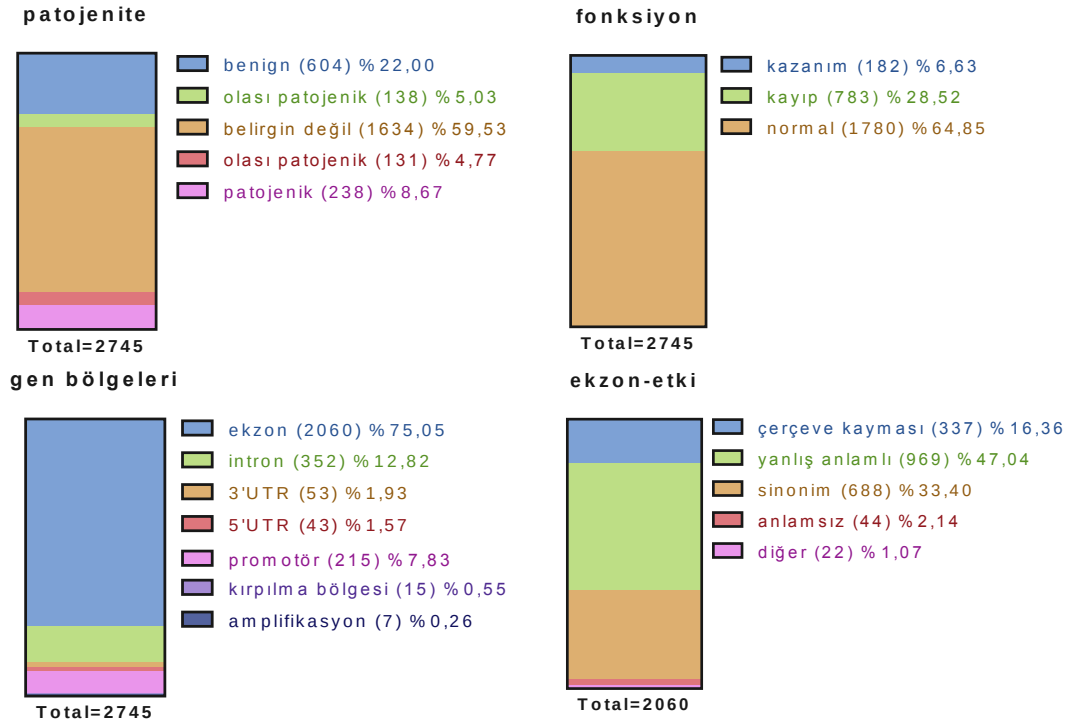
Şekil 7. Örneklerden birinin Qiaxcel analiz görünümü. Bu örnek için ortalama fragment uzunluğu 377 bp.

Tablo 6. Kütüphane konsantrasyon ve fragment uzunluğu sonuçları

	Ortalama Konsantrasyon (nM)	Ortalama Fragment Uzunluğu (bp)
Kütüphane (n=30)	67 ±26	364 ±29

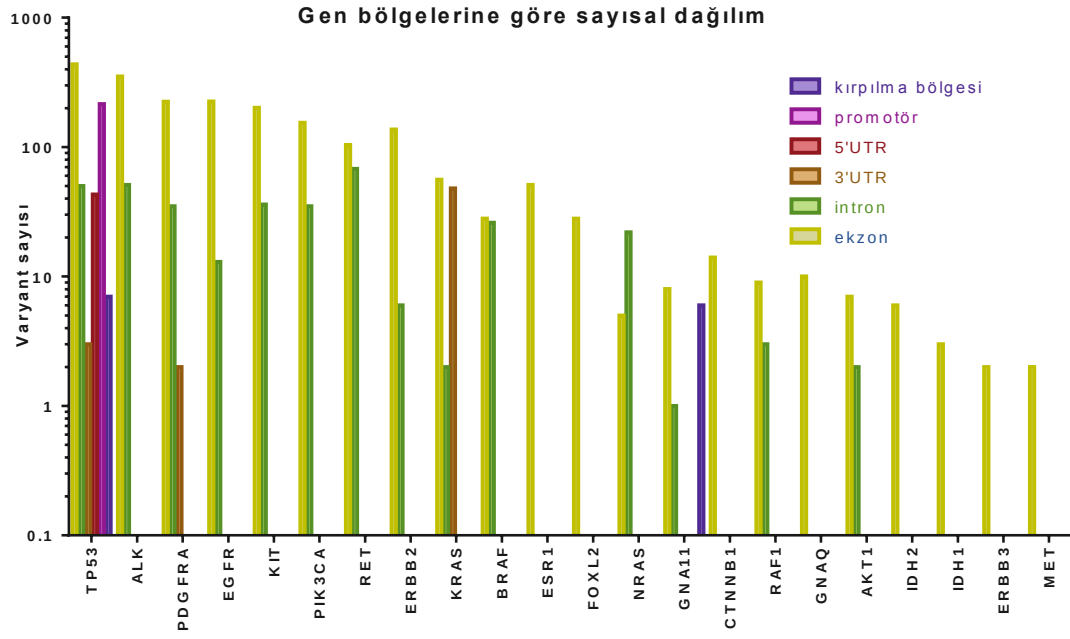
Klinik anlamı bilinen varyantların dağılımı

Tüm olgularda toplam 2.745 adet klinik anlamı bilinen varyant belirlenmiştir. Bunlardan 604 tanesi benign, 138 tanesi olası benign, 131 tanesi olası patojenik, 238 tanesi patojeniktir. Varyantlardan 182 tanesinde fonksiyon kazanımı, 783 tanesinde fonksiyon kaybı meydana gelmiştir. Ayrıca 1.780 varyantta ise normal fonksiyon belirlenmiştir. Belirlenen varyantların 2.060 tanesi ekzon, 352 tanesi intron, 333 tanesi ise diğer gen bölgelerinde yer almaktadır. Ekzon bölgelerinde bulunan varyantlardan 337 tanesi çerçeve kayması, 969 tanesi yanlış anlamlı, 688 tanesi sinonim, 44 tanesi anlamsız etkiye neden olmuştur.



Şekil 8. Varyantların gruplandırılması

Klinik anlamlı varyantlar değerlendirildiğinde, tüm varyantların %27,47'si (n=754) TP53, %14,68'i (n=403) geninde belirlenmiştir.



Şekil 9. Genlere ve gen bölgelerine göre varyantların dağılımı

TP53 geninin 4. ekzonunda toplam 142 (55 eşsiz) varyant, *PIK3CA* geninin 2. ekzonunda toplam 111 (27 eşsiz) varyant tanımlanmıştır.

	ekzon1	ekzon2	ekzon3	ekzon4	ekzon5	ekzon6	ekzon7	ekzon8	ekzon9	ekzon10	ekzon11	ekzon12	ekzon13	ekzon14	ekzon15	ekzon16	ekzon17	ekzon18	ekzon19	ekzon20	ekzon21	ekzon22	ekzon23	ekzon24	ekzon25	ekzon26	ekzon27	ekzon28	ekzon29
AKT1			7																										
ALK				10			16							62			16	37	64	1	4	11	12	34					84
BRAF						5					3	1			3	16													
CTNNB1			14																										
EGFR	1		42		6		3					28		14	1	12	1	9	60	7	1	33		7					
ERBB2	3	3		10	3					4		3				20		1	33	4	1	2			9	2	38		
ERBB3						2																							
ESR1				37				14																					
FOXL2	28																												
GNAI1				8																									
GNAQ				10																									
IDH1			3																										
IDH2			6																										
KIT	19						8	8	19	51	1	9	4	9			3	32		9	29								
KRAS	2	2	26	26																									
MET																			2										
NRAS	2	2	1																										
PDGFRA		33	16	4		11			31	41	10	5	3				19	2				48							
PIK3CA	111	4		5	1	4	1	1	9	1	2	1	2		2	3	1	3		3									
RAF1						3											6												
RET									15	21		49		18	1														
TP53	5	1	142	39	21	80	83	14	49	2																			

a.

b.

	ekzon1	ekzon2	ekzon3	ekzon4	ekzon5	ekzon6	ekzon7	ekzon8	ekzon9	ekzon10	ekzon11	ekzon12	ekzon13	ekzon14	ekzon15	ekzon16	ekzon17	ekzon18	ekzon19	ekzon20	ekzon21	ekzon22	ekzon23	ekzon24	ekzon25	ekzon26	ekzon27	ekzon28	ekzon29
AKT1			5																										
ALK				8				8							16			7	21	15	1	2	6	8	7				21
BRAF							3				3	1			3	2													
CTNNB1			9																										
EGFR		1		8		2		2					7		6	1	7	1	8	16	5	1	4			2			
ERBB2		2	2		2	3					1		2				6		1	5	2	1	1			2	2	4	
ERBB3							1																						
ESR1					6				3																				
FOXL2	11																												
GNAI1					2																								
GNAQ					1																								
IDH1				1																									
IDH2				5																									
KIT		12						6	6	7	25	1	4	4	3			3	5		3	18							
KRAS		2	2	3	5																								
MET																			2										
NRAS		2	2	1																									
PDGFRA			13	9	4		4			22		9	5	3	2				7	1					14				
PIK3CA		27	3		5	1	2	1	1	6	1	1	1	2		1	2	1	2		2								
RAF1							3										5												
RET										6	18		8		7	1													
TP53		4	1	55	31	17	37	25	8	25	2																		

b.

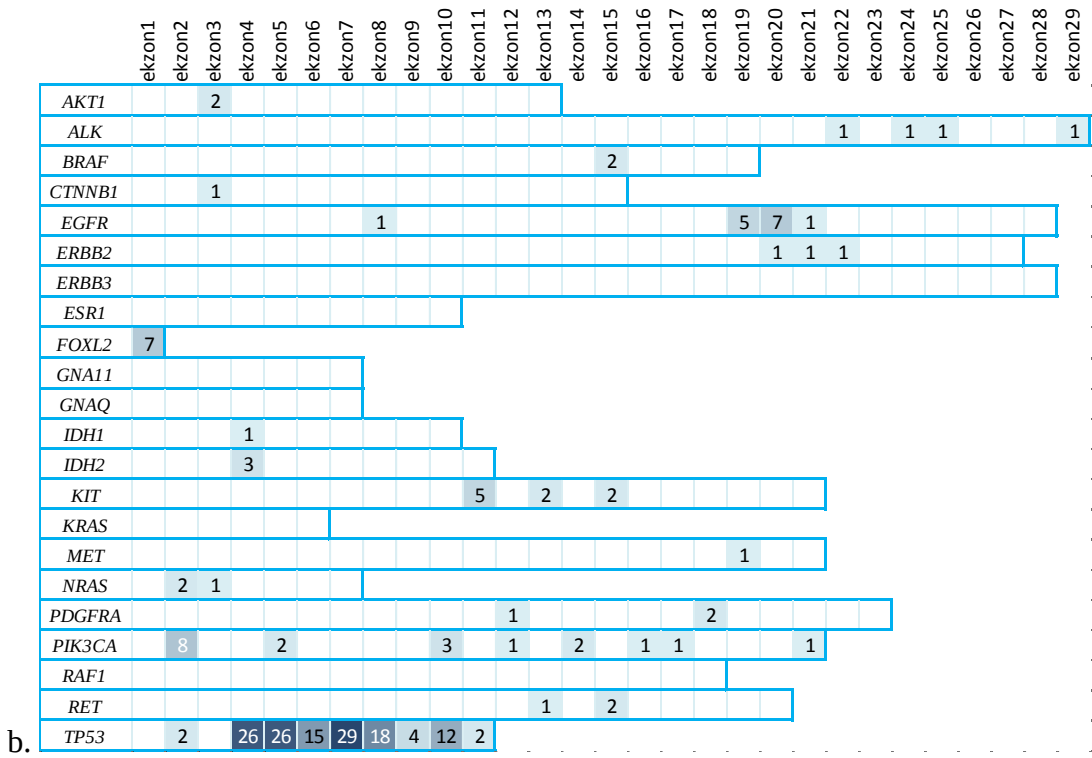
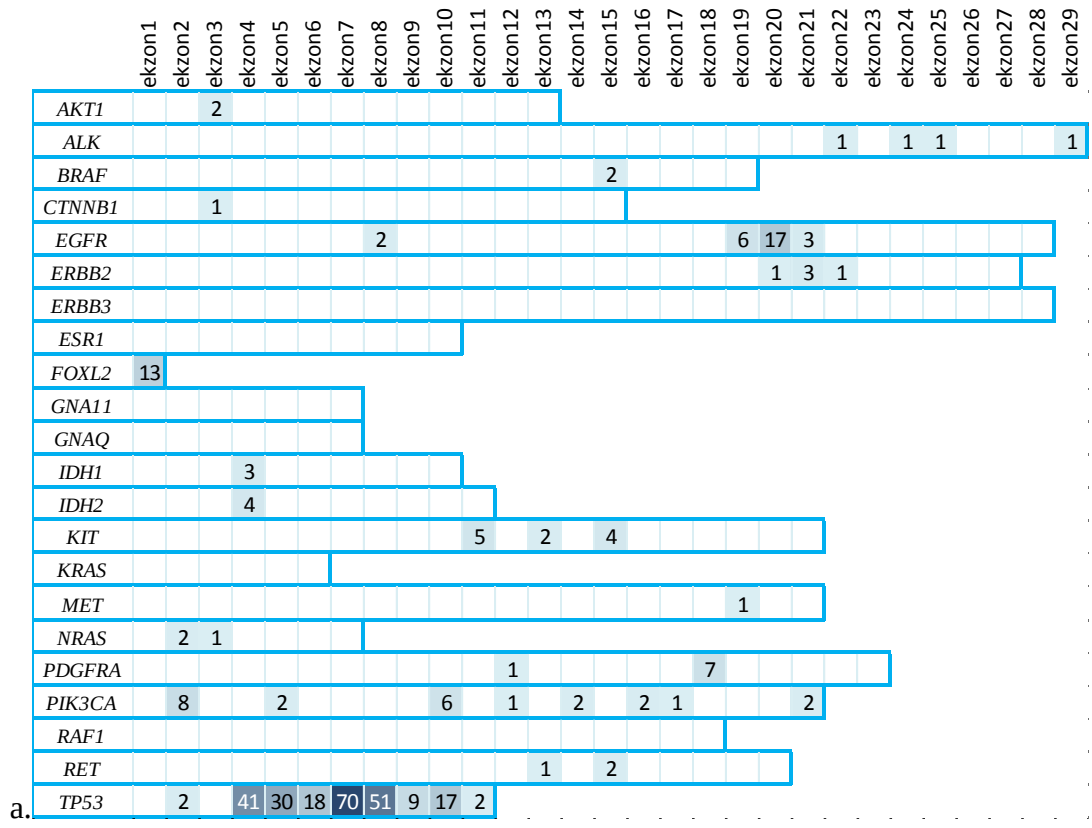
Şekil 10. Varyantların ekzonlara göre dağılımı a. Tüm, b. Eşsiz varyantlar

Olgularda belirlenmiş olan klinik anlamlı varyantların gen bölgelerine göre dağılımı değerlendirildiğinde tüm olguların (n=30) ortak şekilde, *EGFR* geninin 23., *PDGFRA* geninin 12. ve 23. ekzonlarında mutasyon taşıdığı belirlenmiştir. Kodlamayan bölgeler değerlendirildiğinde ise 29 olgunun ortak şekilde *TP53* geninin promotör bölgesinde mutasyon taşıdığı görülmektedir.

	3'UTR	5'UTR	promotör	ekzon1	ekzon2	ekzon3	ekzon4	ekzon5	ekzon6	ekzon7	ekzon8	ekzon9	ekzon10	ekzon11	ekzon12	ekzon13	ekzon14	ekzon15	ekzon16	ekzon17	ekzon18	ekzon19	ekzon20	ekzon21	ekzon22	ekzon23	ekzon24	ekzon25	ekzon26	ekzon27	ekzon28	ekzon29
AKT1					7																											
ALK							8			12								29			13	19	26	1	3	8	11	26				
BRAF									5				3	1				3	15													
CTNNB1					11																											
EGFR				1		28		6		3						21		12	1	9	1	5	28	7	1	30		7				
ERBB2				3	3			9	3					4		3				14		1	29	4	1	2		9	2	29		
ERBB3										2																						
ESR1							27					15																				
FOXL2				18																												
GNA11							8																									
GNAQ							9																									
IDH1						3																										
IDH2						6																										
KIT				13						7	5	11	18	1	8	3	7			3	23		9	15								
KRAS				2	2	14	19																									
MET																							2									
NRAS				2	1	1																										
PDGFRA	2				17	11	3		9				19	30	9	3	3				14	2						30				
PIK3CA				29	3			5	1	3	1	1	6	1	2	1	2		2	3	1	3		3								
RAF1										3											6											
RET													11	15		27		13	1													
TP53	3	27	29		5	1	29	15	11	24	28	8	19	2																		

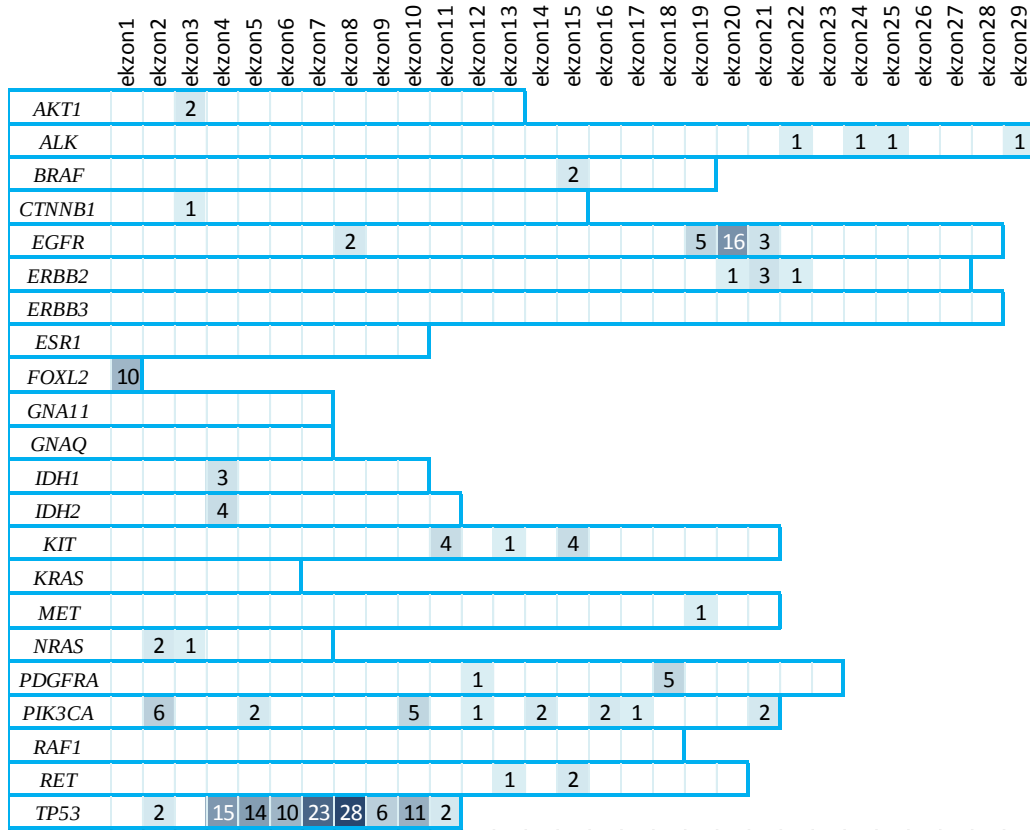
Şekil 11. Ekzon, 3'UTR, 5'UTR ve promotör bölgelerinde ortak varyant taşıyan olgu sayısı

Patojenik ve olası patojenik varyantların *TP53* geni üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir.



Şekil 12. Patojenik ve olası patojenik varyantların ekzonlara göre dağılımı a.Tüm, b.Eşsiz varyantlar

TP53 geninin ekzon 9’unda 28 olguda ortak şekilde patojenik veya olası patojenik varyant bulunmaktadır.



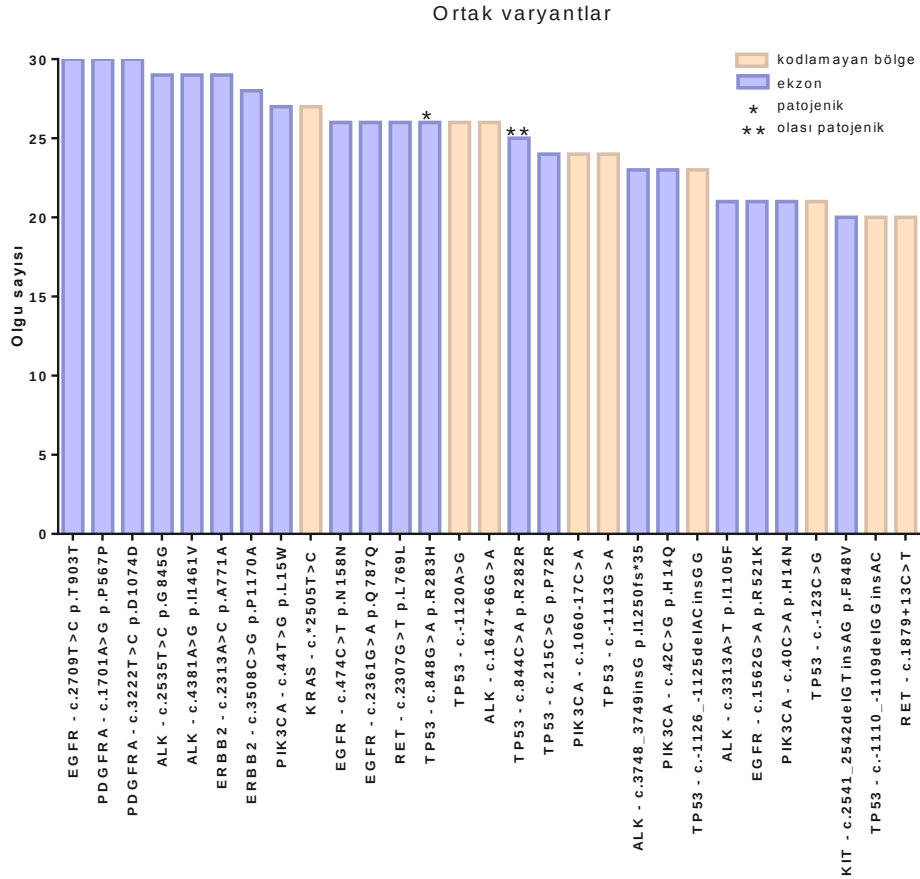
Şekil 13. Ekzon bölgelerinde patojenik ya da olası patojenik varyant taşıyan olgu sayısı

Klinik anlamlı varyantlar değerlendirildiğinde en az 20 ve üzeri olguda belirlenen varyantlar Tablo 17 ve Grafik 16’da verilmiştir. *EGFR* genindeki c.2709T>C p.T903T, *PDGFRA* genindeki c.1701A>G p.P567P ve c.3222T>Cp.D1074D alterasyonların tüm olgularda ortak olarak bulunduğu belirlenmiştir. *TP53* genindeki c.848G>A p.R283H alterasyonu ise 30 olgunun 25 tanesinde patojenik olarak belirlenmiştir.

Tablo 7. Olgularda en yüksek oranda belirlenen klinik anlamlı varyantlar (n≥20)

Gen	Bölge	Patojenite	Alterasyon	Alterasyon	Fonksiyon	Etki	n
<i>EGFR</i>	ekzon23	Benign	c.2709T>C	p.T903T	Normal	sinonim	30
<i>PDGFRA</i>	ekzon12	Benign	c.1701A>G	p.P567P	Normal	sinonim	30
<i>PDGFRA</i>	ekzon23	Benign	c.3222T>C	p.D1074D	Normal	sinonim	30
<i>ALK</i>	ekzon15	Benign	c.2535T>C	p.G845G	Normal	sinonim	29
<i>ALK</i>	ekzon29	Benign	c.4381A>G	p.I1461V	Normal	yanlış anlamlı	29
<i>ERBB2</i>	ekzon20	Belirgindeğil	c.2313A>C	p.A771A	Normal	sinonim	29
<i>ERBB2</i>	ekzon27	Benign	c.3508C>G	p.P1170A	Normal	yanlış anlamlı	28

PIK3CA	ekzon2	Belirgindeğil	c.44T>G	p.L15W	Kayıp	yanlış anlamlı	27
EGFR	ekzon4	Benign	c.474C>T	p.N158N	Normal	sinonim	26
EGFR	ekzon20	Benign	c.2361G>A	p.Q787Q	Normal	sinonim	26
RET	ekzon13	Benign	c.2307G>T	p.L769L	Normal	sinonim	26
TP53	ekzon8	Patojenik	c.848G>A	p.R283H	Kayıp	yanlış anlamlı	26
TP53	ekzon8	Olasıpatojenik	c.844C>A	p.R282R	Kayıp	sinonim	25
TP53	ekzon4	Belirgindeğil	c.215C>G	p.P72R	Kazanım	yanlış anlamlı	24
						çerçeve	
ALK	ekzon25	Belirgindeğil	c.3748_3749insG	p.I1250fs*35	Kayıp	kayması	23
PIK3CA	ekzon2	Belirgindeğil	c.42C>G	p.H14Q	Normal	yanlış anlamlı	23
ALK	ekzon20	Belirgindeğil	c.3313A>T	p.I1105F	Normal	yanlış anlamlı	21
EGFR	ekzon13	Benign	c.1562G>A	p.R521K	Kazanım	yanlış anlamlı	21
PIK3CA	ekzon2	Belirgindeğil	c.40C>A	p.H14N	Normal	yanlış anlamlı	21
			c.2541_2542delG				
KIT	ekzon18	Belirgindeğil	TinsAG	p.F848V	Normal	yanlış anlamlı	20
KRAS	3'UTR	Belirgindeğil	c.*2505T>C	-	Normal	-	27
TP53	promotör	Belirgindeğil	c.-1120A>G	-	Normal	-	26
ALK	intron8	Benign	c.1647+66G>A	-	Normal	-	26
PIK3CA	intron5	Benign	c.1060-17C>A	-	Normal	-	24
TP53	promotör	Belirgindeğil	c.-1113G>A	-	Normal	-	24
			c.-1126_-				
TP53	promotör	Belirgindeğil	1125delACinsGG	-	Normal	-	23
TP53	5'UTR	Benign	c.-123C>G	-	Normal	-	21
			c.-1110_-				
TP53	promotör	Belirgindeğil	1109delGGinsAC	-	Normal	-	20
RET	intron10	Belirgindeğil	c.1879+13C>T	-	Normal	-	20



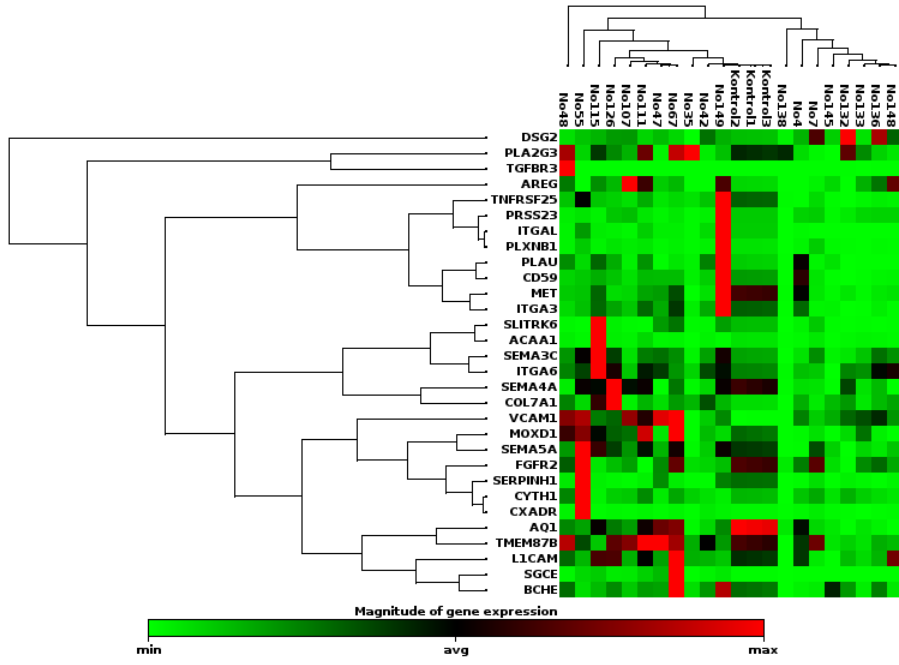
Şekil 14. Tüm olgularda en yüksek oranda belirlenen varyantlar (n≥20)

4.3. Olguların gen ekspresyon profili

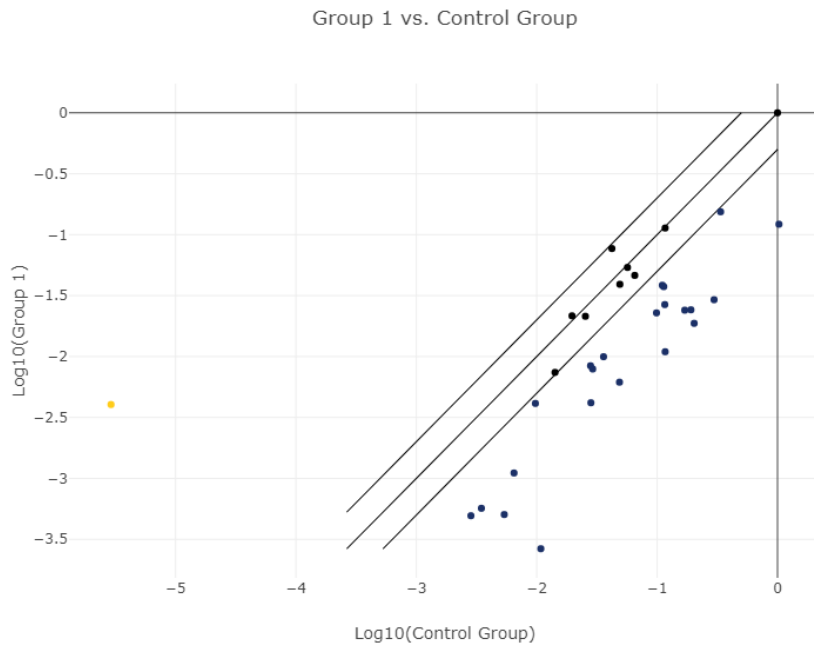
Tüm olgular kontrole göre değerlendirildiğinde, VCAM1 geninin ekspresyonunun tümör dokularında kontrole göre belirgin ve anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir.

Tablo 8. Tümör dokularında kontrole göre gen ekspresyon değişimleri (fold regulation)

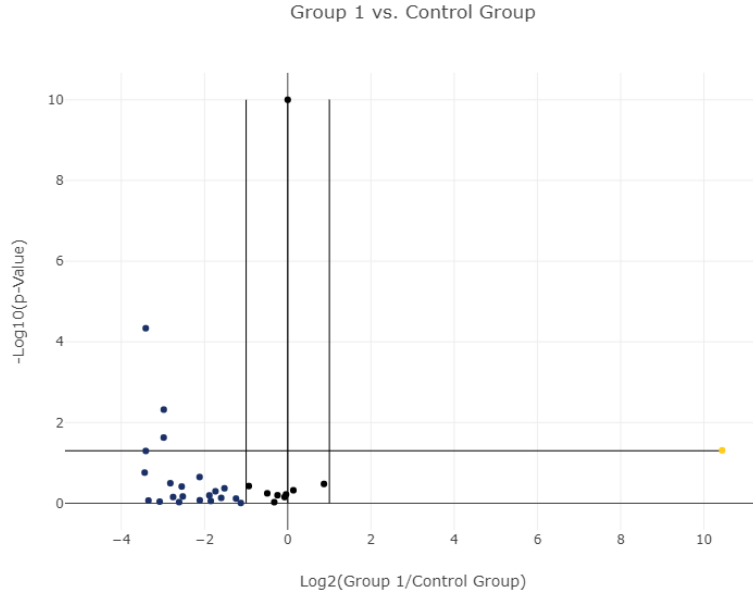
Genler	Kat düzenleme	p değeri
VCAM1	1386,63	0,048739
COL7A1	1,83	0,331865
DSG2	1,1	0,476769
ITGA6	-1,03	0,603171
CXADR	-1,05	0,702457
SEMA3C	-1,19	0,633039
CYTH1	-1,25	0,940873
SGCE	-1,41	0,567574
TMEM87B	-1,91	0,375079
PRSS23	-2,18	0,985091
BCHE	-2,37	0,764146
SEMA5A	-2,87	0,425148
CD59	-3,03	0,736447
L1CAM	-3,33	0,505262
ACAA1	-3,6	0,877553
PLA2G3	-3,69	0,639036
PLXNB1	-4,33	0,841671
TNFRSF25	-4,34	0,223901
PLAU	-5,75	0,677747
AREG	-5,85	0,385474
MOXD1	-6,11	0,934914
TGFBR3	-6,74	0,701365
ITGA3	-7,06	0,318593
MET	-7,89	0,004777
FGFR2	-7,9	0,023518
ITGAL	-8,44	0,912106
SLITRK6	-10,17	0,857344
SEMA4A	-10,63	0,05055
AQ1	-10,65	0,000046
SERPINH1	-10,84	0,173522



Şekil 15. Gen ekspresyon değişimini gösteren ısı haritası



Şekil 16. Gen ekspresyon değişimini gösteren scatter plot



Şekil 17. Gen ekspresyon değişimini gösteren volcano plot

5. Tartışma

Nadir bir hastalık grubunu oluşturan nazal sinüslerin maligniteleri arasında anatomik ve histolojik olarak en yaygın görülen tip, maksiller sinüslerin skuamöz hücreli karsinomlarıdır (Elgart ve Faden, 2020). Bu bağlamda çalışmanın planlanması aşamasında nadir bir hastalığın değerlendirilebilmesi ancak bu esnada olgu ve çalışma materyali temininde kısıtlayıcılık olmaması açısından nadir hastalık grubunun içinde en yaygın görülen alt tip seçilmiştir.

Çalışma kapsamında örnek sayısı 30 olarak belirlenmiş, Ege Üniversitesi Hastanesi'nin klinik verilerigöz önünde bulundurularak olgu sayısının yaklaşık iki yıllık bir sürede toplanabilmesi öngörülmüştür. Seçilen örneklem sayısını destekleyecek şekilde 1992-2016 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi veri tabanında kayıtlı tüm baş ve boyun kanserli olguların değerlendirildiği demografik verileri içeren çalışmada sunulan veriler doğrultusunda, bu merkezdeki ortalama yıllık sinonazal skuamöz hücre karsinomlu hasta sayısı 12 olarak hesaplanmakla birlikte, tanı alan hasta sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir(Özkaya Akagündüz vd., 2019). Farklı ülkelere ait referans merkezlerinin verileri değerlendirildiğinde paranazal sinüs kanserlerinin görülme ve belirlenme sıklığının toplumlar arasında değişkenlik gösterdiği dikkat çekmektedir. Örneğin Norveç'e ait referans bir merkezde 1988 ile 2017 yılları arasında paranazal skuamöz hücre karsinomlu hasta sayısı toplamı 72 (yıllık ortalama iki hasta), Nijerya'ya ait bir merkezde 2007 – 2017 yılları arasında paranazal skuamöz hücre karsinomlu hasta sayısı toplamı 69 (yıllık ortalama yedi hasta), ABD'ninulusal kanser veri tabanına ait 2004 – 2015 yılları arasındaki veriler değerlendirildiğinde ise bu gruptaki hasta sayısı toplamı 3.793 (yıllık ortalama 345 hasta) olarak belirlenmiştir(Ajiya, Abdullahi, ve Shuaibu, 2020; Farrell vd., 2020; König, Osnes, Bratland, ve Meling, 2019). Bu değişkenliğe bağlı olarak, nadir bir kanser türü ile gerçekleştirilecek olan çalışmanın planlanması aşamasında, verilerin temin edileceği kliniğin olgu potansiyelinin öncelikli olarak değerlendirilmesi gerektiği ortaya çıkmış ve çalışmada seçilen olgu sayısının bu açıdan ideal olduğu belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında analizi gerçekleştirilen olguların yaş ortalaması 68,5 olarak belirlenmiştir. Farklı çalışma gruplarının verileri değerlendirildiğinde, bu kanser tipinin yaş ortalamasının 55 ile 70 arasında değiştiği görülmektedir (Farrell vd., 2020; C. Hu, Quan, vd., 2020; König vd., 2019).

Çalışmamızda erkek: kadın oranı 1,3:1'dir. Bu kanser tipinin erkeklerde kadınlara göre daha sık görüldüğü literatür bilgisi ile de desteklenmekte; farklı popülasyonlara ait veriler değerlendirildiğinde bu oranın 1,6 ile 2,8 arasında değiştiği görülmektedir (Farrell vd., 2020; C. Hu, Quan, vd., 2020; König vd., 2019; Nukpook vd., 2020; Sjöstedt vd., 2018). Bununla birlikte bu oranın küçülme eğiliminde olduğu belirtilmektedir (Kuijpers vd., 2012). Çalışma tasarlanırken, cinsiyete bağlı herhangi bir ayırıcı unsur bulunmaması amacıyla bu oranın mümkün olduğunca bire yakın olacak şekilde gerçekleştirilmesi planlanmış ve olgular buna göre seçilmiştir.

Çalışma kapsamında 30 olguda 2.745 adet toplam varyant, 1.005 adet eşsiz varyant belirlenmiştir. Çalışma kapsamında belirlenen varyasyonların tartışılması sırasında konu akış bütünlüğünün mümkün olduğunca sağlanabilmesi amacıyla, hücre dışından içine doğru sinyal iletim basamaklarında bir kaskat oluşturacak şekilde görev alan genler sırasıyla değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu bağlamda önce membranda bulunan reseptörler, ardından aracı proteinleri kodlayan genler ve son olarak DNA ile doğrudan bağlanarak işlev gösteren transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler aynı aile üyeleri bir arada olacak şekilde, ilgili literatüre ve bulgulara atıf yapılarak tartışılmıştır.

EGFR

Bu akışta ilk basamakta reseptör tirozin kinazlar bulunmaktadır. Paranasal skuamöz hücreli karsinomlu olgu grubunda mutasyon profili belirlenen reseptör tirozin kinazlardan epidermal büyüme faktörü alt ailesine üye *ERBB1* olarak da bilinen *EGFR* geninin mutasyonları özellikle akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiş olmakla birlikte genin mutasyonlarının baş ve boyun kanserlerini de içeren farklı kanserlerde de rol oynadığı bilinmektedir [NCBI, gen, *EGFR*; (Agarwala vd., 2018)]. Sinonazal bölgenin farklı orijinli (*de novo* ve inverted papillom kökenli) skuamöz hücreli karsinomlarında %10 – %80 gibi farklılaşan oranlarda *EGFR* mutasyon varlığı daha önce belirlenmiştir (Chung vd., 2015; Sasaki vd., 2018; A. M. Udager vd., 2018; Aaron M. Udager vd., 2016). Ancak bazı çalışmalarda bu gruptaki olgularda hiç mutasyon belirlenememesi dikkat çekicidir (Yasukawa vd., 2018). Ayrıca benign bir lezyondan köken alan sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu olgularda benign lezyon ile ortak *EGFR* mutasyon profili belirlenmesi nedeniyle bu mutasyonların büyük bir bölümünün benign bir imza oluşturduğu önerilmektedir (Sasaki vd., 2018). Bu çelişkili durum *EGFR* geninin detaylı olarak varyasyon profilinin belirlenmesinin önemini ortaya koymuştur ve bu çıkarımla

aynı doğrultuda olarak *EGFR*, çalışmamızda en çok üzerinde durulan genler arasında bulunmaktadır.

EGFR geninde 30 olguda toplam 2.729 adet varyasyon belirlenmiştir. Bunların 239 (%8,8) tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, daha önce tanımlanmamış olan 2.490 (%91,2) adet yeni varyant belirlenmiştir. Klinik anlamı bilinen varyantlardan 225 tanesi ekzon, 13 tanesi intron bölgesinde bulunmaktadır. Ekzon bölgelerinde bulunanlar ekzon 2 – 25 arasında dağılım göstermektedir.

Klinik anlamı belirlenen varyantlardan bir tanesi *EGFR* gen amplifikasyonudur. Amplifikasyon sinyal iletimini arttırmakta ve onkojenik karakteri destekleyerek kanserde rol oynamaktadır. *EGFR* amplifikasyonu farklı kanserlerde özellikle glioblastomda yaygın olarak görülmektedir. Bölgeden bağımsız olarak tüm baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarında ise yaklaşık %10 oranında görülmektedir(Haijing Liu, Zhang, ve Sun, 2020). Sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu olguları içeren çalışmalar incelendiğinde, inverted papillom kökenli olguların %12,5'inde, inverted papillom kökenli ve *de novo* olguları içeren çalışmada tüm olguların %28'inde *EGFR* amplifikasyonu belirlenmiş, onkositik papillom kökenli olgularda ise *EGFR* amplifikasyonu belirlenememiştir(Brown vd., 2020; Hongo vd., 2021). Sadece *de novo* skuamöz hücreli karsinomlu olguları içeren iki farklı çalışmada ise olguların %28,7'sinde ve %44,4'ünde *EGFR* amplifikasyonu belirlenmiştir(Jiromaru vd., 2020; López, Llorente, vd., 2012). Çalışmamızda sadece bir hastada (%3,3) *EGFR* gen amplifikasyonu belirlenmiştir. Bu oran literatür ile kıyaslandığında düşük görünmektedir.

Çalışma kapsamında tüm olgularda belirlenen varyantlar arasında ekzon bölgelerinde bulunan 1.156 varyanttan 544 tanesi patojenik ya da olası patojenik özelliktedir. Bu grupta 231 adet eşsiz varyant tanımlanmıştır ve daha önce tanımlanmamış olan 221 tane patojenik ya da olası patojenik yeni varyasyon belirlenmiştir. Ligand bağlanma bölgesini kodlayan dizilere (ekzon 2 – 4 ve 9 – 12) ait patojenik ya da olası patojenik varyantlar değerlendirildiğinde, bu bölgelerde yoğun olarak çerçeve kayması mutasyonları belirlenmiştir. Ekzon 3'te patojenik Q83Sfs*42 (3/30), G131Rfs*41 (7/30), M137Ifs*31 (5/30), olası patojenik I91Lfs*29 (6/30), N94Tfs*26 (2/30); ekzon 4' te olası patojenik M178Rfs*33 (8/30), F180Sfs*31 (5/30), M178Nfs*14 (7/30), patojenik L144Sfs*28 (3/30); ekzon 12'de ise patojenik N468Ifs*8 (6/30) çerçeve kayması mutasyonları tanımlanmıştır. Ligand-reseptör etkileşimi *EGFR* aktivasyonu için kritik basamaklardan birini oluşturmaktadır. Ligand bağımsız olarak aktifleşen *EGFR* ve sinyal yolağı onkojenik dönüşümde rol oynayan temel mekanizmalardan biridir ve özellikle

bu bölgedeki çerçeve kayması mutasyonları patojenite ile ilişkilendirilmiştir (Guo vd., 2015). Çalışma kapsamında bu bölgede meydana gelen varyasyonların *EGFR*'nin ligandı *EGF* ile etkileşiminde artışa neden olup olmayacağına yönelik biyoinformatik tahminleme yapıldığında bu varyasyonların büyük oranda ligand ile etkileşimi arttıracak ve normal olmayan sinyalleşmeyi tetikleyebileceği önerilmektedir.

Reseptör bağlanma domainlerinin arasında bulunan Furin benzeri sisteinden zengin bölgeyi kodlayan ekzon 4 – 8'i içeren dizi üzerinde patojenik ya da olası patojenik özelliğe sahip yeni varyantlar belirlenmiştir. Bu varyasyonlar arasında iki olguda belirlenen klinik anlamı bilinen patojenik E330K dönüşümünün kanserli olgularda yüksek oranda görüldüğü bilinmektedir (Mack vd., 2020). Ekzon 6 üzerinde patojenik Q217Pfs*14 (6/30), G221Efs*10 (11/30), G225Afs*55 (6/30), H233Tfs*47 (8/30), olası patojenik C219R (11/30); ekzon 8 üzerinde patojenik C311Vfs*30 (12/30) ve M318Rfs*23 (5/30) mutasyonları belirlenmiştir. Bu bölgenin reseptörün inaktif halinde IV. domain ile aktif halinde ise diğer reseptörle (*EGFR* ya da *ERBB2*) etkileşim kurduğu bilindiğinden, bölgedeki mutasyonların genin aktivasyonunu arttırarak anormal sinyal iletimine neden olabileceği düşünülebilecektir (Orellana vd., 2019). Ancak bu bölgede belirlenen varyasyonlar biyoinformatik araçla değerlendirildiğinde, *EGFR* ve *ERBB2* ile etkileşiminde değişiklik olmayacağı önerilmiştir. Sonuç olarak yeni tanımlanan varyasyonların ligand-ligand dimerizasyonu mekanizması yoluyla hastalık ile ilişkili sürücü bir görev alamayabileceğini önermekteyiz.

Takip eden bölge, proteinin büyüme faktör reseptör domainini (IV. domain) kodlayan ekzonları (13 – 16) içermektedir. Bu bölgenin, II. domain ile etkileşim kurarak reseptörü inaktif formda tuttuğu, reseptör-ligand etkileşimini kontrol ettiği bilinmektedir (S. Lu vd., 2020). Ekzon 13'te belirlenen olası patojenik K538Efs*8 (7/30), L542Q (5/30), patojenik L542Hfs*4 (8/30), E543Rfs*25 (7/30); ekzon 15'te belirlenen olası patojenik Q581Sfs*7 (5/30) varyasyonlarının onkogenik dönüşümde rol oynama potansiyeli yüksek olmakla birlikte bu varyasyonlar, biyoinformatik araç ile değerlendirildiğinde *EGFR*'nin kendi ile etkileşiminde herhangi bir değişikliğe neden olmayacağı öngörülmüştür. Bu varyasyonların doğrudan *EGFR*'nin kendi üzerine katlanmasında değişiklik oluşturmayabileceğini, dolayısıyla sürücü değil yolcu mutasyonlar olabileceğini düşünmekteyiz.

Transmembran bölgeyi kodlayan dizide patojenite ile ilişkilendirilmiş herhangi bir varyant tespit edilmemiş; takip eden katalitik domainde ise patojenik varyantların yoğunlaştığı belirlenmiştir. Ekzon 18'de belirlenen olası patojenik V689G (7/30) ve P691L (15/30) yanlış

anlamli mutasyonlari katalitik bolgede yer almaktadir ve bu varyantlar literatürde ilk defa tanimlanmis olmakla birlikte ayni bolgedekimutasyonlar patojenite ile iliskilendirilmistir (Zheng vd., 2020).C-heliks bolgesinin önünde yer alan dizideki mutasyonlar, özellikle delesyonlar, C-heliksin yukari hareketine neden olduğu için kanser gelişiminde dikkat çekmektedir (Vyse ve Huang, 2019). Olgularda C-heliks ve C-heliksin ön bölgesini kodlayan bölgelerde (ekzon 19 ve 20; 766. aa kadar olan bölge) farklı yanlış anlamli mutasyonlar bulunmakla birlikte herhangi bir delesyon belirlenememiştir. C-heliksi takip eden lup bölgesinde 773. pozisyonadaki histidinin lösine dönüşümüne neden olan (p.H773L) patojenik c.2318A>T nokta mutasyonu (11/30) daha önce klinik olarak tanimlanmiştir. Bu bölgenin kritik önemi özellikle insersiyon ya da duplikasyon yoluyla meydana gelen mutasyonların, aktif tirozin kinaz bölgesini kapalı pozisyonda tutan C-heliksin konfigürasyonel olarak kinaz aktivitesinin sürekliliğini sağlayacak değişime neden olmasıdır(Vyse ve Huang, 2019). Yenitanımlananvaryasyonlar biyoinformatik olarak değerlendirildiğinde ise bu bölgede yoğun olarak belirlenen yanlış anlamli mutasyonların kinaz aktivitesini arttıracak tahmin edilmektedir.Literatürde inverted ve onkositik papillom kökenli sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu olguları içeren çalışmalarda, C-heliksi takip eden lupu kodlayan dizide farklı varyasyonlar (E746_A750>QP, Q746_S752delinsT, Q746_T751delinsI, D770_N771insG, D770_N771insGD, D770insGL, D770insSVE, D770insGF, N771insV, N771delinsGY, H773_V774insH, H773_V774insNPH insersiyonları ve S768_D770dup, N771_H773dup duplikasyonları) belirlemekle birlikte bu varyasyonlar benign papillom dokularında da belirlenmiştir. Genel olarak onkositik papillom kökenli olgularda *EGFR* alterasyonu belirlenmemiş olmakla birlikte, Sahnane ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada bir olguda D770_N771insG mutasyonu belirlenmiştir(Brown vd., 2020; Cabal vd., 2020; Maisch vd., 2020; Sahnane vd., 2019; Aaron M. Udager vd., 2015). D770_N771insSVD inverted papillom kökenli sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu olguda belirlenmekle birlikte benign papillom dokusunda belirlenmemiştir(Sahnane vd., 2019). Böylece bu bölgedeki varyasyonların malign dönüşümde rol oynayabileceği önerilebilecektir. Maksiller sinüsün *de novo* skuamöz hücreli karsinomunu içeren bir çalışmada ise iki olgudan birinde ayni pozisyonadaki aminoasit değişimini içeren N771YinsG mutasyonu belirlenmiş ve bu mutasyon *EGFR*'nin anormal aktivasyonu ile iliskilendirilmiştir(Willmore-Payne vd., 2006).Katalitik bölgede belirlenen varyantlar arasında bulunan 801. pozisyonadaki tirozinin stop kodonuna dönüşümü (Y801T*) sonucu anlamsız nokta mutasyonuna neden olan patojenik c.2402dupA duplikasyonu 30 olgunun 28'inde (%93,33) belirlenmiştir. Bu mutasyon tirozin kinaz domaini

içeren ancak otofosforilasyon bölgesi içermeyen protein oluşumuna sebep olacaktır. Bununla birlikte literatürde daha önce bu mutasyon tanımlanmadığından oluşan proteinin üç boyutlu yapısı, kinaz aktivitesi ya da onkojenik dönüşümdeki potansiyeli ile ilgili çıkarımda bulunulamamaktadır. Ancak benzer şekilde *EGFR* ekzon 20’de tanımlanmış olan anlamsız bir nokta mutasyonu akciğer kanseri hastalarında tirozin kinaz inhibitörlerine direnç gelişimi ile ilişkilendirilmiştir(González Manzano vd., 2008). Benzer şekilde belirlenen patojenik Q812* (5/30) mutasyonu da stop kodonu oluşturarak anormal bir protein üretimine neden olacaktır. Aynı ekzonun 799. pozisyonundaki lösinin proline dönüşümüne (L799P) neden olan olası patojenik yanlış anlamlı c.2396T>C mutasyonu 27 olguda (%90) belirlenmiştir. Bu mutasyonun görülmediği 3 olgudan bir tanesinde ise yine aynı dönüşüme neden olan c.2396_2397delTGinsCA insersiyonu belirlenmiştir. Aynı bölgede olası patojenik Y813Sfs*13 (9/30) çerçeve kayması; V819E (12/30) ve L815H (5/30) yanlış anlamlı mutasyonları belirlenmiştir. Sinonazal skuamöz hücreli karsinom olgularına ait *EGFR* mutasyonları değerlendirildiğinde bu mutasyonların ekzon 19 ve 20’de birikim gösterdiği bilindiğinden, belirlenen mutasyonların bu bölgede yoğunlaşması literatür ile uyumlu görünmektedir(Hongo vd., 2021). *De novo* sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu olguların %5’inde, inverted papillom kökenli sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu olguların ise %50’sinde *EGFR* ekzon 20 mutasyonları bulunmaktadır(Cabal vd., 2020). Ekzon 21’de olgularda belirlenen patojenik varyasyonlar arasında beş olguda ortak olarak görülen M825Rfs*21 çerçeve kayması önemlidir. Bu bölge C-heliks ve C-heliksi takip eden lupun kontrolünde etkili olma potansiyeli bulunan bir bölge olduğundan daha önce tanımlanmamış bu varyantların klinik potansiyelleri üzerinde durulması önemlidir(Brown vd., 2020). Çalışmamızda A-lup bölgesinde herhangi bir patojenik ya da olası patojenik varyasyon belirlenmemiştir. Ancak bu bölgenin önünde yer alan bölgeyi kodlayan dizide meydana gelen patojenik M825Rfs*21 çerçeve kaymasının (5/30) kinaz aktivasyonunu etkileme olasılığı bulunmaktadır. Ayrıca biyoinformatik araçlarla tahmin yapıldığında, dizi üzerindeki varyasyonların ATP bağlanma bölgesini etkileyebileceği de belirlenmiştir(Grafik 39). Ekzon23’te belirlenen olası patojenik P936S (10/30), M945R (8/30) ve M947K (5/30) yanlış anlamlı mutasyonları ve ekzon 25’te belirlenen patojenik T993Qfs*9 (5/30) çerçeve kayması daha önce tanımlanmamış olmakla birlikte katalitik bölgeyi düzenlemesi açısından önemli olabileceğinden ileri çalışmalarla araştırılması önerilmektedir.

ERBB2

Paranasal skuamöz hücreli karsinomlu olgu grubunda mutasyon profili belirlenen epidermalbüyüme faktörü alt ailesi üyelerinden ikincisi olan *ERBB2* geninin paranasal skuamöz hücreli karsinom dokularındaki araştırmaları değerlendirildiğinde, immünohistokimyasal boyama yöntemi ile inverted papillom kökenli ve *de novo* olgularda *ERBB2* ifadesinin arttığı belirlenmiştir (Hongbing Li vd., 2019; Jing Li vd., 2007; López, Llorente, vd., 2012). *ERBB2* baş ve boyun kanserlerini de içeren geni pek çok farklı kanser tipi ile ilişkilendirilmiştir (Birkeland vd., 2016). Bununla birlikte paranasal skuamöz hücreli karsinomlarda bu genin mutasyon durumunu içeren herhangi bir çalışma bulunamamaktadır. Bu nedenle bu gene ilişkin bulgularımız özgün niteliktedir.

ERBB2 geninde 30 olguda toplam 7.347 adet (2.516 adet eşsiz) varyasyon belirlenmiştir. Bunların 143 (%1,95) tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, daha önce tanımlanmamış olan 7.204 (%98,05) adet yeni varyant belirlenmiştir. Klinik anlamı bilinen varyantlardan 136 tanesi ekzon, 6 tanesi intron bölgesinde bulunmaktadır. Ekzon bölgelerinde bulunanlar ekzon 2 – 6 ve 11-27 arasında dağılım göstermektedir. Daha önce tanımlanmamış olan varyantlardan ise 102 tanesi 3'UTR, 12 tanesi 5'UTR, 4.322 tanesi intron ve 2.768 tanesi ekzon bölgesinde yer almaktadır. Olguların tümünde en az bir tane *ERBB2* mutasyonu, 29 tanesinde ise en az bir adet patojenik ya da olası patojenik *ERBB2* mutasyonu bulunmaktadır.

Belirlenen varyantlar arasında ekzon bölgesinde bulunan 2.904 varyanttan 1.014 tanesi patojenik ya da olası patojenik özelliktedir. Bu grupta 398 adet benzersiz varyant tanımlanmıştır ve literatürde daha önce tanımlanmamış olan 395 tane patojenik ya da olası patojenik yeni varyasyon belirlenmiştir. Klinik anlamı bilinen patojenik varyantlar ekzon 20–22 bölgesinde bulunmakla birlikte, daha önce tanımlanmamış varyantlar ise tüm ekzon bölgelerinde bulunmaktadır.

Sinyal peptidi kodlayan ekzon 1'de daha önce tanımlanmamış altı adet patojenik ya da olası patojenik varyant belirlenmiş, bu varyasyonlar üç olguda başlangıç kaybı etkisine neden olmuştur. Bu varyasyonlar olgular arasında ortaklık göstermediğinden hastalığın sürücü mutasyonları arasında olmadığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Reseptör-L-domain I'i kodlayan dizilerde (ekzon 2 – 4) yoğun olarak çerçeve kayması mutasyonları olduğu dikkat çekmektedir. Ekzon 2'de P66Tfs*44 (8/30) çerçeve kaymasına neden olan patojenik insersiyon ve N68Cfs*41 (7/30) çerçeve kaymasına neden olan patojenik delesyon belirlenmiştir. Ekzon 3'te patojenik Q78Sfs*32 (9/30) çerçeve kaymasına neden

olan insersiyon, patojenik Q78Lfs*32 (19/30) çerçeve kaymasına neden olan delesyon-insersiyonu ve patojenik Q78L (16/30) yanlış anlamalı mutasyonu belirlenmiştir. Bu bölgede belirlenen varyasyonların ortak noktası 78. pozisyonadaki glutamin aminoasidinin değişimidir ve 26 olguda en az bir adet Q78X değişimi belirlenmiştir. Ekzon 4'te de daha önce tanımlanmamış olan patojenik D171Tfs*13 (25/30) çerçeve kaymasına neden olan delesyon, patojenik I172Tfs*29 (25/30) çerçeve kaymasına neden olan insersiyon belirlenmiştir. Reseptör-L-domain III'ü kodlayan dizilere (ekzon 9–12) genel olarak bakıldığında bu bölgede de yoğun şekilde çerçeve kayması mutasyonlarının varlığı dikkat çekmektedir. Ekzon 9'da patojenik S358Mfs*73(7/30), ekzon 10'da patojenik N388Tfs*43 (10/30) ve ekzon 12'de patojenik R459Gfs*97 (5/30) çerçeve kayması mutasyonları olgularda ortak şekilde belirlenmiştir. Daha önce belirtildiği gibi *ERBB2*'nin ligand ile bağlanma özelliği yoktur. Reseptör-L-domain I ve III, sinyal iletimi sırasında birbirleri ile hidrojen bağı ya da hidrofobik etkileşimler kurarak *ERBB2*'nin konfigürasyonel değişimini ve dimer oluşturmada görevli furin benzeri sisteinden zengin bölgenin (II) ulaşılabilir pozisyonda durmasını sağlamaktadır(S. Hu vd., 2015). Bu diziye kodlayan bölgelerde meydana gelen yoğun çerçeve kayması mutasyonları ve 78. pozisyonadaki glutaminin değişimine neden olan varyasyonların *ERBB2*'nin aile üyesi diğer reseptörler ile dimer oluşumunda anormaliteye yol açarak sinyal yolağının anormal aktivasyonuna sebep olabileceği öngörüsü ile bu bölgede fazlasıyla olguda ortak şekilde meydana gelen varyasyonların, proteinin katlanma özelliği üzerine oluşturabileceği etkinlik değerlendirildiğinde, olguların çoğunda proteinin kendi üzerine katlanma etkinliğinin artacağı tahmin edilmektedir. Bu durum proteinin dimer oluşturmada görevli II. domaininin erişilebilirliğini arttıracığından aktivasyonuna katkı sunabileceği ve hastalığın sürücü özelliklerinden biri olduğu söylenebilecektir. Ancak literatürde bu bilgiye ilişkin herhangi bir veri bulunmamaktadır. Elde edilen sonuçların ileri çalışmalar ile irdelenmesi ile daha kesin sonuçların alınacağı önerilmektedir.

Reseptör-L-domainleri arasında yer alan furin benzeri sisteinden zengin bölge II'yikodlayan dizilerde (ekzon 5 – 8) sıklıkla çerçeve kayması mutasyonlarının varlığı dikkat çekmektedir. Ekzon 5'te olası patojenik C192F (7/30); ekzon 6'da patojenik R217Lfs*18 (8/30), C224Wfs*11 (20/30), K228Rfs*69 (19/30), T233Mfs*64 (7/30), H237Rfs*2 (5/30);ekzon 7'de patojenik V272Sfs*25 (8/30), Y274Sfs*23 (5/30) mutasyonları ortak olarak tanımlanmıştır. Domain IV'ü kodlayan dizilerde de (ekzon 12 – 15), çerçeve kayması mutasyonları bulunmaktadır.Ekzon 12'de olası patojenik R459Gfs*97 (5/30); ekzon 13'te patojenik C511* (5/30), R517* (5/30), T526Pfs*30 (8/30); ekzon 15'te patojenik P594Lfs*14

(15/30) mutasyonları belirlenmiştir. Furin benzeri sisteinden zengin bölge II, aktif yapıda yani homo- ya da hetero-dimer oluşturan *ERBB2*'nin, diğer reseptör ile etkileşime girdiği bölgedir. Aynı şekilde, inaktif yapıda yani “tethered” pozisyonundaki *ERBB2*'de de bu bölge, molekülün kararlı halde durmasını sağlayacak şekilde kendi domain IV'ü ile etkileşim halindedir (S. Hu vd., 2015). Olgularda yüksek oranda belirlenen II. ve IV. domainleri kodlayan dizilerdeki çerçeve kayması mutasyonlarının, *ERBB2*'nin inaktif durumdaki kararlı pozisyonu ile aktif durumdaki pozisyonu arasındaki dengenin bozulmasına yol açabileceği öngörülebilmektedir. Biyoinformatik olarak tahminde bulunulduğunda ise her iki bölgede mutasyon taşıyan olgularda ve sadece II. domainde mutasyon taşıyan olgularda, proteinin kendi üzerine katlanmasının artarak aktivasyonun azalacağı öngörülmüş olmakla birlikte; protein-protein bağlanma afinitesinin reseptör homodimerizasyonunda ve *EGFR*'nin olmamakla birlikte *ERBB3* ile heterodimerizasyonunda artışa neden olabileceği görülmektedir. Otuz olgunun 23'ünde belirlenen bu durumun onkojenite ile ilişkisi olabileceği ilk etapta düşünülse bile çerçeve kayması sonucunda katalitik bir kinaz aktivitesine sahip olmayan *ERBB2*'nin, halihazırda katalitik alt birime sahip olmayan *ERBB3* ile bu şekilde güçlü bir heterodimer oluşturmalarının doğrudan kanserde sürücü rol oynamayacağını önermekteyiz.

Transmembran domainde (ekzon 16 – 17), olası patojenik L663M (8/30) yanlış anlamlı mutasyonu olgularda ortak olarak belirlenmiştir (Grafik 41). Bu bölge, katalitik ya da diğer reseptörlerle etkileşim aktivitesine sahip olmamakla birlikte mutasyonların dimer oluşturma bölgesi ve katalitik bölge üzerindeki aktive edici mutasyonların etkisini güçlendirebileceği önerilmiştir (Pahuja vd., 2018).

Katalitik aktiviteye sahip bölge doğrudan aktive edici mutasyonlarla ve proteinin aşırı aktivitesi ile ilişkilendirildiğinden “hotspot” bölge olarak tanımlanmaktadır (Wen vd., 2015). Katalitik bölgenin ilk bölümündeki ATP bağlanma bölgesinde (ekzon 18 – 21), ekzon 18 üzerinde ATP'nin bağlanmasını düzenleyen N-lup bölgesini kodlayan dizide olası patojenik F731L (5/30) yanlış anlamlı mutasyonu meydana gelmiştir. Bu değişim nükleotit bağlanma bölgesinin aminoasit dizilimini GSGAFG diziliminden GSGALG dizilimine dönüştürmüştür. Mutant dizilimde ATP ile etkileşime giren bölgedeki değişimin, proteinin ATP ile bağlanma özelliğini değiştirebileceği ve onkojenik süreçte rol oynayabileceği tahmin edilmektedir (Grafik 43). Ancak çok sayıda olguda ortak olarak belirlenmediğinden kanserin sürücü mekanizmaları arasında yer aldığını düşünmemekteyiz.

C-heliksi kodlayan dizide olası patojenik V750E (12/30) ve P761S (8/30) yanlış anlamlı mutasyonları belirlenmiştir. Bu bölgenin başka bir molekülle doğrudan etkileşime girmediği düşünüldüğünden, olgularda belirlenen bu yeni varyantların patojenite ile ilişkisi olabileceği öngörülmemektedir. Bununla birlikte C-heliksın ön bölgesinde yer alan rezidüleri içeren E744Gfs*3 (6/30) çerçeve kayması, mekanik olarak kontrol edilen C-heliksın regülasyonu açısından önemli bir etkiye yol açabilecektir (Telesco ve Radhakrishnan, 2009). C-heliks ve katalitik C-lup bölgeleri arasında (ekzon 20), olası patojenik L786X (8/30), K831Q (12/30), I829R (9/30) yanlış anlamlı ve L786Sfs*88 (6/30) çerçeve kayması mutasyonları belirlenmiştir. Yanlış anlamlı mutasyonların rezidüler arasındaki etkileşimi değiştirme olasılığı olmakla birlikte bu bölgedeki çerçeve kaymasının C-heliksın pozisyon değişimini (“helix-in” ve “helix-out”) doğrudan etkileyeceği bilinmektedir. Bu nedenle işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte bu bölgede belirlediğimiz yeni mutasyonlar önemlidir. C-lup bölgesini kodlayan dizide, olası patojenik R849W (8/30) yanlış anlamlı mutasyonu belirlenmiştir. Wen ve arkadaşları tarafından bu dizinin ATP’den fosforil transferini katalizlemede görev aldığı ileri sürülmüştür (Wen vd., 2015). Bu dizide değişikliğe neden olma potansiyeli taşıyan bu mutasyonun patojenik potansiyel taşıdığını öngörmekteyiz.

Kinaz aktivitesi için temel konfigürasyonel değişiklikleri sağlayan A-lup bölgesinde (ekzon 21); olası patojenik T875P (20/30), E876A (13/30) yanlış anlamlı; patojenik Y877S (2/30), Y877Sfs*34 (5/30), H878Qfs*33 (5/30) çerçeve kayması mutasyonları belirlenmiştir. Bu bölge (863 – 884. rezidüler), substratın C-lupa erişilebilirliğini düzenleyerek kinazın aktivasyonunu kontrol ettiğinden (Telesco ve Radhakrishnan, 2009), bu bölgenin merkezindeki dört rezidüde (875 – 878) meydana gelen mutasyonlar kritik önem taşıyabilecek olup kanserlerdeki rolü araştırılmalıdır. Takip eden bölgede olası patojenik V912G (6/30), K921T (6/30), E936G (11/30), K957R (7/30), V987E (5/30) yanlış anlamlı ve patojenik R981Gfs*79 (7/30), M955Hfs*8 (12/30), V956Gfs*7 (7/30) çerçeve kayması mutasyonları belirlenmiştir. Tüm katalitik bölgeyi kodlayan dizilerde belirlenen varyasyonlar değerlendirildiğinde olguların neredeyse tamamında (29/30) kinaz bölgesini aktive edici en az bir adet mutasyon olduğu tahmin edilmiştir. Buradan yola çıkarak *ERBB2* geninin kinaz bölgesinin aktivasyonunun bu hastalık için sürücü rol oynayabileceğini önermekteyiz.

ERBB2 geninde otoregülasyon hedefi olan tirozin rezidülerini (ekzon 25 – 27) içeren sadece iki mutasyon [Y1196S (1/30), Y1248Sfs*28 (1/30)] belirlenmiştir. Doğrudan tirozinleri içermemekle birlikte patojenik T1103Hfs*29 (13/30), Q1206Sfs*96 (14/30), R1072Qfs*16

(9/30) ve L1249Pfs*28 (7/30) çerçeve kayması mutasyonlarının da tirozin rezüdüğü paternini değıştirerek patojenik sinyal iletimi oluşturma ihtimali bulunmaktadır.

ERBB2 geninin 3'UTR'sini kodlayan dizide 26 olguda toplam 102 adet (31 adet eşsiz) varyasyon belirlenmiştir. Bu varyasyonların, miRNA'ların bağlandığı valide diziler ile karşılaştırılması sonucunda olguların 23 tanesinde en az bir miRNA'nın bağlanma dizisinin ortadan kalkacağı belirlenmiştir. Bunlar arasında özellikle miR-125a, miR-125b, miR-205-5p ve miR-3622b-5p miRNA'ları *ERBB2* geninin negatif regülatörü olduğu valide edilmiş miRNA'lardır ve hem kanser gelişimi hem de tedavi direnci ile ilişkilendirilmiştir(De Cola vd., 2015; M. Lu vd., 2017; Scott vd., 2007). Olguların yaklaşık üçte birlik bölümünde belirlenen bu varyasyonların, miRNA'lar aracılığıyla gerçekteşen post-transkripsiyonel regüasyonu değıştirerek, *ERBB2* ilişkili sinyal aktivasyonunda rol oynayacağını öngörmekteyiz. Bu açıdan paranazal skuamöz hücreli karsinomunda daha önce üzerinde durulmayan *ERBB2* geninin hem artmış kinaz aktivitesi ile genetik; hem de bozulmuş miRNA regüasyonu ile epigenetik mekanizmalarla bu hastalığın temel sürücü genlerinin arasında ilk sıralarda yer aldığını önermekteyiz.

Klinik anlamı bilinen patojenik mutasyon taşıyan olgularda medyan sağ kalım taşımayanlara göre 30 ay daha kısa olması nedeniyle bu mutasyonların prognostik önemi olabileceğini öngörmekteyiz. Bununla birlikte sadece bir olguda yeni tanımlanan mutasyon bulunmadığından sağ kalım analizinin sonucunda elde edilen düşük medyan sağ kalımın gerçekte yansıtmadığını düşünmekteyiz.

ERBB3

Paranazal skuamöz hücreli karsinomlu olgu grubunda mutasyon profili belirlenen **epidermal büyüme faktörü** alt ailesi üyelerinden üçüncü ve sonuncusu olan ***ERBB3***'ün ifade seviyesi ve bazı mutasyonları baş ve boyun kanserlerini de içeren farklı maligniteler ile ilişkilendirilmiş (Alvarado vd., 2017; Kiavue vd., 2020) olmakla birlikte günümüze kadar paranazal kanserlerde bu genin ya da proteinin ifade düzeyini veya mutasyon durumunu araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

ERBB3 geninde 30 olguda toplam 1.193 adet varyasyon belirlenmiştir. Tüm varyantların iki (%0,17) tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, daha önce tanımlanmamış olan 1.191

(%99,83) adet yeni varyant belirlenmiştir. Klinik anlamı bilinen varyantlar ekzon 7’de bulunmaktadır, patojenite ile ilişkilendirilmemiştir.

KIT

Paranasal sinüs skuamöz hücreli karsinom olgu grubunda mutasyonları araştırılan reseptör tirozin kinaz ailesine üye diğer genler, **platelet kökenli büyüme faktörü reseptörlerinden *KIT* ve *PDGFRA***’dır.

KIT geninin paranasal skuamöz hücreli karsinomlu olgularda ekspresyon düzeyi ile ilişkili herhangi bir veri bulunmamakla birlikte çalışmamızda altı olguda bu genin amplifikasyonu belirlenmiştir. Amplifikasyon bu genin onkojenik mekanizmalarından birisini oluşturmaktadır ve genin aşırı aktivasyonuna neden olduğundan farklı kanser tipleri ile ilişkilendirilmiştir (Foster, Zaidi, Young, Mobley, ve Kerr, 2018; Pham vd., 2020; B. Yang, Yan, Liu, Jiang, ve Hou, 2017). Ancak literatürde rastlanan tek çalışmada beşadet inverted papillom kökenli sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu olgunun sadece birtanesinde *KIT* mutasyonu belirlenmiş, bu olgunun karsinoma dönüşmemiş papillom dokusunda da aynı genin mutasyonu tanımlanmıştır (Yasukawa vd., 2018). Bu mutasyonun hem papillom hem de karsinom dokusunda bulunması benign bir özelliğe işaret etmektedir.

Çalışmamızda *KIT* geninde 30 olguda toplam 2.247 adet (809 adet eşsiz) varyasyon belirlenmiştir. Bunların 245 (%10,9) tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, daha önce tanımlanmamış olan 2.002 (%89,1) adet yeni varyant belirlenmiştir. Klinik anlamı bilinen varyantlardan 201 tanesi ekzon, 36 tanesi intron, iki tanesi ise kırılma bölgesinde bulunmaktadır.

Olgularda sinyal peptidini kodlayan ekzon 1’de herhangi bir varyasyon belirlenmemiştir. Ligand-reseptör etkileşimini sağlayan Ig-benzeri domainleri kodlayan dizilerden ekzon 2’de 20 olguda daha önce tanımlanmamış olan patojenik çerçeve kayması mutasyonları belirlenmiştir. Bunlardan R55Gfs*49 (3/30), W66Mfs*4 (10/30), L71Hfs*3 (4/30), Q79Rfs*25 (2/30) çerçeve kayması belirlenmiştir. Bu bölge *KIT*’in ligandı olan *KITLG* ile etkileşiminde görevli olduğundan (Yuzawa vd., 2007), meydana gelen çerçeve kayması mutasyonlarının ligand-reseptör etkileşimini bozarak hatalı aktivasyon oluşmasına neden olabileceği öngörülmektedir. Bu öngörüğü değerlendirebilmek amacıyla, bölgede belirlenen varyasyonların, proteinin *KITLG* ile etkileşimi tahmin edildiğinde; ligand-reseptör bağlanma

afinitesinde azalışa yol açabileceği belirlendiğinden bu durumun aktivasyonda artışa neden olmayacağını düşünmekteyiz. Aktivasyona bağlı olarak sinyal iletiminin gerçekleşmesi için reseptör-ligand etkileşiminin ardından reseptör-reseptör homodimeri oluşturma bölgesindeki aminoasitlerin hidrofilik etkileşimleri gerçekleşmektedir (Yuzawa vd., 2007). Bu bölgeyi kodlayan dizilerde T411R (22/30) ve V474A (7/30) yanlış anlamlı, P413Qfs*4 (23/30) çerçeve kayması mutasyonları belirlenmiştir. Olgularda belirlenen bu mutasyonların hastalığın gelişimi için kritik bir aktivasyona neden olabileceği öngörülerek değerlendirildiğinde bu varyasyonların, yabani tipteki *KIT* reseptörü ile etkileşimde belirgin bir değişime neden olmayacağı belirlenmiştir. Sonuç olarak *KIT* geninin ekstraselüler alanı kodlayan dizilerdeki mutasyonların hastalığın sürücü mutasyonları arasında yer almayacağını önermekteyiz.

KIT'in kanserler ile ilişkili olduğu birincil mekanizma, kinaz aktivitesinin artmasına neden olan fonksiyon kazanım mutasyonlarıdır (J. Liang vd., 2013). Bu bağlamda olgularda tirozin kinaz domainini kodlayan bölgede belirlenen varyasyonların fonksiyon kazanımı aracılığıyla hastalık patogenezinde rol oynayabileceği düşünüldükçe gerçekleştirilen tahminlerde, olguların büyük bölümündeki (25/30) varyasyonların kinaz bölgesini aktive etme potansiyeli bulunduğu belirlenmiştir. Bu nedenle bu bölgedeki varyasyonların hastalığın sürücü mutasyonları arasında yer alabileceğini önermekteyiz. Ek olarak, sağ kalım analizinin mutasyon taşımayan olguların medyan sağ kalımında 16 aylık bir artışı işaret etmesi nedeniyle, bu genin önemli moleküler bir hedef olabileceğini önermekteyiz.

PDGFRA

PDGFRA geninin sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu olgulardaki mutasyon durumunu araştıran tek çalışmada, altı inverted papillom kökenli ve beş *de novo* sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu olgunun yaklaşık 1/3'lük bölümünde (4/11) bu genin mutasyonu belirlenmiştir (Yasukawa vd., 2018).

Otuz olguda toplam 2.111 adet (1.240 eşsiz) varyant belirlenmiştir. Bu varyantlar klinik anlamı bilinen 105 adet eşsiz varyant ve daha önce tanımlanmamış olan 1.135 adet eşsiz varyantı içermektedir. Bu varyantlardan 425 tanesi ekzon bölgelerinde bulunmaktadır. Ekzon bölgelerinde belirlenen varyantları, genin kodladığı proteinin fonksiyonel birimleri açısından değerlendirdiğimizde, ekstraselüler alanda yer alan, hem reseptör-ligand hem de dimerizasyonda görevli Ig-benzeri domaini kodlayan dizide (23. – 526. aa; ekzon 3 – 10) 26

olguda 38 eşsiz patojenik/ olası patojenik varyant belirlenmiştir (P. H. Chen, Chen, ve He, 2013). Bu varyantların tümü ilk defa tanımlandığından, belirlenen varyantların, genin kodladığı proteinin ligand ve reseptörler ile etkileşimleri üzerindeki potansiyel etkisi biyoinformatik araçlarla tahmin edilerek değerlendirildiğinde, analizedilen parametrelerin çoğunda bağlanma özelliğinin kesin olmasa da arttığı gösterilmiştir. Ligand-reseptör bağlanması ve reseptör-reseptör etkileşimi hücre dışından içine onkogenik sinyal iletiminin ilk basamağını oluşturduğundan normal olmayan sinyal iletimini başlatan bu tip etkileşimleri kanserler ile ilişkilendirilmiştir (McDermott vd., 2009). Özellikle 21 olguda belirlenen K312Rfs*5 çerçeve kayması mutasyonu hem dimerizasyonu hem de her iki ligandla bağlanmayı artırma potansiyeli ile normal olmayan sinyalizasyon aracılığıyla kanser gelişiminde rolü olabileceğini önermekteyiz.

Olgularda diğer bir mutasyon yığılmasının, genin kodladığı proteinin tirozin kinaz aktivitesini sağlayan katatlitik domaininde (593. – 945. aa) meydana geldiği görülmektedir (*Grafik 65*). Olguların tümünde bu bölgede en az bir patojenik ya da olası patojenik varyant belirlenmiştir. Bu varyantlardan daha önce farklı kanserler ile ilişkilendirilmiş patojenik R841K (3/30) ve D842V (4/30) varyantları bulunmaktadır (Heinrich vd., 2003). Az sayıda olguda belirlenen bu mutasyonların aktive edici olduğu tahmin edilmiştir. Kinaz bölgesinde aktive edici mutasyon taşımayan olguların medyan sağ kalımı taşıyanlara göre 59 ay artmış olması, bu bölgenin tedavi hedefi olarak önemli olabileceğini ve kötü prognostik bir belirteç olabileceğini göstermektedir. Yeni tanımlanan D591Efs*3 mutasyonu taşıyan 12 olgudaki çerçeve kayması mutasyonu, ATP bağlanma bölgesinin tamamen ortadan kalkmasına neden olacaktır. Bu durum ATP ile yarışan inhibitörleri etkisizleştirmesi açısından kötü prognozla ilişkilendirilebilecektir (Hantschel, Grebien, ve Superti-Furga, 2012). Bununla birlikte genel olarak bakıldığında çerçeve kaymasına bağlı olarak proteinin kısalmasına bağlı olarak fonksiyon kaybı söz konusudur. Bu durum belirlenen varyasyonların hastalığın sürücü mutasyonları arasında değil, yolcu mutasyonlar arasında bulunduğunu düşünmemize sebep olmuştur.

MET

Bir diğer reseptör tirozin kinaz olan *MET* geninin sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu olgularda araştırılmasını içeren tek çalışmada, 19 olgudan dört tanesinde *MET* ekspresyonu immünohistokimya yöntemi ile gösterilmiş, bu ekspresyon lenf nodu tutulumu ile

ilişkilendirilmiş(Choe vd., 2012), mutasyon durumunu içeren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Otuz olguda *MET* geninde toplam 113 adet (64 adet eşsiz) varyant belirlenmiştir (*Grafik 3 ve 4*). Ekzon bölgelerinde belirlenen 27 eşsiz varyanttan 27 tanesinin klinik anlamı bilinmemektedir. Çalışmamızda az sayıda olguda patojenik ya da olası patojenik varyasyon belirlenmesi nedeniyle, bu genin hastalığın sürücüler arasında yer almayabileceğini ancak bu bölgede mutasyon taşıyan olguların kinaz bölgesinin hedeflenmesiyle kişiye yönelik tedavi seçeneği oluşturabileceğini önermekteyiz.

ALK

*ALK*reseptör tirozin kinazının paranazal (ya da sinonazal) skuamöz hücreli karsinom ile ilişkilendirildiği herhangi bir ekspresyon ya da mutasyon çalışması bulunmamaktadır.

ALK geninde 30 olguda toplam 2.008 adet varyasyon belirlenmiştir. Bunların 403 (%20,1) tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, daha önce tanımlanmamış olan 1.605 (%79,9) adet yeni varyant belirlenmiştir. Bu varyantlar ekzon 5, 8, 15, 18 – 25 ve 29 bölgelerinde dağılım göstermektedir. Çalışma kapsamında bulunan olgularda belirlenen *ALK* varyasyonları arasında daha önce patolojik olarak tanımlanmış tek varyasyon 1151. kodondaki treoninin metionine dönüştüğü (p.T1151M) nokta mutasyonudur. Bu varyasyon sadece bir hastada bulunmaktadır. Kinaz bölgesinin aşırı aktivasyonuna neden olan bu dönüşüm nöroblastom gelişimi ile ilişkilendirilmiştir(George vd., 2008). Ayrıca bu mutasyonun akciğer kanserinde ilaç (crizotinib) direncine neden olduğu bildirilmiştir(V. W. Zhu vd., 2018). Bununla birlikte yine aynı olguda belirlenen olası patojenik L1240V ve farklı olgularda belirlenen olası patojenik D1249N ve I1461V nokta mutasyonları akciğer kanseri ve hepatoselüler kanser gelişiminde aday olarak belirlenmiştir(Betge vd., 2015; Mansour, Ouhajjou, Bajic, ve Incitti, 2020). Bu genin kötü prognozla ilişkili olabileceği ve *ALK*'nin kinaz bölgesinin tedavi hedefi olabileceğini önermekteyiz. Bu dört varyant dışında kalan tüm varyantlar klinik olarak patojenik özelliği belirgin olmayan, benign ya da olası benign olarak tanımlanmıştır.

RET

Bir diğer reseptör tirozin kinaz olan *RET*geninde toplam 1.387 (474 eşsiz) adet varyant belirlenmiştir. Bunların 172 tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, 1.215 tane yeni varyant tanımlanmıştır. Tüm olgularda en az bir adet patojenik ya da olası patojenik özellikte

RET varyasyonu belirlenmiştir. Bu geni paranazal skuamöz hücreli karsinomlu olgularda araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca COSMICv92 veri tabanında da bu kanser grubunda *RET* geni ile ilişkilendirilmiş herhangi bir varyasyon bulunmamaktadır. Bu nedenle *RET* ilişkili olarak belirlenen tüm varyasyonlar bu hastalık için özgün bulgulardır.

GNA11* ve *GNAQ

Hücre dışından içine sinyal transdüksiyonunda görev alan bir protein grubunu kodlayan ***GNA11***ve ***GNAQ*** genlerinin mutasyon profili incelenmiştir.

GNA11 mutasyonlarını bu kanserde araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. *De novo* ve inverted papillom kökenli skuamöz hücreli karsinomlu olguları içeren bir çalışmada tüm olguların yaklaşık %27'sinde (3/11) *GNAQ* geninin mutasyonlarına rastlanmıştır ancak değerlendirildiğinde bu mutasyonların intron 5 üzerinde bulunduğu belirlenmiştir[Hg19, 80343587 G>X; VarSome veritabanı; (Yasukawa vd., 2018)].

GNA11 geninde 30 olguda toplam 131 adet varyasyon belirlenmiştir. Yirmi yedi olguda en az bir tane *GNA11* mutasyonu, 23 tanesinde ise en az bir adet patojenik ya da olası patojenik *GNA11* mutasyonu bulunmaktadır. Tüm varyasyonların 15 (%11,45) tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, daha önce tanımlanmamış olan 116 (%88,55) adet yeni varyant belirlenmiştir. Ekzon bölgelerinde belirlenen tüm varyantlar ekzon 5'te bulunmaktadır bunlardan 59 tanesi patojenik ya da olası patojenik özelliktedir.

GNAQ geninde ise 30 olguda toplam 108 adet varyasyon belirlenmiştir. Tüm olgularda en az bir tane *GNAQ* mutasyonu, 26 tanesinde ise en az bir adet patojenik ya da olası patojenik *GNAQ* mutasyonu bulunmaktadır. Tüm varyasyonların 10 (%9,26) tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, daha önce tanımlanmamış olan 98 (%90,74) adet yeni varyant belirlenmiştir. Ekzon bölgesinde belirlenen varyantların tümü *GNA11* ile aynı şekilde ekzon 5'te belirlenmiştir. Ekzon bölgesinde bulunan 73 varyanttan 59 tanesi patojenik ya da olası patojenik özelliktedir.

İki genin patojenik ya da olası patojenik tüm varyasyonları, GTPaz aktivitesine sahip olan ve mutasyonları, proteinin sürekli olarak aktif kalmasına ve hücre içine onkojenik sinyal iletilmesine neden olan bölgede(Kamoto vd., 2017)belirlenmiştir. Bu genlerin kodladığı proteinlerin 216. aminoasitten itibaren sonlandırılmasına neden olacak p.W216* mutasyonu altı olguda belirlenmiştir.Benzer şekilde toplam 15 olguda proteinin GTPaz aktivitesini

engelleyecek şekilde farklı anlamsız ve çerçeve kayması mutasyonları belirlenmiştir. Bununla birlikte bu mutasyonlar ortaklık göstermemektedir. En yüksek ortaklık profili gösterenler ise *GNAQ* geninde belirlenen c.681G>A M227I (10/30), c.719T>A V240E (14/30), c.723G>C E241D (11/30); *GNA11* geninde belirlenen c.653A>T H218L (7/30), c.700G>A E234K (8/30) ve c.723G>C E241D (7/30) yanlış anlamlı mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar daha önce tanımlanmamış olmakla birlikte, aynı domainde yer alan yanlış anlamlı mutasyonların GTPaz aktivitesini bozarak onkojenik süreçte yer aldığı bilindiğinden (Maziarz vd., 2018), olgularımızın neredeyse tamamında görülen bu mekanizmanın hastalığın sürücü mekanizmaları arasında olmasa da onkojenik sürece katkı sunan bir mekanizma oluşturabileceğini önermekteyiz.

KRAS ve NRAS

Sinyal transdüksiyonunda reseptör tirozin kinazlarının aşağı-akışında yer alan *RAS* genlerinden ***KRAS*** ve ***NRAS***'ın mutasyon profili olgularımızda birlikte değerlendirilmiştir. Bu kanserde daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde; bir çalışmada onkositik papillom kökenli sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu beş olgunun birinde *KRAS* amplifikasyonu belirlenmiştir (Brown vd., 2020). Fakat mutasyon durumu açısından bakıldığında bu olgu grubunu içeren farklı çalışmalarda birbiriyle çelişen sonuçlar olduğu görülmektedir. Brown ve arkadaşları, onkositik papillom kökenli sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu beş olgunun tümünde *KRAS* mutasyonu belirlerken, inverted papillom kökenli 24 olgunun hiçbirinde *KRAS* mutasyonu belirlemedi (Brown vd., 2020). Benzer başka bir çalışmada yine onkositik papillom kökenli tek hastada *KRAS* mutasyonu belirlenmiş, inverted papillom kökenli dokuz olgunun hiçbirinde mutasyon belirlenememiştir (Maisch vd., 2020). Inverted ve *de novo* karsinomlu toplam 146 olguyu içeren çalışmada da *KRAS* mutasyonu bulunmamıştır (Hongo vd., 2021). Udager ve arkadaşları, onkositik papillom kökenli ve *de novo* olgularda *KRAS* mutasyon test ederken, inverted papillom kökenli olgularda ise etmemişlerdir (Aaron M. Udager vd., 2016). *De novo* olguların tümünde inverted papillom kökenli olguların yarısında *KRAS* mutasyonu belirleyen zıt bir çalışma da bulunmaktadır (Yasukawa vd., 2018). *NRAS* mutasyonları ise tek bir çalışmada araştırılmış ve *de novo* ve inverted papillom kökenli olguların yaklaşık yarısında belirlenmiştir (Yasukawa vd., 2018). Bu bilgiler ışığında *KRAS* mutasyonlarının onkositik papillomun malign transformasyonunda primer rol oynarken, *de novo* oluşumda ve papillom kökenli olguların transformasyonunda ise doğrudan bir rol oynayamayabileceği önerilebilecektir. Ancak,

Çalışmalarda değerlendirilen gen bölgeleri ve kullanılan yöntem değişkenliklerinin de sonuçlar arasında doğan farklardan sorumlu tutulabilecektir. COSMIC v92 veri tabanında sinonazal/paranazal skuamöz hücreli karsinomlu olgulara bakıldığında, toplam 189 olgunun *KRAS* geninin mutasyonları açısından değerlendirildiği (bu olgu grubunda en yüksek değerlendirme sayısına sahip gen), dört örnekte pozitiflik bulunduğu belirlenmiştir. *NRAS* geni ise dokuz olguda test edilmiş, iki örnekte pozitiflik belirlenmiştir (COSMIC, sinonazal skuamöz hücreli karsinom).

Çalışma kapsamında değerlendirilen olgularda *KRAS*'ı kodlayan dizilerde toplam 1.588 adet (520 adet eşsiz) varyant belirlenmiştir. Bunların 19 tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, 501 tane eşsiz yeni varyant tanımlanmiştir. Yirmisekiz olguda en az bir adet patojenik ya da olası patojenik özellikte *KRAS* varyasyonu belirlenmiştir. *NRAS*'ı kodlayan dizilerde ise daha az varyant tanımlanmiştir. Toplam 645 adet (270 adet eşsiz) varyant belirlenmiştir. Bunların 10 tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, 260 tane eşsiz yeni varyant tanımlanmiştir. On sekiz olguda en az bir adet patojenik ya da olası patojenik özellikte *NRAS* varyasyonu belirlenmiştir. *KRAS*'ın ekzon bölgelerinde toplam 406 adet (111 eşsiz) varyant, *NRAS*'ın ekzon bölgelerinde ise 57 adet (37 eşsiz) varyant belirlenmiştir. Varyasyonların genlerin kodladığı proteinin GTP ile bağlanması etkileyebileceği öngörüsünden yola çıkılarak varyasyonların olası etkisi biyoinformatik araçlarla tahmin edildiğinde, bu bölgedeki bazı varyasyonların GTP bağlama dizilerini değiştirdiği belirlenmiştir. Yirmibir olguda ortak varyant aracılığıyla bu etkinin tahmin edilmesi, literatürün aksine, *RAS* ailesinin özellikle *KRAS*'ın bu hastalıkta da önemli rolü olabileceğini vurgulamaktadır.

RAS'a ait fonksiyon kazanımlarının ana etki mekanizmalarından biri efektörler ile etkileşimin değişmesi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Özellikle 36., 37. ve 64. pozisyonlardaki I, E ve T aminoasitlerinin bu etkileşimde rolü olduğu gösterilmiştir (Nakhaeizadeh, Amin, Nakhaei-Rad, Dvorsky, ve Ahmadian, 2016). Bu nedenle varyasyonların genlerin kodladığı proteinin efektör proteinler ile bağlanmasını da etkileyebileceği ngrlmş, ancak çok sayıda efektör protein bulunduğundan sadece çalışma kapsamında araştırılan ve Ras bağlayan domaini içeren *PIK3CA* geni ile karşılaştırılmıştır. *PIK3CA* ile karşılaştırıldığında *KRAS* ve *NRAS* mutasyonlarının efektör bölgede yoğunlaşmadığı ve bu bölgedeki varyasyonların yabani tipteki *PIK3CA* ile etkileşimi değiştirmeyeceği grlmştir. Bununla birlikte hem *PIK3CA*'nın Ras bağlama domaininde hem de *RAS*'ların efektör bölgelerinde ortak mutasyonlar meydana geldiğinde bu etkileşimin azaldığı görülmektedir. *RAS* proteinlerinin

düzenleyicisi olan GEF'ler ile bağlanmasında görevli dizileri kodlayan bölgede belirlenen varyasyonlara bakıldığında *NRAS* için bu bölgede patojenik ya da olası patojenik varyant tanımlanmamıştır. *KRAS* için belirlenen varyantlar ise az sayıda olguda belirlenmiş (9/30) ve olgular arasında ortak bir varyasyon profili belirlenmemiştir. Literatürde daha önce üzerinde durulmayan *NRAS* mutasyonlarının da bu kanser için önemli bir hedef olabileceğini önermekteyiz.

BRAF

Ras proteinlerinin efektörlerinden Raf serin/treonin kinazları ailesi üyelerini kodlayan ***BRAF*** ve ***RAF1*** genlerinin varyasyonları çalışma kapsamında değerlendirilen genler arasında bulunmaktadır.

BRAF geninin paranazal skuamöz hücreli karsinomu da içeren baş ve boyun kanserleri ile ilişkilendirildiği çalışmalar tarandığında, TCGA ve TCGA'da bulunan 8.167 olguya ait verileri içeren veri madenciliği çalışması sonucunda ***BRAF*** geni mutasyonlarının prognostik belirteçler olarak rol oynayabileceği önerilmiştir (Z. H. Wu vd., 2020). Bununla birlikte 57 olguyu içeren farklı bir çalışmada Sanger sekans uygulaması sonucunda olgularda ***BRAF*** mutasyonu tespit edilememiştir (López, García Inclán, vd., 2012). Ancak bu çalışma doğrudan V600E'yi hedefleyen bir tasarıma sahiptir ve bununla uyumlu şekilde çalışma kapsamındaki olguların hiçbirinde V600E mutasyonu belirlenmemiştir.

BRAF geninde 30 olguda toplam 715 adet varyasyon belirlenmiştir. Bunların 54 tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, daha önce tanımlanmamış olan 661 adet yeni varyant belirlenmiştir. Çalışma kapsamında bulunan olgularda belirlenen ***BRAF*** varyasyonları arasında daha önce patolojik olarak tanımlanmış tek varyasyon 581. kodondaki asparjinin serine dönüştüğü N581S nokta mutasyonudur. Bu varyasyon sadece bir hastada bulunmaktadır. Kinaz bölgesinin aşırı aktivasyonuna neden olan bu dönüşüm meme kanseri ve sarkom, melanom gelişimi (Davies vd., 2002) ve akciğer kanserinde ilaç (gefitinib) direnci ile ilişkilendirilmiştir (Y. Liu vd., 2020). Bu durumun hem kinaz aktivitesinin açısı hem de ilaç direnci açısından kötü prognozla ilişkilendirebileceğini önermekteyiz. Bilinen diğer tüm varyantlar klinik olarak patojenik özelliği belirgin olmayan, benign ya da olası benign olarak tanımlanmıştır.

RAF1

RASefektörlerinden diğeri **RAF1** geni daha önce paranazal skuamöz hücreli karsinomlu olgularda değeriendirilmemiştir. Olgularımızda *RAF1*'i kodlayan dizilerde toplam 279 (125 eşsiz) adet varyant belirlenmiştir. Bunların 11 tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, 114 tane yeni varyant tanımlanmıştır. Yirmidört olguda en az bir adet patojenik ya da olası patojenik özellikte *RAF1* varyasyonu belirlenmiştir. Genin kodlayan ve kodlamayan bölgelerine detaylı bakıldığında, intron bölgelerinde toplam 121 tane (45 eşsiz) varyasyon belirlenmiş, bunlardan 42 tane eşsiz varyant ilk defa tanımlanmıştır. Belirlenen patojenik ya da olası patojenik özelliğe sahip tüm varyantlar literatürde daha önce tanımlanmamış olan yeni varyantlardır. Ekzon bölgelerinde toplam 153 adet (75 eşsiz) varyant belirlenmiş bunlar arasından 67 tane eşsiz varyant ilk kez tanımlanmıştır. Ekzon bölgesinde sadece ekzon 7 ve 17'de varyant belirlenmiştir. Bu bölgeler genin kanserde en çok mutasyona uğrayan bölgeleridir[COSMIC, *RAF1*;(Tate vd., 2019)]. Ekzon 7,*RAF1* proteinin negatif regülatör bölümünü kodlamaktadır. Bu bölge hem fosforilasyon yoluyla düzenlenmekte hem de negatif regülatör 14-3-3 proteini ile etkileşim kurmaktadır (Razzaque vd., 2007). Bu bölgede belirlenen patojenik varyantların proteinin negatif regülatör 14-3-3 ile etkileşimin azalmasına yol açarak onkojenik dönüşümde rol oynama potansiyeli öngörüsünden yolaçıkıldığında, varyasyonların bağlanma affinitesini artıracağı tahmini elde edilmiştir. Bu durum olgularda meydana gelen bu varyasyonların hastalığa neden olan temel değişimler arasında bulunmadığının önerilmesine neden olmuştur. Ayrıca bu bölgede meydana gelen varyantların aktif bölge içermeyen protein kodlanmasına neden olacağı da görüldüğünden (yaklaşık 300. aminoasitten itibaren terminasyon), olgularda belirlenen ekzon 7 varyantlarının hastalığın sürücü mutasyonları arasında yer almayacağı düşünülmektedir.

Ekzon 17, proteinin serin/treonin kinaz aktivitesini oluşturan CR3 domaini kodlamaktadır (Razzaque vd., 2007). Bununla birlikte bu bölge üzerinde belirlenen tüm varyasyonlar proteinin kinaz aktivitesi gerçekleştiren ATP bağlanma bölgesi ve aktif bölge dışında kaldığından doğrudan onkojenik aktivite ile ilişkili oldukları önerilmemektedir. Belirlenen varyasyonların tümü proteinin aktif bölgesinin bitiminden sonra meydana geldiği ve terminasyona neden olacağı için kritik önemli olarak görülmemektedir. Bu bölgede 9 olguda belirlenen H626Q yanlış anlamlı mutasyonunun aktive edici özellikte olup olmadığının test edilememesi bu çalışma açısından bir eksiklik olarak sunulabilir. Bu bölgenin (625. aminoasitten itibaren) protein yapısı PDB üzerinde tanımlanmış olmadığından bölgedeki

varyasyonların kinaz aktivitesini arttırma potansiyeli test edilememiştir. *RAF1*'de belirlenen varyasyonların hastalık açısından sürücü rol oynamadığını, yolcu mutasyonlar olarak ortaya çıktığını önermekteyiz.

PIK3CA

Hem Ras proteinlerinin efektörü olan hem de reseptör tirozin kinazlar tarafından doğrudan aktive edilebilen ve hücre canlılığını destekleyen kritik bir sinyalizasyon sistemi *PI3K/AKT* sinyal yolağıdır. Çalışma çalışmasında bu yolağın bileşenlerinden ***PIK3CA*** ve ***AKT1*** genlerinin mutasyon durumları araştırılmıştır.

Literatürde, bu kanser grubunda ***PIK3CA*** genin amplifikasyonunu (2/24) belirleyen güncel bir çalışma bulunmaktadır (Brown vd., 2020). Çalışmamızda ise herhangi bir olguda CNV belirlenmemiştir. Literatürde inverted papillom kökenli ve *de novoparanazal* skuamöz hücreli karsinomlu olguları içeren üç ayrı çalışmada olguların %4,2 ile %81,2 arasında değişen yüzdelerinin *PIK3CA* mutasyonu taşıdığı belirlenmiştir. Bu mutasyonlardan ise yalnızca D350H ve E545K belirtilmiştir (Brown vd., 2020; Chung vd., 2015; Yasukawa vd., 2018). COSMIC v92 veri tabanında paranazal skuamöz hücreli karsinomlu olgular incelendiğinde, toplam 27 olgunun bu genin mutasyonları açısından değerlendirildiği, 2 örnekte pozitiflik bulunduğu belirlenmiştir. Bu varyantlar p.E545K ve p.H1047R olarak belirlenmiştir [COSMIC, sinonazal skuamöz hücreli karsinom, *PIK3CA*; (Tate vd., 2019)].

Olgularda *PIK3CA*'yı kodlayan dizilerde toplam 2.912 adet (1.288 adet eşsiz) varyant belirlenmiştir. Bunların 66 tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, 1222 tane eşsiz yeni varyant tanımlanmıştır. Genin kodlayan ve kodlamayan bölgelerine detaylı bakıldığında, intron bölgelerinde toplam 1880 tane (768 eşsiz) varyasyon belirlenmiş, bunlardan 1845 tanesi ilk defa tanımlanmıştır. Ekzon bölgesinde toplam 974 adet (498 eşsiz) varyant belirlenmiş bunlardan 59 tanesi klinik olarak bilinmekle birlikte, 439 tane eşsiz varyant ilk kez tanımlanmıştır. Ekzon bölgesindeki varyantların %22,3'ü ekzon 2'de belirlenmiştir. Bu bölge hem içerdiği rezidü sayısı diğer bölgelere göre yüksek olduğundan (117 aminoasit) hem de kritik görevdeki, proteinin adaptör bağlayan domainini kodladığından en çok bu bölgede varyasyon tespit edilmiş olması beklenen bir durumdur. Olguların tamamında bu bölgede varyasyon belirlenmiştir. Varyant bazında değerlendirildiğinde ise olası patojenik p.H676Q yanlış anlamlı mutasyonu 20 olguda belirlenmiştir. Tüm olgularda en az bir adet patojenik ya da olası patojenik özellikte *PIK3CA* varyasyonu belirlenmiştir.

Belirlenen varyasyonlar fonksiyonlarına göre daha detaylı değerlendirildiğinde, üç olguda N terminalde, proteinin yaklaşık en geç 40. aminoasitte ifadesinin sonlanmasına neden olacak çerçeve kayması mutasyonları belirlenmiştir. Bunlar arasında bulunan p.W11*mutasyonu (COSM9413193) literatürde astrositumlu olgularda belirlenmiş ancak patojenite ile ilişkisi ortaya koyulmamıştır(Diplas vd., 2018). Çalışmamızda da bu bölgede benzer varyasyona sahip üç olgu belirlenmiştir. Bu bölüm proteinin herhangi bir fonksiyonel domainin oluşumundan önce ifadesinin sonlanmasına neden olacağından hastalığın sürücü mutasyonları arasında yer alacağı düşünülmemektedir.

PIK3CA geninin kodladığı proteinin N terminalinde bulunan ilk fonksiyonel domain adaptör bağlayan/p85 bağlayan domaindir (ekzon2, 32 – 107. aa). Bu bölge *PIK3R1* geni tarafından kodlanan p85 proteini ile bağlanarak heterodimer oluşturmaktadır. Heterodimer oluşumu ile hücre içindeki kritik onkojenik sinyallerin iletimi gerçekleştirmek üzere, membran lipidi fosfatidilinositol-4,5-bifosfatın ikinci mesajcı PIP3'e dönüşümü katalizlenmektedir(Madsen, Vanhaesebroeck, ve Semple, 2018; Miled vd., 2007).Bu bölgede belirlenen yanlış anlamalı mutasyonların iki proteinin etkileşiminde düzensizliğe neden olarak onkojenezle ilişkili olacağı düşünülmektedir. İki protein arasındaki bağlanma afinitesi değerlendirildiğinde ise sadece Q60L varyasyonunun bu öngörümüzü destekler nitelikte, protein-protein etkileşiminin artmasına neden olabileceği görülmektedir. Bununla birlikte bu bölgede olgularımızda daha yoğun olarak, proteinin terminasyonuna neden olan çerçeve kayması ya da anlamsız mutasyonlar belirlenmiştir. Bu varyasyonların aktivitesi olmayan işlevsel proteinler oluşturacağı öngörülmekle birlikte, belirlenen varyantlar literatürde tanımlanmadığından, işlevsel rolünün ortaya konması için ileri deneylere ihtiyaç duyulmaktadır.

Adaptör bağlayan domaini takip eden bölgede, *RAS*'lar ile bağlanarak kanser için kritik sinyalizasyonu başlatan *RAS* bağlayan domain yer almaktadır [*Grafik 70*; (Castellano ve Downward, 2011)]. Bölgede belirlediğimiz varyasyonların hiçbiri literatürde daha önce tanımlanmamıştır. Belirlenen varyantlar arasında genellikle ortak bir motif bulunmamakla birlikte 16 olguda anlamsız p.C242* mutasyonu belirlenmiştir. Bu varyasyon daha önce tanımlanmamış olmakla birlikte 245. aminoasitten itibaren translasyonu sonlandıran mutasyon (COSM5347132), endometriyum karsinomunda patojenik olarak tanımlanmıştır (McConechy vd., 2012). Ayrıca farklı motifler olsa da bu bölgede 21 olguda patojenik ya da olası patojenik varyant bulunması, bu domaindeki mutasyonların kanser açısından önemli olabileceğini göstermektedir.

Bu domainin ardından, membran fosfolipidleri ile etkileşim kuran C2 domaini bulunmaktadır. Ayrıca bu bölüm proteinin üç boyutlu yapısında, *RAS* bağlayan domain ve katalitik domain ile de etkileşim halindedir(Walker, Perisic, Ried, Stephens, ve Williams, 1999). Bu nedenle bu bölgedeki mutasyonların katalitik aktiviteyi güçlendirici etkisi daha önce bildirilmiştir(Croessmann vd., 2018). Olguların büyük bölümünde (26/30)bu bölgede literatürde daha önce tanımlanmamış olan patojenik ya da olası patojenik varyant belirlenmiştir. Altı olguda belirlenen p.C472Afs*2 çerçeve kaymasına ve dokuz olguda tanımlanan anlamsız p.L473* mutasyonlarına yakın pozisyona sonlanıma neden olanp.E469Kfs*5 (COSM9274166) mutasyonu, daha önce melanomlu olgularda tanımlanmış fakat patojenite ile ilişkilendirilmemiştir(Casula vd., 2019). Bu bölgedeki mutasyonların yüksek oranda belirlenmeleri ve gerek lipid membran etkileşimi gerek proteinin diğer aktif bölgeleri ile etkileşimlerini etkilemeleri nedeniyle, kanserin genetik temelleri arasında yer alabileceğini düşünmemize neden olmuştur.

Bu bölge, işlevi net olarak bilinmeyen, ancak substrat(fosfatidilinositol-4,5-bifosfat) ile etkileşimde görevli olduğu düşünülen aksesuar PIK domaini (521 – 703. aa)tarafından takip edilmektedir (Flanagan vd., 1993).Olguların yaklaşık 2/3'lik bölümünde belirlenen p.H676Q (20/30) ve p.K678* (19/30) mutasyonlarının onkojenik dönüşüm ile ilişkili olabileceğini önermekteyiz. Bu bölgeye en yakın pozisyonda tanımlanan iki varyantın ise (p.N677D; COSM1617225 ve p.E674D; COSM7872549)farklı kanser tiplerinde patojenik olarak değerlendirildiği görülmektedir(Kanojia vd., 2015; Tate vd., 2019).

Proteinin C terminalinde ise kinaz aktivitesine sahip katalitik domain (789 – 1014. aa) yer almaktadır (Hiles vd., 1992). Bu bölgede 27 olguda patojenik ya da olası patojenik varyant tanımlanmıştır. Ayrıca bazı çalışmalar katalitik domaini 789. aminoasitten itibaren proteinin tüm C-terminal bölgesini kapsayacak şekilde değerlendirmektedir(Ligresti vd., 2009). Bu durumda ise 28 farklı olguda patojenik ya da olası patojenik varyant belirlenmiştir. Olgularda yüksek oranda benzerlik gösteren varyantlar kinaz aktivitesi ve ATP bağlanma özelliği açısından değerlendirildiğinde tüm varyasyonların ATP bağlanma özelliğinde değişime neden olabileceği tahmin edilmektedir. Bu durum bu bölgede çok sayıda olguda belirlediğimiz varyasyon profilinin özellikle *PI3K/AKT*[KEGG, *PI3K/AKT* yolu, 04151;(Kanehisa vd., 2021)] yolu üzerinden kanser hücresi canlılığını destekleyici rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Tüm olgularda en az bir tane patojenikveya olası patojenik varyant bulunduğundan yeni tanımlanan varyantlar için sağ kalım analizi yapılamamış olmakla

birlikte, bilinen mutasyon taşıyan olgularda medyan sağ kalım yaklaşık 30 aylık bir azalış göstermiştir. Tüm bu bulgular değerlendirildiğinde *PIK3CA*'nın bu kanser için önemli bir tedavi hedefi oluşturabileceğini önermekteyiz.

AKT1

PIK3CA'nın aşağı-akışında bulunan *AKT1* geninde 30 olguda toplam 204 adet (66 adet eşsiz) varyasyon belirlenmiştir. Bunların dokuz tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, daha önce tanımlanmamış olan 195 adet (59 adet eşsiz) yeni varyant belirlenmiştir. Tüm varyantların 105 tanesi ekzon 99 tanesi intron bölgelerinde yer almaktadır. Ekzon bölgelerinde bulunanların tümü ekzon 3'te, intron bölgelerinde bulunanların tümü ise intron 2'de bulunmaktadır (Grafik 6 – 8). Bununla birlikte olguların yaklaşık 2/3'lük bölümünde (18/30) patojenik ya da olası patojenik varyant belirlendiğinden bu bölgedeki mutasyonların hastalığın sürücü mutasyonları arasında yer alacağını önermemekteyiz.

Olgularda belirlenen *AKT1* genin ekzon bölgelerinde belirlenen tüm varyasyonlar ekzon 3'te yer almaktadır. *AKT1* geni üzerindeki varyasyonların toplandığı bu bölge proteine ait Ph domainini kodlayan bölgedir. Ph domaini *AKT1*'in fosfatidilinozitol 3,4,5-trisfosfata (PIP3) bağlanarak fosforillenmesini ve aktivasyonunu sağlamaktadır (Mundi, Sachdev, McCourt, ve Kalinsky, 2016). Bu domain ayrıca *AKT1*'in otoinhibisyonunu da sağlamaktadır (Chu vd., 2020).

Kanserlere genel bakıldığında *AKT1* geninde en sık görülen mutasyon, 17. pozisyondaki glutamik asidin lizine dönüştüğü (p.E17K) nokta mutasyonudur. Patojenik özelliğe sahip bu varyasyon, Ph domaininin PIP3 bağlantısının sürmesine ve sinyal yolağının sürekli olarak aktivasyonuna neden olmaktadır ve pek çok kanser tipinde tümör gelişimi ve prognozla ilişkilendirilmiştir (Y. Chen vd., 2020). Aynı genin 25. pozisyonundaki arjininin sisteine dönüştüğü (p.R25C) nokta mutasyonu da kanserlerde en sık görülen nokta mutasyonlarından biridir ve benzer etkiye sahiptir (W. Wang vd., 2019). Çalışmamızda iki farklı olguda daha önceden klinik olarak patojenik olduğu tanımlanmış bu iki varyant belirlenmiştir. Ayrıca *AKT1* geninde daha önce tanımlanmamış 32 adet eşsiz yeni varyasyon tanımlanmıştır. Bunlardan çerçeve kaymasına neden olan p.K39Rfs*24, p.G33Afs*30, p.L28Pfs*35, p.W22Cfs*41, p.I19Sfs*44, p.N44Rfs*6, p.Q40Rfs*10, p.Y38Ifs*12, p.K20Gfs*13 ve p.Q17Rfs*16 varyasyonları patojenik özellik taşımaktadır. p.W22Cfs*41 varyasyonu dokuz olguda ortak olarak belirlenmiştir. Yirmi ikinci pozisyonunda bulunan triptofan aminoasidi Ph

domainin PIP3 bağlanma bölgeleri arasında yer almaktadır (Miao vd., 2010). Bununla birlikte olguların yaklaşık 1/3'lük bölümünde (9/30) belirlenen bu varyantın kanserle ilişkili olabileceği düşünülse de hastalığın sürücü mutasyonları arasında yer alacağını önermemektediriz. Ancak mutasyon taşımayan olgularda medyan sağ kalım %50'nin üzerinde olduğundan *AKT1* mutasyon varlığının kötü prognoz ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

CTNNB1

Bu akıştan bağımsız bir onkogen olan ***CTNNB1*** genini içeren tek çalışmada paranazal inverted papillom kökenli skuamöz hücreli karsinomlu 18 olguda immünohistokimya analizi sonucu ekspresyon azalışı belirlenmiştir (Koo vd., 2011) ancak mutasyon durumunu içeren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

CTNNB1 geninde 30 olguda 14 (%46,7) tanesi klinik anlamlı ve 104 (%88,1) tanesidaha önce tanımlanmamış olantoplam 118 adet varyant belirlenmiştir. Olgularda *CTNNB1* geninin ekzon bölgelerinde belirlenen tüm varyasyonlar, ekzon 3'te yer almaktadır. Ekzon 3, *CTNNB1* proteininin N terminal bölgesini kodlamaktadır. Bu bölge, WNT sinyal yolağında, WNT sinyali yokluğunda *CTNNB1*'in yukarı-akış regülatörleri olan *CK1A* ve *GSK3B* tarafından fosforillendiği ve böylece proteozoma yönlendirilerek yıkıma uğramasını sağlayan rezidüleri taşımaktadır (S30, S37, T41 ve S45). Bu durumda hücre içinde sinyal iletimi gerçekleşmemekte ve *CBP*, *TCF/LEF1* ve *CTNNB1*'i içeren transkripsiyon kompleksi oluşmadığından hücrede proliferasyon ve hücre göçü gibi protoonkojenik mekanizmalar meydana gelememektedir. Literatür incelendiğinde ekzon 3 tarafından kodlanan N-terminal bölgesinin bu gene ait mutasyonların yoğunlaştığı bölge olduğu görülmektedir (S. Kim ve Jeong, 2019). Çalışmamızda bir olguda bu fosforilasyon bölgelerinden 33. pozisyonadaki serinin proline dönüşümüne (p.S33P) neden olan patojenik c.97T>C yanlış anlamlı mutasyonu belirlenmiştir. Daha önce tanımlanmış olan diğer tüm varyantların klinik anlamı belirgin değildir. Daha önce tanımlanmamış varyantlar incelendiğinde ise, 20 olguda patojenik ve olası patojenik özelliğe sahip toplam 45 adet (29 eşsiz) varyasyon belirlenmiştir. Kodon 49'daki lizinin serine dönüşümüne (p.K49S) neden olan olası patojenik insersiyon 5 olguda ortak olarak belirlenmiştir. Bu bölgedeki lizinin asetilasyonunun *MYC* onkogeninin transkripsiyonunu arttırarak, farklı kanserlerde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Wolf, Rodova, Miska, Calvet, ve Kouzarides, 2002). Bu lizinin metilasyonu ise transkripsiyon faktörlerinin ve dolayısı ile gen ekspresyonunun baskılanmasına neden olmaktadır (Hoffmeyer, Junghans, Kanzler, ve Kemler, 2017). Buradan yola çıkarak, daha önce mutasyon durumu

belirlenmemiş olan bu bölgedeki lizinin serine dönüşümünün asetilasyon ve metilasyon ile kontrol edilen gen ifadesini etkileyebileceği düşünülmektedir. Ancak olgularımızın yaklaşık yarısında (17/30) patojenik ya da olası patojenik varyant tanımlanması ve bunların ortaklık göstermemesi sebebiyle, bu genin hastalığın patogenezinde sürücü rol oynamayacağını ancak herhangi bir patojenik ya da olası patojenik varyant taşınmasının sağ kalımda 40 ayın üzerinde anlamlı bir azalış oluşturmaması nedeniyle, kötü prognoz ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

ESR1

ESR1, *FOXJ2* ve *TP53* transkripsiyon faktörlerinin mutasyon profilleri değerlendirilmiştir.

Paranasal skuamöz hücreli karsinomlu olguları içeren sadece bir çalışmada *ESR1* genin promotör bölgesinin metilasyon düzeyinin arttığı ve gen ifadesinin post-transkripsiyonel olarak azaldığı bildirilmiştir(Chmelařová vd., 2016). Ancak genin, bu kanser türündeki mutasyonlarını araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. *ESR1* geninde 30 olguda toplam 513 adet varyasyon belirlenmiştir. Bunların 51 (%9,94) tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, daha önce tanımlanmamış olan 462 (%90,06) adet yeni varyant belirlenmiştir. Klinik anlamı bilinen varyantlardan tümü ekzon bölgesinde (ekzon 5 ve ekzon 9) bulunmakta ancak patojenik ya da olası patojenik özellik göstermemektedir. Daha önce tanımlanmamış olan varyantlardan ise 10 tanesi 3'UTR, 35 tanesi 5'UTR, 138 tanesi intron ve 279 tanesi ekzon (ekzon 2, 5 ve 9) bölgesinde yer almaktadır. Tüm olgularda belirlenen varyantlar arasında ekzon bölgesinde bulunan 330 varyanttan 154 tanesi patojenik ya da olası patojenik özelliktedir. Yirmi dokuz olguda en az bir tane *ESR1* mutasyonu, 27 tanesinde ise en az bir adet patojenik ya da olası patojenik *ESR1* mutasyonu bulunmaktadır.

AF-1 domaini kodlayan bölgeye bakıldığında, bölgenin başlangıcında patojenik M1Rfs*3 (9/30) çerçeve kayması mutasyonu belirlenmiştir. Bu mutasyon, başlangıç kodonunu ortadan kaldıracağı için protein sençalışmai oluşmayacaktır. Benzer şekilde bu bölgede 41. aminoasitten itibaren protein sençalışmainin olmayacağı E41* (6/30) anlamsız mutasyonu da belirlenmiştir. Yirmi olguda, en az bir adet başlangıç kaybı bulunmaktadır. Bu durum paranasal sinüs tümörlerinde *ESR1* geninin aktivasyonundan çok inaktivasyonunun rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde metilasyon profilini içeren bir çalışma da bu öneriyi destekleyici niteliktedir(Chmelařová vd., 2016). Çalışmamızdaki olgularda DNA bağlanma bölgesinde herhangi bir patojenik varyasyon belirlenmemiştir. Ancak bu bölgenin yukarı-akış bölümündeki mutasyonların DNA bağlanma bölgesini ortadan kaldırdığı tahmin

edilmektedir. Bu durumun spesifik genlerin ekspresyonunun gerçekleşmesini engelleyebileceği düşünülebilecektir.

Olgularda, *ESR1*'in ligand bağlayan domainde, patojenik Y331* (9/30) anlamsız, D332Afs*8 (7/30) çerçeve kayması, olası patojenik F337I (7/30) ve S338I (7/30) yanlış anlamlı, patojenik S518R (5/30) yanlış anlamlı ve patojenik E561Rfs*46 (7/30) çerçeve kayması mutasyonları belirlenmiştir (*Grafik 49*). Otuz olgunun 25'inde bu bölgede en az bir patojenik varyant tanımlanmıştır.*ESR1* geninde patojenite ile ilişkilendirilen mutasyonların yığıldığı bölge ligand bağlanma bölgesidir. Hem hatalı aktivasyona hem de ilaç etkileşimi aracılığıyla tedavi direncine neden olabileceği bazı çalışmalarla gösterilmiştir(Dustin, Gu, ve Fuqua, 2019). Çalışmada olgularımızda belirlediğimiz ligand bağlanma bölgesindeki bu mutasyon durumunun reseptörün aktivasyonunu sağlayan ligand ile etkileşimini engelleyebileceği ve bu bölgenin hastalık için kritik bir süreci oluşturabileceği önerilebilecektir.

FOXL2

Bu olgu grubunda daha önce çalışılmamış olan *FOXL2* geninde,28 (%22,4) tane klinik anlamlı 97 (%77,6) tane yeni olmak üzere toplam 125 adet (46 eşsiz) varyant belirlenmiştir. Bu varyantlardan 71 tanesi patojenik ya da olası patojenik özellik göstermektedir ve 32 eşsiz varyant tanımlanmıştır. Yirmi sekiz olguda en az bir tane *FOXL2* mutasyonu, 23 tanesinde ise en az bir adet patojenik ya da olası patojenik *FOXL2* mutasyonu bulunmaktadır. Olgularda olası patojenik C111S (9/30) yanlış anlamlı, patojenik F112Sfs*38 (7/30) çerçeve kayması, olası patojenik R154Afs*85 (12/30) çerçeve kayması belirlenmiştir. Doksanıncı ve 124. aminoasitler arasındaki bölge, proteinin DNA'ya bağlanmasını sağlayan bölgeyi oluşturmaktadır. Bu bölgedeki mutasyonlar kanser ile ilişkilendirilmiştir(Jamieson vd., 2010). Olgularda belirlenen bu mutasyonların DNA bağlanmasına engel olabileceği biyoinformatik araçlar yardımıyla tahmin edilmiştir. *FOXL2* apoptotik *FAS*, *TRAIL* gibi genlerin transkripsiyonunda görev aldığından (Y. Han vd., 2019; Jamieson vd., 2010), DNA'ya bağlanmasının engellenmesine yol açan mutasyonlar kanser hücrelerinin programlı ölümüne engel olabilecektir.

TP53

Tüm kanser tiplerinde en çok araştırılan tümör süpresörlerden olan *TP53* geninin mutasyonları da çalışmamızdairdelenmiştir. Bu patojenitede daha önce *de novo* ya da papillom kökenli olguları araştıran çalışmalarda, yabanıl tip ve mutant *TP53* ekspresyonunun yüksek olduğu,

gen ve protein düzeyinde gösterilmiştir(S. G. Kim vd., 2011; Oncel vd., 2011; X. Wang vd., 2017; Yamashita vd., 2015). Spesifik olarak maksiller sinüs skuamöz hücreli karsinomunu içeren çalışmalarda da bu ekspresyon artışı gösterilmiş, patojenitenin muhtemel sebepleri arasında önerilmiştir(Bandoh vd., 2002, 2005; R. hua Xie vd., 2002; Y. Yu ve Dong, 2001). Çalışmamızda *TP53* gen ekspresyonu değerlendirilmemiş, sadece mutasyon profili belirlenmiştir.

Olgularda *TP53*'ü kodlayan dizilerde toplam 1.665 (692 eşsiz) adet varyant belirlenmiştir. Bunların 754 tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, 911 tane yeni varyant tanımlanmıştır. Tüm olgularda en az bir adet patojenik ya da olası patojenik *TP53* varyasyonu belirlenmiştir. Paranasal skuamöz hücreli karsinomlu olguları içeren literatürdeki sınırlı sayıda çalışma incelendiğinde, *TP53*'ün en sık araştırılan ve en yüksek oranda mutasyonu belirlenen genlerden biri olduğu dikkat çekmektedir. Tüm olguların %33,6 – %96,6 arasında değişen yüzdelerde *TP53* mutasyonu taşıdığı belirlenmiştir. COSMIC v92 veri tabanında bu kanser tipini içeren çalışmaların sonuçları incelendiğindeen yüksek oranda mutasyon belirlenen genin %42 ile *TP53* olduğu görülmektedir[COSMIC, sinonazal skuamöz hücreli karsinom, *TP53*; (Tate vd., 2019)]. Farklı sinonazal kanserlerdeki *TP53* mutasyonlarını araştıran çalışmada skuamöz hücreli karsinomlu 101 olgunun 34'ünde mutasyon belirlenmiştir (Holmila vd., 2010).Uchi ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği inverted papillom kökenli sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu altı olguyu içeren çalışmada üç olguda*TP53* mutasyonu belirlenmiş, özellikle delesyonlarının benign papillomların malign transformasyonunda rol oynayabileceği önerilmiştir(Uchi vd., 2021).Onkositik ve inverted papillom kökenli sinonazal skuamöz hücreli karsinomlu olguları içerenöngüncelbir çalışmada da, 29 olgunun 28'inde en az bir *TP53* mutasyonu belirlenmiş, benign lezyonlarda belirlenmeyen bu alterasyonların, malign transformasyon süreci için kritik olabileceği önerilmiştir(Brown vd., 2020). Benzer şekilde Yasukawa ve arkadaşları da *de novo* ve inverted papillom kökenli skuamöz hücreli karsinomlu toplam 11 olgunun 10'unda *TP53* mutasyonu belirlemiş ve bu mutasyonların malign dönüşümle ilişkili olabileceğini önermişlerdir(Yasukawa vd., 2018). Çalışmamızda da literatür ile uyumlu şekilde tüm olgularda *TP53* mutasyonları belirlenmiş olduğundan bu genin paranasal skuamöz hücreli karsinomlu olguların moleküler patogenezinde önemli rol oynadığını önermekteyiz.

Genin kodlayan ve kodlamayan bölgelerine detaylı bakıldığında, intron bölgelerinde toplam 858 tane (355 eşsiz) varyasyon belirlenmiş, bunlardan 808 tanesi ilk defa tanımlanmıştır.

Ekzon bölgesinde toplam 496 adet (229 eşsiz) varyant belirlenmiş bunlardan 436 tanesi klinik olarak bilinmekle birlikte, 60 tanesi (22 eşsiz) ilk kez tanımlanmıştır. Ekzon bölgesindeki varyantların %28,8'i ekzon 4'te belirlenmiştir. Bu bölgenin içerdiği rezidü sayısı diğer bölgelere göre yüksek olduğundan (93 aminoasit) en çok bu bölgede varyasyon tespit edilmiş olması beklenen bir durumdur. Olguların neredeyse tamamında ekzon 4 (29/30) ve ekzon 8 (28/30) mutasyonu belirlenmiştir. Literatürde de sinonazal skuamöz hücreli karsinomda benzer şekilde ekzon 4 ve 8 arasındaki bölgede özellikle ekzon 8'de mutasyonların yoğunlaştığı gösterilmiştir. Literatürdeki çalışmaların genellikle tüm genin ya da tüm kodlayan bölgelerini incelemek yerine belirli bölgelere ("hotspot") yoğunlaşmasının (Brown vd., 2020), bu küçük farklılığın sebebi olabileceğini önermekteyiz. Domain bazında değerlendirildiğinde ise olgularda varyasyonların yoğun olarak DNA bağlayan domainde meydana geldiği belirlenmiştir. Benzer dağılım COSMIC v92 veri tabanında da görülmektedir [COSMIC, sinonazal skuamöz hücreli karsinom, TP53; (Tate vd., 2019)]. Bu bölgenin kritik işlevi nedeniyle hem daha fazla araştırılmış olması hem de malignitede rol oynama ihtimalinin yüksekliği bu sonucu açıklayabilmektedir. Varyant bazında değerlendirildiğinde ise 26 olguda belirlenen p.R283H mutasyonu olgularda en yüksek sayıda ortaklık göstermiştir. Bu mutasyon (COSM11483) daha önce farklı kanserlerle ilişkilendirilmiş ve olası patojenik olarak değerlendirilmiştir. İncelediğimiz kanserde ise az sayıda olguda değerlendirilmiş ve saptanmış [COSM11483; (Tate vd., 2019)] olsa da olgularımızda yüksek oranda belirlenen ve DNA bağlanma bölgesinde bulunan (ekzon 8) bu varyasyonun hastalığın sürücü mutasyonları arasında olabileceğini düşünmekteyiz.

Proteinin N terminalini kodlayan dizide 1– 39. aa (ekzon 2 – 4) ve 40 – 61. aa (ekzon 4) tarafından oluşturulan transaktivasyon domainleri (TAD1 ve TAD2) TP53 proteininin, transkripsiyon faktörleri, histon asetil transferazlar gibi histon modifikasyonunu sağlayan enzimler ve MDM2 gibi negatif düzenleyici proteinler ile bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesini sağlayan, evrimsel olarak korunmuş bölgelerdir (Raj ve Attardi, 2017). Olgularda TAD1'i kodlayan bölgede klinik anlamı bilinen toplam 11 adet (yedi adet eşsiz), daha önce tanımlanmamış toplam yedi (üç adet eşsiz) varyant belirlenmiştir. Belirlenen 10 eşsiz varyanttan beş tanesi olası patojenik ya da patojenik özelliğe sahiptir. Daha önce tanımlanmamış olan M1Rfs*14 (2/30) varyasyonu, olgularda tümör baskılayıcı proteinin translasyonunun başlamasını engellemektedir. Yine daha önce tanımlanmamış olan E17* (4/30) ve klinik anlamı bilinen p.E2* (1/30) ve p.D7* (1/30) varyasyonları belirlenmiştir. Toplam yedi farklı olguda, patojenik ya da olası patojenik şekilde TP53

proteinin translasyonun ya hiç başlayamayacağı ya da maksimum 17. aminoasitten itibaren durdurulacağı belirlenmiştir. Daha önceden tanımlanmış olan varyantlar üzerinden değerlendirildiğinde (örneğin E17*; COSM9497247), bu tip varyasyonların tümör baskılayıcı genin ifadesinin engellenmesine neden olarak onkojenik dönüşümde rol oynayacağı öngörülebilmektedir. Bununla birlikte bu birikimin olguların büyük bir bölümünde görülmemesi, kanserin temel sebeplerinden biri olmadığını ancak prognoz ile ilişkili rol oynayabileceğini düşündürmektedir. **TAD2**'yi kodlayan dizilerde isedaha önce tanımlanmamış olan yeni bir varyant belirlenmemiştir. Klinik anlamı bilinen toplam 33 adet (yedi eşsiz); patojenik ya da olası patojenik özelliğe sahip iki olguda iki farklı varyant belirlenmiştir. Olguların 1/3'ünden fazlasında(11/30)en az bir adet patojenik ya da olası patojenik TAD1 ya da TAD2 mutasyonu belirlenmiştir. TAD1 ve TAD2'nin mutasyonları farklı kanser tipleri ile ilişkilendirilmiş olmakla birlikte (Z. Wu vd., 2019; Yuan vd., 2019)çalışma kapsamında değerlendirdiğimiz olgularda ortak şekilde bir mutasyon profili görülmediğinden TAD bölgesi mutasyonlarının hastalığın sürücü mutasyonları arasında olmayacağını öngörmekteyiz.

İki TAD domaini, prolinden zengin bölge (PRD; 62 – 99. aa, ekzon 4) tarafından takip edilmektedir(Raj ve Attardi, 2017). Bu bölge apoptotik faktörler ile etkileşim kurmaktadır (J. Zhu, Zhang, Jiang, ve Chen, 2000). Çalışma olgularında **PRD**'i kodlayan bölgede klinik anlamı bilinen toplam 79 adet (34 adet eşsiz) varyant belirlenmiştir. Belirlenen 34 adet eşsiz varyanttan 18 tanesi olası patojenik ya da patojenik özelliğe sahiptir. Bu bölgede daha önce tanımlanmamış yeni varyasyon belirlenmemiştir. Olası patojenik p.A88V (5/30) ve p.P89L (4/30) varyasyonları en yüksek oranda belirlenmiştir. Bu iki varyasyon, farklı tipteki kanserlerle ilişkilendirilmiş olmakla birlikte (Sclafani vd., 2020; Shimura vd., 2018), olgularımızın yalnızca yaklaşık 1/3'lük bölümünde(12/30) PRD mutasyonları belirlendiğinden, bu varyasyonların hastalığın sürücü mutasyonları arasında yer almadığını öngörmekteyiz.

N terminalde yer alan protein-protein etkileşim bölgeleri, **TP53**'ün DNA ile etkileşim kurmasını sağlayan DNA bağlayan domain (DBD; 100 – 288. aa, ekzon 4 – 8) tarafından takip edilmektedir. Tetramerik yapıda bir transkripsiyon faktörü olan **TP53**, bu bölge aracılığıyla DNA'ya bağlanmakta ve gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Olgularda klinik anlamı bilinen toplam 230 adet (115 adet eşsiz) **DBD** varyasyonu belirlenmiştir. Belirlenen 115 adet eşsiz varyanttan 92 tanesi olası patojenik ya da patojenik özelliğe sahiptir. Bölgede daha önce

tanımlanmamış olan altı adet (beş adet eşsiz) varyanttan üç tanesi patojenik ya da olası patojenik özelliğe sahiptir(*Grafik 85*). DNA bağlanma bölgesinde ise olguların tümünde en az bir tane patojenik ya da olası patojenik özelliğe sahip varyantın olduğu belirlenmiştir. Bu varyantların *TP53* proteinin DNA bağlanma etkinliğini azaltacağı ya da tamamen ortadan kaldıracığı biyoinformatik araçlar kullanılarak tahmin edilmektedir. Ayrıca literatür incelendiğinde debu olgu grubunda en yüksek oranda belirlenen alterasyonların bu bölgede bulunması (Brown vd., 2020; Holmila vd., 2010; Uchi vd., 2021; Yasukawa vd., 2018) nedeniyle bölgedeki mutasyonların hastalığın sürücü mutasyonları arasında yer alabileceğini düşünmekteyiz.

DNA bağlanma bölgesinin ardından *TP53*'ün tetramer oluşturmasını sağlayan tetramerizasyon domaini (**TD**; 319 – 357.aa, ekzon 9 – 10) gelmektedir. Tetramer oluşturan *TP53*, konfigürasyonel olarak değişime uğramakta ve 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' motifini tanıyarak DBD aracılığıyla DNA'ya bağlanmaktadır. Ayrıca bu konfigürasyonel değişiklikler *TP53*'e düzenleyici proteinlerin bağlanmasını da düzenlemektedir (El-Deiry, Kern, Pietenpol, Kinzler, ve Vogelstein, 1992; McLure ve Lee, 1998; Retzlaff vd., 2013). Olgularda, TD'de DBD'ye oranla daha az varyasyon belirlenmiştir. Literatüre bakıldığında da bu bölgenin kanserlerde daha az mutasyona uğradığı bildirilmiştir (Chène, 2001). Klinik anlamı bilinen toplam 17 adet (13 adet eşsiz) varyant belirlenmiştir. Belirlenen 13 adet eşsiz varyanttan 10 tanesi olası patojenik ya da patojenik özelliğe sahiptir. TD bölgesinde daha önce tanımlanmamış olan 43 adet (dokuz adet eşsiz) varyanttan beş tanesi patojenik ya da olası patojenik özelliğe sahiptir. Olguların yaklaşık yarısında (14/30) TD'yi kodlayan bölgede en az bir tane patojenik ya da olası patojenik varyasyon belirlenmiştir. Biyoinformatik değerlendirme, bu varyasyonların *TP53*'ün tetramer oluşturma afinitesinde artışa neden olacağını göstermektedir. Gencel-Augusto ve Lozano yaptıkları çalışmada öne sürdükleri bu domaindeki mutasyonların tetramerizasyon oluşmasını engellemese dahi konformasyonel değişim nedeniyle, proteinin DNA-bağlanma özelliğini değiştirebileceği ve transkripsiyonel aktivitesine engel olabileceği görüşüne (Gencel-Augusto ve Lozano, 2020) elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda katılmaktayız.

TD'nin iki yanında, bu domainle çakışık şekilde nükleer import ve eksport sinyal dizileri yer almaktadır. Nükleer lokalizasyon sinyal dizisi iki parçadan oluşmaktadır (bipartite) ve 305 – 306 KR ve 319 – 321 KKK dizilimini içermektedir. Nükleer eksport sinyal dizisi 340, 344, 348, 350. pozisyonlardaki sırasıyla MLLL dizisinden oluşmaktadır (S. H. Liang ve Clarke,

2001). Yedi olguda *TP53*'ün **NLS** dizisinin tamamen ortadan kalktığı tahmin edilmiştir. Bu sinyalizasyon dizisi, normalde sitoplazmada inaktif durumda bulunan *TP53*'ün, kanserde ya da herhangi bir genotoksisite durumunda aktifleşerek, gen ekspresyonunu düzenlemek amacıyla nükleusa taşınmasını sağlamaktadır. Bu sinyalin ortadan kalkması, farklı maligniteler ile ilişkilendirilmektedir(S. H. Liang ve Clarke, 2001). Çalışmamızda da sinyalin ortadan kalkmasının patojenik gelişime destek olabileceği önerilmektedir.

TP53 proteinin C-terminalinde regülatör domain (363 – 393. aa, ekzon 10 ve 11) yer almaktadır (May ve May, 1999). Bu domain başlangıçta negatif regülatör olarak düşünülmüş olmakla birlikte güncel çalışmalar bu alt birimin *TP53*'ün bir transkripsiyon faktörü olarak işlevini arttırdığını göstermiştir(Sullivan, Galbraith, Andrysik, ve Espinosa, 2018). Olgularda **C-terminal domaininde** az sayıda varyasyona rastlanmıştır.Klinik anlamı bilinen toplam 15 adet (yedi adet eşsiz) varyant belirlenmiştir. Belirlenen yedi adet eşsiz varyanttan üç tanesi olası patojenik özelliğe sahiptir. Bölgede yeni varyant belirlenmemiştir. Ayrıca sağ kalım analizi anlamlı farklılık göstermediğinden, patojenik varyantlara olguların küçük bir bölümünde rastlandığı ve tekrarlı olmadığından *TP53* geninin hastalığın sürücü mutasyonları arasında yer aldığı öngörülmemektedir.

TP53'ün**3'UTR** bölgesinde 46 adet varyasyon belirlenmiş bunlardan 43 tanesi (32 eşsiz) ilk kez tanımlanmıştır. Genin 3'UTR bölgesi,*TP53* ifadesinin post-transkripsiyonel olarak baskılanmasına neden olan miRNA'ların bağlanma bölgesini oluşturmaktadır(Juan Liu, Zhang, Zhao, ve Feng, 2017). *TP53*'ün 3'UTR'sine bağlanarak post-transkripsiyonel olarak ifadesini düzenleyen miRNA'lar, literatürde çeşitli yöntemlerle tahmin edilmiş ve bunlardan bazıları liteartür verisi aracılığıyla valide edilmiştir [mirTarBase;(Chou vd., 2018)]. *TP53* de dahil olmak üzere tüm genleri hedefleyen tüm miRNA'ların hedef sekans dizilimleri çalışma olgularında belirlenen dizilimler ile karşılaştırılmış ve belirlenen alterasyonların miRNA'ların hedef dizileri üzerinde oluşturacağı potansiyel etki değerlendirilmiştir. Bu bağlamda belirlenen 22 farklı alterasyonun valide diziler üzerinde bilinen herhangi bir etki oluşturmadığı belirlenmiş ve bu nedenle bulgularda gösterilmemiştir. Bununla birlikte belirlenen 18 alterasyon, normal dizi ile eşleşme yapan miRNA'ların etkileşimini engellemektedir(*Tablo 22*).Dört olguda belirlenen farklı alterasyonlar “CTTTGAACCCTTGCTTGCAATAG” dizilimini etkileyerek miR-25-3p'nin *TP53* ile bağlanmasını engellemektedir. miR-25-3p'nin *TP53*'ü kontrolü, apoptozun negatif düzenleyicisi olarak bildirildiğinden (M. Kumar vd., 2011)bu durum bu olgularda iyi prognoz

ile ilişkilendirilebilir. miR-491-5p için hedef sekans dizilerini oluşturan “TCCCCAC” ve “TCCCCACT” dizilerinin sırasıyla *NOTCH3* ve *MMP9* genlerinin regülasyonunu sağladığı valide edilmiştir(Tian ve Zhang, 2016; Q. Zhang vd., 2016) olmakla birlikte bu bölgeler *TP53* geninin 3'UTR'sinde de yer aldığından, bu miRNA'nın *TP53*'ü de hedefleyebileceği öngörülebilecektir. Benzer şekilde miR-1207-5p *STAT6* geninin 3'UTR'sini hedeflemede kullandığı “CCCTGCC” dizisi ve miR-185-5p'nin *TG*, *COL1A1*, *TGFB1* genlerini hedeflemede kullandığı “TCTCTCC” dizileri (Xiao vd., 2017; C. Yan vd., 2017)de *TP53* geninde ortak şekilde bulunduğundan, bu bölgeler aracılığıyla *TP53*'ün susturulmasını engelleyen alterasyonların kanserde iyi prognoz ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Ancak *TP53*'ün 3'UTR'sinde belirlenen bu alterasyonlar az sayıda olgu ile kısıtlı olduğundan ve olgularda benzer bir profil sergilemediğinden, bu kanser türünde rol oynayan temel epigenetik mekanizmalardan biri olduğunu önermemekteyiz.

IDH1 ve IDH2

Değerlendirilen son grup, kanser hücrelerinde önemli başka bir süreç olan enerji metabolizmasında görevli genlerden ***IDH1*** ve ***IDH2***'den oluşmaktadır.

IDH1 geninde 30 olguda toplam 118 adet varyasyon belirlenmiştir. Yirmi sekiz olguda en az bir tane *IDH1* mutasyonu, dört tanesinde ise en az bir adet patojenik ya da olası patojenik mutasyon bulunmaktadır. Bunların üç tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, daha önce tanımlanmamış olan 115 adet yeni varyant belirlenmiştir. Klinik anlamı bilinen varyantlar ekzon 4; daha önce tanımlanmamış olan varyantlardan ise 92 tanesi intron 4, 23 tanesi ekzon 4'te yer almaktadır. Ekzon bölgesinde bulunan 26 varyanttan 4 tanesi patojenik ya da olası patojenik özelliktedir. Bu grupta iki adet benzersiz varyant tanımlanmıştır ve bir olguda literatürde daha önce tanımlanmamış olan olası patojenik A134V yanlış anlamlı mutasyonu belirlenmiştir. Değişime uğraması olası aminoasitin kodladığı bölüm, katalitik alt birimin oluşturulmasını sağlamak üzere toka benzeri işlev gösteren bölgesidir(Xu vd., 2004). Katalitik ya da bağlanma işlevi göstermediği için onkojenez ile doğrudan ilişkili olmayabileceği önerilebilecektir. Sadece dört olguda patojenite özelliğine sahip varyant belirlendiğinden ve ortak bir varyasyon profili belirlenemediğinden bu genin mutasyonlarının hastalık grubumuz ile doğrudan ilişkili olmadığını ve enerji mekanizmasında en azından *IDH1* mutasyonu üzerinden ilerleyen bir süreç olmadığını önermekteyiz.

Sinonazal farklılaşmamış ya da kötü farklılaşmış karsinomları içeren güncel iki çalışmada bu hasta grubunda *IDH2* mutasyon durumu incelenmiş; olguların yaklaşık yarısında *IDH2* mutasyonu belirlenmiştir (Jo, Chau, Hornick, Krane, ve Sholl, 2017; Riobello vd., 2020). Çalışmamızda da benzer şekilde olguların büyük bölümünde *IDH2* mutasyonları bulunmuş, 30 olguda toplam 174 adet varyasyon belirlenmiştir. Bunların 6 (%3,45) tanesinin klinik anlamı bilinmekle birlikte, daha önce tanımlanmamış olan 168 (%96,55) adet yeni varyant belirlenmiştir. Klinik anlamı bilinen varyantlar ekzon 4; daha önce tanımlanmamış olan varyantlardan ise 77 tanesi intron, 91 tanesi ekzon bölgesinde (ekzon 4 ve 5) yer almaktadır. Ekzon bölgesinde bulunan 97 varyanttan 69 tanesi patojenik ya da olası patojenik özelliktedir. Bu grupta 18 adet benzersiz varyant tanımlanmıştır ve daha önce tanımlanmamış 15 benzersiz varyant belirlenmiştir. Yirmi dokuz olguda en az bir tane patojenik ya da olası patojenik *IDH2* mutasyonu bulunmaktadır.

Literatürde tanımlanmış olan R172X mutasyonu (Waitkus vd., 2016) olgularımızın az bir bölümünde bulunduğu (5/30) sürücü mutasyonlar arasında yer aldığı düşünülmemekle birlikte, özellikle 170. ve 175. aminoasitlerde değişikliğe neden olan, olası patojenik I170M (24/30) ve H175N (21/30) yanlış anlamlı mutasyonları ağırlıklı olarak belirlenmiştir. Bu iki aminoasit proteinin birbiriyle karşılıklı olarak etkileşen iki küçük domaininden birinde yer almaktadır (Waitkus, Diplas, ve Yan, 2016; Xu vd., 2004). *IDH2* mutasyonlarının sağ kalım analizinde anlamlı fark görülmemesine rağmen olguların büyük çoğunluğunda belirlenen ve daha önce tanımlanmamış bu iki varyantın, doğrudan hücrenin enerji mekanizmasında düzensizliğe neden olarak hastalığa katkı sunabileceğini önermekteyiz.

VCAM1

Son olarak çalışmamızda paranazal sinüs kanserinde hedefli tedavide kullanılabilecek yüzey belirteçleri araştırılmış ve VCAM1 geninin ekspresyon seviyesinin kontrole göre anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum VCAM1'in paranazal sinüs kanserlerinde tedavi hedefi olarak kullanılabileceğini öne sürmesi bakımından önemlidir.

Sonuç olarak, paranazal sinüs kanserlerinin patogenezinde görev alma potansiyeli taşıyan farklı genlere ait mutasyonların fonksiyonel etkileri, hem genetik hem de epigenetik süreçler üzerinden değerlendirilmiştir. Bu mutasyonların belirlenmesi ve tedavi hedefi oluşturma potansiyellerinin değerlendirilmesi ile ulaşılan sonuçların, moleküler genetiği hakkında çok az

bilgi bulunan bu kanser tipi ile ilgili literatüre katkı sağlamasını ve yeni çalışmaların yolunu açmasını umut etmekteyiz.

6. Sonuç

Sonuç olarak, bilinen ve yeni tanımlanan mutasyonların, genetik bilginin çok kısıtlı olduğu paranasal sinüs kanserleri hakkında literatüre katkı sağlayarak kliniğe yansıyacak çıktıların zeminini oluşturmasını umut etmekteyiz.

Referanslar

- Abbasi, W. A., Hassan, F. U., Yaseen, A., ve Minhas, F. U. A. A. (2017). ISLAND: In-silico prediction of proteins binding affinity using sequence descriptors. *arXiv*. <https://doi.org/10.1186/s13040-020-00231-w>
- Adel K. ElNaggar , John K.C. Chan, Jennifer R. Grandis, Takashi Takata, P. J. S. (2017). *WHO classification of Head and Neck tumors*. IARC Press: Lyon.
- Agarwala, R., Barrett, T., Beck, J., Benson, D. A., Bollin, C., Bolton, E., ... Zbicz, K. (2018). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>
- Ajiya, A., Abdullahi, H., ve Shuaibu, I. Y. (2020). Clinicopathologic profile of sinonasal neoplasia in Kano, Northwestern Nigeria: A 10-year single-institution experience. *Annals of African Medicine*. https://doi.org/10.4103/aam.aam_46_19
- Alvarado, D., Ligon, G. F., Lillquist, J. S., Seibel, S. B., Wallweber, G., Neumeister, V. M., ... LaVallee, T. M. (2017). ErbB activation signatures as potential biomarkers for anti-ErbB3 treatment in HNSCC. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181356>
- Bandoh, N., Hayashi, T., Kishibe, K., Takahara, M., Imada, M., Nonaka, S., ve Harabuchi, Y. (2002). Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Cancer*. <https://doi.org/10.1002/cncr.10388>
- Bandoh, N., Hayashi, T., Takahara, M., Kishibe, K., Ogino, T., Katayama, A., ... Harabuchi, Y. (2004). VEGF and bFGF expression and microvessel density of maxillary sinus squamous cell carcinoma in relation to p53 status, spontaneous apoptosis and prognosis. *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.11.031>
- Bandoh, N., Hayashi, T., Takahara, M., Kishibe, K., Ogino, T., Katayama, A., ... Harabuchi, Y. (2005). Loss of p21 expression is associated with p53 mutations and increased cell proliferation and p27 expression is associated with apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Acta Oto-Laryngologica*. <https://doi.org/10.1080/00016480410023056>
- Bell, D., Bell, A. H., Kupferman, M. E., Prieto, V. G., Weber, R. S., ve Hanna, E. Y. (2019). Comparative transcriptome analysis of sinonasal inverted papilloma and associated squamous cell carcinoma: Out-HOXing developmental genes. *Head and Neck*. <https://doi.org/10.1002/hed.25795>
- Betge, J., Kerr, G., Miersch, T., Leible, S., Erdmann, G., Galata, C. L., ... Boutros, M. (2015). Amplicon sequencing of colorectal cancer: Variant calling in frozen and formalin-fixed

- samples. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127146>
- Biray Avci, C., Sezgin, B., Goker Bagca, B., Karci, H. B., ve Gode, S. (2020). PI3K/AKT/mTOR pathway and autophagy regulator genes in paranasal squamous cell carcinoma metastasis. *Molecular Biology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05458-8>
- Birkeland, A. C., Yanik, M., Tillman, B. N., Scott, M. V., Foltin, S. K., Mann, J. E., ... Brenner, J. C. (2016). Identification of targetable ERBB2 aberrations in head and neck squamous cell carcinoma. *JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2016.0335>
- Black, L. E., Longo, J. F., ve Carroll, S. L. (2019). Mechanisms of Receptor Tyrosine-Protein Kinase ErbB-3 (ERBB3) Action in Human Neoplasia. *American Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.06.008>
- Bornholdt, J., Hansen, J., Steiniche, T., Dictor, M., Antonsen, A., Wolff, H., ... Wallin, H. (2008). K-ras mutations in sinonasal cancers in relation to wood dust exposure. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-53>
- Bossi, R. T., Saccardo, M. B., Ardini, E., Menichincheri, M., Rusconi, L., Magnaghi, P., ... Bertrand, J. A. (2010). Crystal structures of anaplastic lymphoma kinase in complex with ATP competitive inhibitors. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi1005514>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., ve Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brown, N. A., Plouffe, K. R., Yilmaz, O., Weindorf, S. C., Betz, B. L., Carey, T. E., ... Udager, A. M. (2020). TP53 mutations and CDKN2A mutations/deletions are highly recurrent molecular alterations in the malignant progression of sinonasal papillomas. *Modern Pathology*. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-00716-3>
- Cabal, V. N., Menéndez, M., Vivanco, B., Potes-Ares, S., Riobello, C., Suárez-Fernández, L., ... Hermsen, M. A. (2020). EGFR mutation and HPV infection in sinonasal inverted papilloma and squamous cell carcinoma. *Rhinology*. <https://doi.org/10.4193/Rhin19.371>
- Campbell, M. R., Amin, D., ve Moasser, M. M. (2010). HER3 comes of age: New insights into its functions and role in signaling, tumor biology, and cancer therapy. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1218>
- Cappello, Z. J., ve Dublin, A. B. (2019). *Anatomy, Head and Neck, Nose Paranasal Sinuses*.

StatPearls.

- Castellano, E., ve Downward, J. (2011). Ras interaction with PI3K: More than just another effector pathway. *Genes and Cancer*. <https://doi.org/10.1177/1947601911408079>
- Castellano, E., ve Santos, E. (2011). Functional specificity of Ras isoforms: So similar but so different. *Genes and Cancer*. <https://doi.org/10.1177/1947601911408081>
- Casula, M., Paliogiannis, P., Ayala, F., De Giorgi, V., Stanganelli, I., Mandalà, M., ... Di Giacomo, A. M. (2019). Germline and somatic mutations in patients with multiple primary melanomas: A next generation sequencing study. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5984-7>
- Chang, P. H., Huang, C. C., Lee, T. J., Lee, Y. S., ve Tsai, C. N. (2012). Downregulation of DLEC1 in sinonasal inverted papilloma and squamous cell carcinoma. *Journal of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. <https://doi.org/10.2310/7070.2011.110202>
- Chauhan, J. S., Mishra, N. K., ve Raghava, G. P. S. (2009). Identification of ATP binding residues of a protein from its primary sequence. *BMC bioinformatics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-434>
- Chauhan, J. S., Mishra, N. K., ve Raghava, G. P. S. (2010). Prediction of GTP interacting residues, dipeptides and tripeptides in a protein from its evolutionary information. *BMC Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-301>
- Chen, P. H., Chen, X., ve He, X. (2013). Platelet-derived growth factors and their receptors: Structural and functional perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.10.015>
- Chen, Y., Huang, L., Dong, Y., Tao, C., Zhang, R., Shao, H., ve Shen, H. (2020). Effect of AKT1 (p. E17K) Hotspot Mutation on Malignant Tumorigenesis and Prognosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.573599>
- Chène, P. (2001). The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204373>
- Chmelařová, M., Sirák, I., Mžik, M., Siegllová, K., Vošmiková, H., Dundr, P., ... Laco, J. (2016). Importance of Tumour Suppressor Gene Methylation in Sinonasal Carcinomas. *Folia biologica*.
- Choe, J. Y., Nam, S. J., Yun, J. Y., ve Kim, J. E. (2012). Expression of c-met is different along the location and associated with lymph node metastasis of head and neck carcinoma. *Korean Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.4132/KoreanJPathol.2012.46.6.515>

- Chou, C. H., Shrestha, S., Yang, C. D., Chang, N. W., Lin, Y. L., Liao, K. W., ... Huang, H. Da. (2018). MiRTarBase update 2018: A resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1067>
- Chu, N., Viennet, T., Bae, H., Salguero, A., Boeszoermenyi, A., Arthanari, H., ve Cole, P. A. (2020). The structural determinants of ph domain-mediated regulation of akt revealed by segmental labeling. *eLife*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.59151>
- Chung, C. H., Guthrie, V. B., Masica, D. L., Tokheim, C., Kang, H., Richmon, J., ... Bishop, J. A. (2015). Genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma determined by cancer gene-targeted sequencing. *Annals of Oncology*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv109>
- Cohen, N., Fedewa, S., ve Chen, A. Y. (2018). Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2018.06.001>
- Costales, M., López-Hernández, A., García-Inclán, C., Vivanco, B., López, F., Llorente, J. L., ve Hermesen, M. A. (2016). Gene Methylation Profiling in Sinonasal Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*. <https://doi.org/10.1177/0194599816654139>
- Croce, M. V., Rabassa, M. E., Price, M. R., ve Segal-Eiras, A. (2001). MUC1 mucin and carbohydrate associated antigens as tumor markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathology and Oncology Research*. <https://doi.org/10.1007/BF03032385>
- Croessmann, S., Sheehan, J. H., Lee, K. min, Sliwoski, G., He, J., Nagy, R., ... Arteaga, C. L. (2018). PIK3CA C2 domain deletions hyperactivate phosphoinositide 3-kinase (PI3K), generate oncogene dependence, and are exquisitely sensitive to PI3Ka inhibitors. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2141>
- Cui, R., Kim, T., Fassan, M., Meng, W., Sun, H. L., Jeon, Y. J., ... Croce, C. M. (2015). MicroRNA-224 is implicated in lung cancer pathogenesis through targeting Caspase-3 and Caspase-7. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5224>
- Dai, J., Wang, J., Yang, L., Xiao, Y., ve Ruan, Q. (2015). MIR-125a regulates angiogenesis of gastric cancer by targeting vascular endothelial growth factor A. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3171>
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., ... Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*.

<https://doi.org/10.1038/nature00766>

- De Cola, A., Volpe, S., Budani, M. C., Ferracin, M., Lattanzio, R., Turdo, A., ... De Laurenzi, V. (2015). MIR-205-5p-mediated downregulation of ERBB/HER receptors in breast cancer stem cells results in targeted therapy resistance. *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.192>
- Diplas, B. H., He, X., Brosnan-Cashman, J. A., Liu, H., Chen, L. H., Wang, Z., ... Yan, H. (2018). The genomic landscape of TERT promoter wildtype-IDH wildtype glioblastoma. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04448-6>
- Dubey, R., ve Saini, N. (2015). STAT6 silencing up-regulates cholesterol synthesis via miR-197/FOXJ2 axis and induces ER stress-mediated apoptosis in lung cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.10.002>
- Dustin, D., Gu, G., ve Fuqua, S. A. W. (2019). ESR1 mutations in breast cancer. *Cancer*. <https://doi.org/10.1002/cncr.32345>
- El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., ve Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng0492-45>
- Elgart, K., ve Faden, D. L. (2020). Sinonasal Squamous Cell Carcinoma: Etiology, Pathogenesis, and the Role of Human Papilloma Virus. *Current Otorhinolaryngology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s40136-020-00279-6>
- Eura, M., Ogi, K., Chikamatsu, K., Lee, K. D., Nakano, K., Masuyama, K., ... Ishikawa, T. (1995). Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910640504>
- Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., ... Uhlen, M. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>
- Fang, K., Sideri, A., Law, I. K. M., Bakirtzi, K., Polyarchou, C., Iliopoulos, D., ve Pothoulakis, C. (2015). Identification of a Novel Substance P-Neurokinin-1 Receptor MicroRNA-221-5p Inflammatory Network in Human Colonic Epithelial Cells. *CMGH*. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.06.008>
- Fang, R., Xiao, T., Fang, Z., Sun, Y., Li, F., Gao, Y., ... Ji, H. (2012). MicroRNA-143 (miR-143) regulates cancer glycolysis via targeting hexokinase 2 gene. *Journal of Biological*

Chemistry. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373084>

- Farrell, N. F., Mace, J. C., Detwiller, K. Y., Li, R., Andersen, P. E., Smith, T. L., ... Geltzeiler, M. (2020). Predictors of survival outcomes in sinonasal squamous cell carcinoma: an analysis of the National Cancer Database. *International Forum of Allergy & Rhinology*. <https://doi.org/10.1002/alr.22737>
- Flanagan, C. A., Schnieders, E. A., Emerick, A. W., Kunisawa, R., Admon, A., ve Thorner, J. (1993). Phosphatidylinositol 4-kinase: Gene structure and requirement for yeast cell viability. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.8248783>
- Formosa, A., Lena, A. M., Markert, E. K., Cortelli, S., Miano, R., Mauriello, A., ... Candi, E. (2013). DNA methylation silences miR-132 in prostate cancer. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.14>
- Foster, B. M., Zaidi, D., Young, T. R., Mobley, M. E., ve Kerr, B. A. (2018). CD117/c-kit in cancer stem cell-mediated progression and therapeutic resistance. *Biomedicines*. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010031>
- Frierson, J., Stiles, W., McKillop, D., ve Bain, R. (1993). A woman with shock and normal cardiac output after acute MI. *Hospital Practice*. <https://doi.org/10.1080/21548331.1993.11442857>
- Gaborit, N., Lindzen, M., ve Yarden, Y. (2016). Emerging anti-cancer antibodies and combination therapies targeting HER3/ERBB3. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1102809>
- Gencel-Augusto, J., ve Lozano, G. (2020). p53 tetramerization: At the center of the dominant-negative effect of mutant p53. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.340976.120>
- George, R. E., Sanda, T., Hanna, M., Fröhling, S., Luther, W., Zhang, J., ... Look, A. T. (2008). Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature07397>
- González Manzano, R., Martínez Navarro, E., Eugenieva, E., Fernández Morejón, F. J., Farré, J., ve Brugarolas, A. (2008). A novel EGFR nonsense mutation in a non-small-cell lung cancer (NSCLC) patient who did not derive any clinical benefit with combination chemotherapy and erlotinib. *Clinical and Translational Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s12094-008-0229-2>
- Guo, G., Gong, K., Wohlfeld, B., Hatanpaa, K. J., Zhao, D., ve Habib, A. A. (2015). Ligand-independent EGFR signaling. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008->

5472.CAN-15-0989

- Gupta, B., Johnson, N. W., ve Kumar, N. (2016). Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology (Switzerland)*. <https://doi.org/10.1159/000446117>
- Han, Y., Wu, J., Yang, W., Wang, D., Zhang, T., ve Cheng, M. (2019). New STAT3-FOXL2 pathway and its function in cancer cells. *BMC Molecular and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1186/s12860-019-0206-3>
- Han, Z., Yang, Q., Liu, B., Wu, J., Li, Y., Yang, C., ve Jiang, Y. (2012). MicroRNA-622 functions as a tumor suppressor by targeting K-Ras and enhancing the anticarcinogenic effect of resveratrol. *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr226>
- Hanahan, D., ve Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., ve Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanieh, H. (2015). Aryl hydrocarbon receptor-microRNA-212/132 axis in human breast cancer suppresses metastasis by targeting SOX4. *Molecular Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0443-9>
- Hantschel, O., Grebien, F., ve Superti-Furga, G. (2012). The growing arsenal of ATP-competitive and allosteric inhibitors of BCR-ABL. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1276>
- Heinrich, M. C., Corless, C. L., Duensing, A., McGreevey, L., Chen, C. J., Joseph, N., ... Fletcher, J. A. (2003). PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1079666>
- Hiles, I. D., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M. J., Gout, I., Dhand, R., ... Waterfield, M. D. (1992). Phosphatidylinositol 3-kinase: Structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90166-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90166-A)
- Hobbs, G. A., Der, C. J., ve Rossman, K. L. (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.182873>
- Hoffmeyer, K., Junghans, D., Kanzler, B., ve Kemler, R. (2017). Trimethylation and Acetylation of β -Catenin at Lysine 49 Represent Key Elements in ESC Pluripotency. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.076>
- Holla, V. R., Elamin, Y. Y., Bailey, A. M., Johnson, A. M., Litzenburger, B. C., Khotskaya, Y. B., ... Simon, G. R. (2017). ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy.

Molecular Case Studies. <https://doi.org/10.1101/mcs.a001115>

- Holmila, R., Bornholdt, J., Saitiala, T., Cyr, D., Dictor, M., Steiniche, T., ... Husgafvel-Pursiainen, K. (2010). Profile of TP53 gene mutations in sinonasal cancer. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.12.003>
- Hong, L., Pan, F., Jiang, H., Zhang, L., Liu, Y., Cai, C., ... Chen, Z. (2016). miR-125b inhibited epithelial–mesenchymal transition of triple-negative breast cancer by targeting MAP2K7. *OncoTargets and Therapy*. <https://doi.org/10.2147/OTT.S102713>
- Hongo, T., Yamamoto, H., Jiromaru, R., Nozaki, Y., Yasumatsu, R., Hashimoto, K., ... Oda, Y. (2021). Clinicopathologic significance of EGFR mutation and HPV infection in sinonasal squamous cell carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology*. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001566>
- Horn, L., ve Pao, W. (2009). EML4-ALK: Honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.6661>
- Hu, C., Quan, H., Yan, L., Sun, J., Lan, L., ve Wang, S. (2020). Prevalence of human papillomavirus in sinonasal squamous cell carcinoma with and without association of inverted papilloma in Eastern China. *Infectious Agents and Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s13027-020-00298-4>
- Hu, C., Wang, H., Lin, L., Sun, X., ve Wang, D. (2020). Association between carbonic anhydrase 9 expression and poor prognosis in sinonasal squamous cell carcinoma. *Annals of Diagnostic Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2020.151643>
- Hu, S., Sun, Y., Meng, Y., Wang, X., Yang, W., Fu, W., ... Guo, Y. (2015). Molecular architecture of the ErbB2 extracellular domain homodimer. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2713>
- Huang, C. C., Lee, T. J., Chang, P. H., Lee, Y. S., Chuang, C. C., Jhang, Y. J., ... Tsai, C. N. (2010). Desmoglein 3 is overexpressed in inverted papilloma and squamous cell carcinoma of sinonasal cavity. *Laryngoscope*. <https://doi.org/10.1002/lary.20151>
- Huang, H. (2018). Anaplastic lymphoma kinase (Alk) receptor tyrosine kinase: A catalytic receptor with many faces. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19113448>
- Hunt, S. E., McLaren, W., Gil, L., Thormann, A., Schuilenburg, H., Sheppard, D., ... Cunningham, F. (2018). Ensembl variation resources. *Database: the journal of biological databases and curation*. <https://doi.org/10.1093/database/bay119>

- Hussain, M. R. M., Baig, M., Mohamoud, H. S. A., Ulhaq, Z., Hoessli, D. C., Khogeer, G. S., ... Al-Aama, J. Y. (2015). BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.10.002>
- Jamieson, S., Butzow, R., Andersson, N., Alexiadis, M., Unkila-Kallio, L., Heikinheimo, M., ... Anttonen, M. (2010). The FOXL2 C134W mutation is characteristic of adult granulosa cell tumors of the ovary. *Modern Pathology*. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.145>
- Jarzynski, A., Papiernik, K., ve Polz-Dacewicz, M. (2016). Analysis of mutation and promoter methylation of TP53 gene in tumors of the head and neck. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. <https://doi.org/10.1515/cipms-2016-0011>
- Jesionek-Kupnicka, D., Szybka, M., Malachowska, B., Fendler, W., Potemski, P., Piaskowski, S., ... Zawlik, I. (2014). TP53 promoter methylation in primary glioblastoma: Relationship with TP53 mRNA and protein expression and mutation status. *DNA and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2201>
- Jin, J., Lee, J. W., Rha, K. S., Kim, D. W., ve Kim, Y. M. (2012). Expression pattern of IQGAP1 in sinonasal inverted papillomas and squamous cell carcinomas. *Laryngoscope*. <https://doi.org/10.1002/lary.23541>
- Jiromaru, R., Yamamoto, H., Yasumatsu, R., Hongo, T., Nozaki, Y., Hashimoto, K., ... Oda, Y. (2020). HPV-related Sinonasal Carcinoma: Clinicopathologic Features, Diagnostic Utility of p16 and Rb Immunohistochemistry, and EGFR Copy Number Alteration. *American Journal of Surgical Pathology*. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001410>
- Jo, V. Y., Chau, N. G., Hornick, J. L., Krane, J. F., ve Sholl, L. M. (2017). Recurrent IDH2 R172X mutations in sinonasal undifferentiated carcinoma. *Modern Pathology*. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.239>
- Jura, N., Shan, Y., Cao, X., Shaw, D. E., ve Kuriyan, J. (2009). Structural analysis of the catalytically inactive kinase domain of the human EGF receptor 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912101106>
- Kakizaki, T., Hatakeyama, H., Nakamaru, Y., Takagi, D., Mizumachi, T., Sakashita, T., ... Fukuda, S. (2017). Role of microRNA-296-3p in the malignant transformation of sinonasal inverted papilloma. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6193>

- Kamato, D., Mitra, P., Davis, F., Osman, N., Chaplin, R., Cabot, P. J., ... Little, P. J. (2017). Gaq proteins: molecular pharmacology and therapeutic potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2405-9>
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M., ve Tanabe, M. (2021). KEGG: Integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa970>
- Kang, J. H., Kim, S. J., Noh, D. Y., Park, I. A., Choe, K. J., Yoo, O. J., ve Kang, H. S. (2001). Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: Correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Laboratory Investigation*. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780266>
- Kanojia, D., Nagata, Y., Garg, M., Lee, D. H., Sato, A., Yoshida, K., ... Phillip Koeffler, H. (2015). Genomic landscape of liposarcoma. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6464>
- Kiavue, N., Cabel, L., Melaabi, S., Bataillon, G., Callens, C., Lerebours, F., ... Bidard, F. C. (2020). ERBB3 mutations in cancer: biological aspects, prevalence and therapeutics. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1001-5>
- Kim, M., Kogan, N., ve Slack, F. J. (2016). Cis-acting elements in its 3' UTR mediate post-transcriptional regulation of KRAS. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7599>
- Kim, S. G., Lee, O. Y., Choi, J. W., Park, Y. H., Kim, Y. M., Yeo, M. K., ... Rha, K. S. (2011). Pattern of expression of cell cycle-related proteins in malignant transformation of sinonasal inverted papilloma. *American Journal of Rhinology and Allergy*. <https://doi.org/10.2500/ajra.2011.25.3566>
- Kim, S., ve Jeong, S. (2019). Mutation hotspots in the β -catenin gene: Lessons from the human cancer genome databases. *Molecules and Cells*. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0436>
- Kinoshita, T., Nohata, N., Yoshino, H., Hanazawa, T., Kikawa, N., Fujimura, L., ... Seki, N. (2012). Tumor suppressive microRNA-375 regulates lactate dehydrogenase B in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1196>
- König, M., Osnes, T., Bratland, Å., ve Meling, T. R. (2019). Squamous Cell Carcinoma of the Paranasal Sinuses: A Single Center Experience. *Journal of Neurological Surgery Part B:*

- Skull Base*. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1694967>
- Koo, B. S., Jung, B. J., Kim, S. G., Liang, Z. L., Kim, J. M., Yeo, M. K., ve Rha, K. S. (2011). Altered expression of E-cadherin and β -catenin in malignant transformation of sinonasal inverted papillomas. *Rhinology*. <https://doi.org/10.4193/Rhino10.214>
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., ve Yanagawa, H. (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900604106>
- Kovářiková, H., Baranová, I., Laco, J., Rozkošová, K., Vošmiková, H., Vošmik, M., ... Chmelařová, M. (2019). Deregulation of selected microRNAs in sinonasal squamous cell carcinoma: Searching for potential prognostic biomarkers. *Folia Biologica (Czech Republic)*.
- Kovarikova, H., Bubancova, I., Laco, J., Sieglova, K., Vosmikova, H., Vosmik, M., ... Chmelarova, M. (2017). Deregulation of selected microRNAs in sinonasal carcinoma: Value of miR-21 as prognostic biomarker in sinonasal squamous cell carcinoma. *Head and Neck*. <https://doi.org/10.1002/hed.24930>
- Kovtunen, O. V., Bakaiev, A. A., ve Shponka, I. S. (2019). Analysis of expression of p63 and caspase-3 and their predictive value in patients with squamous cell carcinoma of maxillary sinus. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)*. <https://doi.org/10.36740/wlek201912108>
- Kuijpers, J. L. P., Louwman, M. W. J., Peters, R., Janssens, G. O. R. J., Burdorf, A., ve Coebergh, J. W. W. (2012). Trends in sinonasal cancer in the Netherlands: More squamous cell cancer, less adenocarcinoma: A population-based study 1973-2009. *European Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.05.003>
- Kumar, M., Lu, Z., Takwi, A. A. L., Chen, W., Callander, N. S., Ramos, K. S., ... Li, Y. (2011). Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.457>
- Kumar, Manish, Gromiha, M. M., ve Raghava, G. P. S. (2007). Identification of DNA-binding proteins using support vector machines and evolutionary profiles. *BMC Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-463>
- Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., ... Weirauch, M. T. (2018). The Human Transcription Factors. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029>

- Lee, G. H., Yoon, Y. H., Kim, Y. M., Yeo, M. K., Liang, Z. L., Kim, J. M., ve Rha, K. S. (2012). Pattern of expression of cyclooxygenase-2 in malignant transformation of sinonasal inverted papilloma. *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2012.03.003>
- Lee, J. W., Jin, J., Rha, K. S., ve Kim, Y. M. (2012). Expression pattern of apurinic/aprimidinic endonuclease in sinonasal squamous cell carcinoma. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*. <https://doi.org/10.1177/0194599812449987>
- Li, Hongbing, Hu, L., Zhang, H., ve Wang, D. (2019). ErbB1 and ErbB2 overexpression in patients with sinonasal inverted papilloma and inverted papilloma with squamous cell carcinoma in China. *Acta Oto-Laryngologica*. <https://doi.org/10.1080/00016489.2019.1650200>
- Li, Hui, Zeng, Z. H., Wang, L. H., ve Wang, J. Q. (2004). Expression and correlation of apoptosis-related gene c-IAP2 and caspase-4 in sinonasal squamous carcinoma. *Zhonghua er bi yan hou ke za zhi*.
- Li, J., You, T., ve Jing, J. (2014). MiR-125b inhibits cell biological progression of Ewing's sarcoma by suppressing the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Proliferation*. <https://doi.org/10.1111/cpr.12093>
- Li, Jing, Wang, B., ve Guo, L. (2007). [Expressions and significances of EGFR, C-erbB2 and Ki-67 in nasal squamous cell carcinomas]. *Lin chuang er bi yan hou tou jing wai ke za zhi = Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery*.
- Li, L., ve Zhu, L. (2017). Expression and clinical significance of TrkB in sinonasal squamous cell carcinoma: a pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2016.09.027>
- Li, M. M., Datto, M., Duncavage, E. J., Kulkarni, S., Lindeman, N. I., Roy, S., ... Nikiforova, M. N. (2017). Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *Journal of Molecular Diagnostics*. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.10.002>
- Li, X., Yao, N., Zhang, J., ve Liu, Z. (2015). MicroRNA-125b is involved in atherosclerosis obliterans in vitro by targeting podocalyxin. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3384>

- Liang, J., Wu, Y. L., Chen, B. J., Zhang, W., Tanaka, Y., ve Sugiyama, H. (2013). The C-Kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *International Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6087>
- Liang, S. H., ve Clarke, M. F. (2001). Regulation of p53 localization. *European Journal of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02227.x>
- Liberti, M. V., ve Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Ligresti, G., Militello, L., Steelman, L. S., Cavallaro, A., Basile, F., Nicoletti, F., ... Libra, M. (2009). PIK3CA mutations in human solid tumors Role in sensitivity to various therapeutic approaches. *Cell Cycle*. <https://doi.org/10.4161/cc.8.9.8255>
- Lin, K. Y., Ye, H., Han, B. W., Wang, W. T., Wei, P. P., He, B., ... Chen, Y. Q. (2016). Genome-wide screen identified let-7c/miR-99a/miR-125b regulating tumor progression and stem-like properties in cholangiocarcinoma. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.396>
- Liu, Haijing, Zhang, B., ve Sun, Z. (2020). Spectrum of EGFR aberrations and potential clinical implications: insights from integrative pan-cancer analysis. *Cancer Communications*. <https://doi.org/10.1002/cac2.12005>
- Liu, Huailei, Li, C., Shen, C., Yin, F., Wang, K., Liu, Y., ... Zhao, S. (2015). MiR-212-3p inhibits glioblastoma cell proliferation by targeting SGK3. *Journal of Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s11060-015-1736-y>
- Liu, Jiajia, Tang, Q., Li, S., ve Yang, X. (2016). Inhibition of HAX-1 by miR-125a reverses cisplatin resistance in laryngeal cancer stem cells. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13424>
- Liu, Juan, Zhang, C., Zhao, Y., ve Feng, Z. (2017). MicroRNA Control of p53. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.25609>
- Liu, X. F. (1992). Detection of G-T mutations at codon 12 of c-Ha-ras oncogenes in squamous cell carcinomas of the sinus maxillaris. *Zhonghua er bi yan hou ke za zhi*.
- Liu, Y., Zeng, H., Wang, K., Li, Y., Tian, P., ve Li, W. (2020). Acquired BRAF N581S mutation mediated resistance to gefitinib and responded to dabrafenib plus trametinib. *Lung Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.06.004>
- Liu, Z., Smith, K. R., Khong, H. T., Huang, J., Ahn, E. Y. E., Zhou, M., ve Tan, M. (2016). miR-125b regulates differentiation and metabolic reprogramming of T cell acute lymphoblastic leukemia by directly targeting A20. *Oncotarget*.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.12018>

- López, F., García Inclán, C., Pérez-Escuredo, J., Álvarez Marcos, C., Scola, B., Suárez, C., ... Hermesen, M. A. (2012). KRAS and BRAF mutations in sinonasal cancer. *Oral Oncology*. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.02.018>
- López, F., Llorente, J. L., Oviedo, C. M., Vivanco, B., Marcos, C. Á., García-Inclán, C., ... Hermesen, M. A. (2012). Gene amplification and protein overexpression of EGFR and ERBB2 in sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer*. <https://doi.org/10.1002/cncr.26451>
- Lu, H., ve Kang, F. (2020). Down-regulating NEAT1 inhibited the viability and vasculogenic mimicry formation of sinonasal squamous cell carcinoma cells via miR-195-5p/VEGFA axis. *Bioscience Reports*. <https://doi.org/10.1042/BSR20201373>
- Lu, M., Wang, T., He, M., Cheng, W., Yan, T., Huang, Z., ... Liu, P. (2017). Tumor suppressor role of miR-3622b-5p in ERBB2-positive cancer. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14968>
- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., ... Marchler-Bauer, A. (2020). CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz991>
- Mack, P. C., Banks, K. C., Espenschied, C. R., Burich, R. A., Zill, O. A., Lee, C. E., ... Gandara, D. R. (2020). Spectrum of driver mutations and clinical impact of circulating tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer: Analysis of over 8000 cases. *Cancer*. <https://doi.org/10.1002/cncr.32876>
- Madsen, R. R., Vanhaesebroeck, B., ve Semple, R. K. (2018). Cancer-Associated PIK3CA Mutations in Overgrowth Disorders. *Trends in Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.08.003>
- Maisch, S., Mueller, S. K., Traxdorf, M., Weyerer, V., Stoehr, R., Iro, H., ... Agaimy, A. (2020). Sinonasal papillomas: A single centre experience on 137 cases with emphasis on malignant transformation and EGFR/KRAS status in “carcinoma ex papilloma”. *Annals of Diagnostic Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2020.151504>
- Mansour, H., Ouhajjou, A., Bajic, V. B., ve Incitti, R. (2020). Next-Generation Sequencing at High Sequencing Depth as a Tool to Study the Evolution of Metastasis Driven by Genetic Change Events of Lung Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01215>
- Mantovani, F., Collavin, L., ve Del Sal, G. (2019). Mutant p53 as a guardian of the cancer

- cell. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0246-9>
- Maurizi, M., Almadori, G., Ferrandina, G., Distefano, M., Romanini, M. E., Cadoni, G., ... Mancuso, S. (1996). Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.525>
- May, P., ve May, E. (1999). Twenty years of p53 research: Structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203285>
- Maziarz, M., Leyme, A., Marivin, A., Luebbbers, A., Patel, P. P., Chen, Z., ... Garcia-Marcos, M. (2018). Atypical activation of the G protein Gαq by the oncogenic mutation Q209P. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005291>
- McConechy, M. K., Ding, J., Cheang, M. C. U., Wiegand, K. C., Senz, J., Tone, A. A., ... Huntsman, D. G. (2012). Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas. *Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1002/path.4056>
- McDermott, U., Ames, R. Y., Iafrate, A. J., Maheswaran, S., Stubbs, H., Greninger, P., ... Settleman, J. (2009). Ligand-dependent platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)-α activation sensitizes rare lung cancer and sarcoma cells to PDGFR kinase inhibitors. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4327>
- McGirt, L. Y., Jia, P., Baerenwald, D. A., Duszynski, R. J., Dahlman, K. B., Zic, J. A., ... Eischen, C. M. (2015). Whole-genome sequencing reveals oncogenic mutations in mycosis fungoides. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-611194>
- McLure, K. G., ve Lee, P. W. K. (1998). How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3342>
- Meng, Z., Zhu, S., Liu, N., ve Tian, J. (2020). miR-362-3p suppresses sinonasal squamous cell carcinoma progression via directly targeting pituitary tumor-transforming gene 1. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. <https://doi.org/10.1080/10799893.2020.1839766>
- Miao, B., Skidan, I., Yang, J., Lugovskoy, A., Reibarkh, M., Long, K., ... Degterev, A. (2010). Small molecule inhibition of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) binding to pleckstrin homology domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004522107>
- Miled, N., Yan, Y., Hon, W. C., Perisic, O., Zvelebil, M., Inbar, Y., ... Williams, R. L. (2007). Mechanism of two classes of cancer mutations in the phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1135394>

- Mishra, R., Hanker, A. B., ve Garrett, J. T. (2017). Genomic alterations of ERBB receptors in cancer: Clinical implications. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22825>
- Mundi, P. S., Sachdev, J., McCourt, C., ve Kalinsky, K. (2016). AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *British Journal of Clinical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/bcp.13021>
- Muñoz-Cordero, M. G., López, F., García-Inclán, C., López-Hernández, A., Potes-Ares, S., Fernández-Vañes, L., ... Hermesen, M. (2019). Predictive value of EGFR-PI3K-pAKT-mTOR-pS6 pathway in sinonasal squamous cell carcinomas. *Acta Otorrinolaringologica Espanola*. <https://doi.org/10.1016/j.otorri.2017.10.005>
- Murphrey, M. B., ve Varacallo, M. (2019). *Biochemistry, Epidermal Growth Factor Receptor. StatPearls*.
- Nakhaeizadeh, H., Amin, E., Nakhaei-Rad, S., Dvorsky, R., ve Ahmadian, M. R. (2016). The RAS-effector interface: Isoform-specific differences in the effector binding regions. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167145>
- Nguyen, D., Lin, L. Y., Zhou, J. O., Kibby, E., Sia, T. W., Tillis, T. D., ... Fera, D. (2020). Identification and Characterization of a B-Raf Kinase α -Helix Critical for the Activity of MEK Kinase in MAPK Signaling. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00598>
- Niu, G., Wright, K. L., Ma, Y., Wright, G. M., Huang, M., Irby, R., ... Yu, H. (2005). Role of Stat3 in Regulating p53 Expression and Function. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.17.7432-7440.2005>
- Nohata, N., Hanazawa, T., Kikkawa, N., Sakurai, D., Fujimura, L., Chiyomaru, T., ... Seki, N. (2011). Tumour suppressive microRNA-874 regulates novel cancer networks in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.311>
- Nohata, Nijiro, Hanazawa, T., Kikkawa, N., Sakurai, D., Sasaki, K., Chiyomaru, T., ... Seki, N. (2011). Identification of novel molecular targets regulated by tumor suppressive miR-1/miR-133a in maxillary sinus squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1096>
- Nukpook, T., Nukpook, T., Ekalaksananan, T., Ekalaksananan, T., Teeramatwanich, W., Teeramatwanich, W., ... Pientong, C. (2020). Prevalence and association of Epstein-Barr virus infection with sinonasal inverted papilloma and sinonasal squamous cell carcinoma in the northeastern Thai population. *Infectious Agents and Cancer*.

<https://doi.org/10.1186/s13027-020-00308-5>

- Ogino, T., Bandoh, N., Hayashi, T., Miyokawa, N., Harabuchi, Y., ve Ferrone, S. (2003). Association of tapasin and HLA class I antigen down-regulation in primary maxillary sinus squamous cell carcinoma lesions with reduced survival of patients. *Clinical Cancer Research*.
- Oncel, S., Cosgul, T., Calli, A., Calli, C., ve Pinar, E. (2011). Evaluation of P53, P63, P21, P27, Ki-67 in Paranasal Sinus Squamous Cell Carcinoma and Inverted Papilloma. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery*. <https://doi.org/10.1007/s12070-011-0252-4>
- Ono, T., Tanaka, N., Umeno, H., Chitose, S. ichi, Shin, B., Aso, T., ... Abe, T. (2017). Treatment outcomes of locally advanced squamous cell carcinoma of the maxillary sinus treated with chemoradioselection using superselective intra-arterial cisplatin and concomitant radiation: Implications for prognostic factors. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.10.003>
- Orellana, L., Thorne, A. H., Lema, R., Gustavsson, J., Parisian, A. D., Hospital, A., ... Orozco, M. (2019). Oncogenic mutations at the EGFR ectodomain structurally converge to remove a steric hindrance on a kinase-coupled cryptic epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821442116>
- Özkaya Akagündüz, Ö., Cosgun, G., Esassolak, M., Veral, A., Caner, A., Akyıldız, S., ... Öztürk, K. (2019). Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi veri tabanında kayıtlı baş-boyun kanserli olguların epidemiyolojik ve genel sağ kalım özellikleri. *Ege Tıp Dergisi*. <https://doi.org/10.19161/etd.668516>
- Pahuja, K. B., Nguyen, T. T., Jaiswal, B. S., Prabhash, K., Thaker, T. M., Senger, K., ... Seshagiri, S. (2018). Actionable Activating Oncogenic ERBB2/HER2 Transmembrane and Juxtamembrane Domain Mutations. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.09.010>
- Parish, A. J., Nguyen, V., Goodman, A. M., Murugesan, K., Frampton, G. M., ve Kurzrock, R. (2018). GNAS, GNAQ, and GNA11 alterations in patients with diverse cancers. *Cancer*. <https://doi.org/10.1002/cnrc.31724>
- PDQ Editorial Board. (2019). Paranasal Sinus and Nasal Cavity Cancer Treatment (Adult) (PDQ®): Health Professional Version.
- Pham, D. M., Guhan, S., ve Tsao, H. (2020). Kit and melanoma: Biological insights and

- clinical implications. *Yonsei Medical Journal*. <https://doi.org/10.3349/ymj.2020.61.7.562>
- Pisapia, P., Pepe, F., Iaccarino, A., Sgariglia, R., Nacchio, M., Russo, G., ... Troncone, G. (2020). BRAF: A Two-Faced Janus. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells9122549>
- Qu, W., Ding, S. mei, Cao, G., Wang, S. jiao, Zheng, X. hong, ve Li, G. hui. (2016). miR-132 mediates a metabolic shift in prostate cancer cells by targeting Glut1. *FEBS Open Bio*. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12086>
- Qu, X., Chen, Z., Fan, D., Sun, C., ve Zeng, Y. (2016). MiR-132-3p regulates the osteogenic differentiation of thoracic ligamentum flavum cells by inhibiting multiple osteogenesis-related genes. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms17081370>
- Quan, H., Yan, L., Wang, S., ve Wang, S. (2019). Clinical relevance and significance of programmed death-ligand 1 expression, tumor-infiltrating lymphocytes, and p16 status in sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer Management and Research*. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S201568>
- Rahman, Q. B., Iocca, O., Kufta, K., ve Shanti, R. M. (2020). Global Burden of Head and Neck Cancer. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2020.04.002>
- Raj, N., ve Attardi, L. D. (2017). The transactivation domains of the p53 protein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026047>
- Razzaque, M. A., Nishizawa, T., Komoike, Y., Yagi, H., Furutani, M., Amo, R., ... Matsuoka, R. (2007). Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng2078>
- Reisman, D., Greenberg, M., ve Rotter, V. (1988). Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5146>
- Retzlaff, M., Rohrberg, J., Küpper, N. J., Lagleder, S., Bepperling, A., Manzenrieder, F., ... Buchner, J. (2013). The regulatory domain stabilizes the p53 tetramer by intersubunit contacts with the DNA binding domain. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.10.015>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the

Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*.
<https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

- Riobello, C., López-Hernández, A., Cabal, V. N., García-Marín, R., Suárez-Fernández, L., Sánchez-Fernández, P., ... Hermesen, M. A. (2020). IDH2 Mutation Analysis in Undifferentiated and Poorly Differentiated Sinonasal Carcinomas for Diagnosis and Clinical Management. *American Journal of Surgical Pathology*.
<https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001420>
- Riobello, C., Vivanco, B., Reda, S., López-Hernández, A., García-Inclán, C., Potes-Ares, S., ... Hermesen, M. A. (2018). Programmed death ligand-1 expression as immunotherapeutic target in sinonasal cancer. *Head and Neck*.
<https://doi.org/10.1002/hed.25067>
- Rodrigues, C. H. M., Ascher, D. B., ve Pires, D. E. V. (2018). Kinact: A computational approach for predicting activating missense mutations in protein kinases. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gky375>
- Rosen, R. D., ve Sapra, A. (2020). TNM Classification. Treasure Island (FL).
- Roskoski, R. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002>
- Ryu, S., Youn, C., Moon, A. R., Howland, A., Armstrong, C. A., ve Song, P. I. (2017). Therapeutic Inhibitors against Mutated BRAF and MEK for the Treatment of Metastatic Melanoma. *Chonnam Medical Journal*. <https://doi.org/10.4068/cmj.2017.53.3.173>
- Saeed, W. H., Eissa, A. A., ve Al-Doski, A. A. (2019). Impact of TP53 gene promoter methylation on chronic lymphocytic leukemia pathogenesis and progression. *Journal of Blood Medicine*. <https://doi.org/10.2147/JBM.S221707>
- Sahnane, N., Ottini, G., Turri-Zanoni, M., Furlan, D., Battaglia, P., Karligkiotis, A., ... Facco, C. (2019). Comprehensive analysis of HPV infection, EGFR exon 20 mutations and LINE1 hypomethylation as risk factors for malignant transformation of sinonasal-inverted papilloma to squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*.
<https://doi.org/10.1002/ijc.31971>
- Saldaña-Meyer, R., ve Recillas-Targa, F. (2011). Transcriptional and epigenetic regulation of the p53 tumor suppressor gene. *Epigenetics*. <https://doi.org/10.4161/epi.6.9.16683>
- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W. K., Luna, A., La, K. C., ... Schultz, N. (2018). Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.035>

- Sasaki, E., Nishikawa, D., Hanai, N., Hasegawa, Y., ve Yatabe, Y. (2018). Sinonasal squamous cell carcinoma and EGFR mutations: a molecular footprint of a benign lesion. *Histopathology*. <https://doi.org/10.1111/his.13732>
- Schröck, A., Göke, F., Wagner, P., Bode, M., Franzen, A., Braun, M., ... Perner, S. (2013). Sex Determining Region Y-Box 2 (SOX2) Amplification Is an Independent Indicator of Disease Recurrence in Sinonasal Cancer. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059201>
- Sclafani, F., Wilson, S. H., Cunningham, D., Gonzalez De Castro, D., Kalaitzaki, E., Begum, R., ... Chau, I. (2020). Analysis of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and TP53 mutations in a large prospective series of locally advanced rectal cancer patients. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.32507>
- Scott, G. K., Goga, A., Bhaumik, D., Berger, C. E., Sullivan, C. S., ve Benz, C. C. (2007). Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609383200>
- Ségaligny, A. I., Tellez-Gabriel, M., Heymann, M. F., ve Heymann, D. (2015). Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *Journal of Bone Oncology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2015.01.001>
- Shimura, T., Tada, Y., Hirai, H., Kawakita, D., Kano, S., Tsukahara, K., ... Nagao, T. (2018). Prognostic and histogenetic roles of gene alteration and the expression of key potentially actionable targets in salivary duct carcinomas. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22927>
- Sjöstedt, S., Jensen, D. H., Jakobsen, K. K., Grønhøj, C., Geneser, C., Karnov, K., ... von Buchwald, C. (2018). Incidence and survival in sinonasal carcinoma: a Danish population-based, nationwide study from 1980 to 2014. *Acta Oncologica*. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1454603>
- Song, C., Wu, G., Xiang, A., Zhang, Q., Li, W., Yang, G., ... Li, X. (2015). Over-expression of miR-125a-5p inhibits proliferation in C2C12 myoblasts by targeting E2F3. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv006>
- Stasikowska-Kanicka, O., Wagrowska-Danilewicz, M., ve Danilewicz, M. (2013). Immunohistochemical study on survivin in sinonasal tumors and its relationship with the immunoexpression of Ki67 and Bcl-2. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. <https://doi.org/10.5603/FHC.2013.0032>

- Stasikowska-Kanicka, O., Wągrowska-Danilewicz, M., ve Danilewicz, M. (2016). Immunohistochemical Study EMT-Related Proteins in HPV-, and EBV-Negative Patients with Sinonasal Tumours. *Pathology and Oncology Research*. <https://doi.org/10.1007/s12253-016-0068-3>
- Stuart, D. D. (2017). Next-Generation Strategies to Target RAF. İçinde *Conquering RAS: From Biology to Cancer Therapy*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803505-4.00010-2>
- Sullivan, K. D., Galbraith, M. D., Andrysik, Z., ve Espinosa, J. M. (2018). Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.174>
- Sun, Y., Xu, C., Wu, Q., Zhang, L., ve Wang, P. (2020). Long noncoding RNA KCNQ1OT1 promotes proliferation, migration, and invasion in maxillary sinus squamous cell carcinoma by regulating miR-204/EphA7 axis. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.29548>
- Takahashi, M., Kawai, K., ve Asai, N. (2020). Roles of the RET Proto-oncogene in Cancer and Development. *JMA Journal*, 15(3(3)), 175–181. <https://doi.org/10.31662/jmaj.2020-0021>
- Tang, T., Xia, Q. J., Qiao, X., ve Xi, M. (2016). Expression of C-X-C chemokine receptor type 7 in otorhinolaryngologic Neoplasms. *Singapore Medical Journal*. <https://doi.org/10.11622/smedj.2016057>
- Tang, X. Y., Zheng, W., Ding, M., Guo, K. J., Yuan, F., Feng, H., ... Gao, L. (2016). MiR-125b acts as a tumor suppressor in chondrosarcoma cells by the sensitization to doxorubicin through direct targeting the ErbB2-regulated glucose metabolism. *Drug Design, Development and Therapy*. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S90530>
- Tano, K., Onoguchi-Mizutani, R., Yeasmin, F., Uchiumi, F., Suzuki, Y., Yada, T., ve Akimitsu, N. (2018). Identification of minimal p53 promoter region regulated by MALAT1 in human lung adenocarcinoma cells. *Frontiers in Genetics*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00208>
- Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., ... Forbes, S. A. (2019). COSMIC: The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1015>
- Telesco, S. E., ve Radhakrishnan, R. (2009). Atomistic insights into regulatory mechanisms of the HER2 tyrosine kinase domain: A molecular dynamics study. *Biophysical Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3912>

- Telloni, S. M. (2017). Tumor staging and grading: A primer. İçinde *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_1
- Tian, X., ve Zhang, X. (2016). A single nucleotide polymorphism (rs1056629) in 3'-UTR of MMP-9 is responsible for a decreased risk of metastatic osteosarcoma by compromising its interaction with microRNA-491-5p. *Cellular Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1159/000443084>
- Townsend, P. A., Scarabelli, T. M., Davidson, S. M., Knight, R. A., Latchman, D. S., ve Stephanou, A. (2004). STAT-1 Interacts with p53 to Enhance DNA Damage-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302637200>
- Trainor, C. D., Mas, C., Archambault, P., Di Lello, P., ve Omichinski, J. G. (2009). GATA-1 associates with and inhibits p53. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-180489>
- Tsou, Y. A., Huang, H. J., Wang, T. C., Tai, C. J., Chen, C. M., ve Chen, C. Y. C. (2014). Evaluation of correlation of cell cycle proteins and Ki-67 interaction in paranasal sinus inverted papilloma prognosis and squamous cell carcinoma transformation. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/634945>
- Tsunoda, T., ve Takagi, T. (1999). Estimating transcription factor bindability on DNA. İçinde *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/15.7.622>
- Uchi, R., Jiromaru, R., Yasumatsu, R., Yamamoto, H., Hongo, T., Manako, T., ... Nakagawa, T. (2021). Genomic Sequencing of Cancer-related Genes in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma and Coexisting Inverted Papilloma. *Anticancer Research*, 41(1), 71–79. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14752>
- Udager, A. M., McHugh, J. B., Goudsmit, C. M., Weigelin, H. C., Lim, M. S., Elenitoba-Johnson, K. S. J., ... Brown, N. A. (2018). Human papillomavirus (HPV) and somatic EGFR mutations are essential, mutually exclusive oncogenic mechanisms for inverted sinonasal papillomas and associated sinonasal squamous cell carcinomas. *Annals of Oncology*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx736>
- Udager, Aaron M., McHugh, J. B., Betz, B. L., Montone, K. T., Livolsi, V. A., Seethala, R. R., ... Brown, N. A. (2016). Activating KRAS mutations are characteristic of oncocytic sinonasal papilloma and associated sinonasal squamous cell carcinoma. *Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1002/path.4750>
- Udager, Aaron M., Rolland, D. C. M., McHugh, J. B., Betz, B. L., Murga-Zamalloa, C., Carey, T. E., ... Brown, N. A. (2015). High-frequency targetable EGFR mutations in sinonasal squamous cell carcinomas arising from inverted sinonasal papilloma. *Cancer*

Research. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0340>

- Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjöstedt, E., Fagerberg, L., Bidkhori, G., ... Ponten, F. (2017). A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aan2507>
- Vyse, S., ve Huang, P. H. (2019). Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0038-9>
- Waitkus, M. S., Diplas, B. H., ve Yan, H. (2016). Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov136>
- Walker, E. H., Perisic, O., Ried, C., Stephens, L., ve Williams, R. L. (1999). Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/46319>
- Wang, A. L., Liu, H. G., ve Zhang, Y. (2007). Increased expression of fascin associated with malignant transformation of sinonasal inverted papilloma. *Chinese Medical Journal*. <https://doi.org/10.1097/00029330-200703010-00005>
- Wang, H., Hu, C., Song, X., Hu, L., Li, W., Yu, H., ... Wang, D. (2020). Expression of Podoplanin in Sinonasal Squamous Cell Carcinoma and Its Clinical Significance. *American Journal of Rhinology and Allergy*. <https://doi.org/10.1177/1945892420930976>
- Wang, H., Li, H., Hu, L., Wang, J., Liu, Q., Wang, D., ve Sun, X. (2019). Overexpression of FoxM1 in Sinonasal Inverted Papilloma and Associated Squamous Cell Carcinoma. *American Journal of Rhinology and Allergy*. <https://doi.org/10.1177/1945892419863193>
- Wang, W., Shen, T., Dong, B., Creighton, C. J., Meng, Y., Zhou, W., ... Yang, F. (2019). MAPK4 overexpression promotes tumor progression via noncanonical activation of AKT/mTOR signaling. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI97712>
- Wang, X., Lv, W., Qi, F., Gao, Z., Yang, H., Wang, W., ve Gao, Y. (2017). Clinical effects of p53 overexpression in squamous cell carcinoma of the sinonasal tract: A systematic meta-analysis with PRISMA guidelines. *Medicine (United States)*. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006424>
- Wen, W., Chen, W. S., Xiao, N., Bender, R., Ghazalpour, A., Tan, Z., ... Press, M. F. (2015). Mutations in the kinase domain of the HER2/ERBB2 gene identified in a wide variety of human cancers. *Journal of Molecular Diagnostics*. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.003>

- Willmore-Payne, C., Holden, J. A., ve Layfield, L. J. (2006). Detection of EGFR- and HER2-activating mutations in squamous cell carcinoma involving the head and neck. *Modern Pathology*. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800552>
- Wingender, E., Schoeps, T., ve Dönitz, J. (2013). TFClass: An expandable hierarchical classification of human transcription factors. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1123>
- Wirth, M., Doescher, J., Jira, D., Meier, M. A., Piontek, G., Reiter, R., ... Pickhard, A. (2016). HES1 mRNA expression is associated with survival in sinonasal squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2016.05.023>
- Wolf, D., Rodova, M., Miska, E. A., Calvet, J. P., ve Kouzarides, T. (2002). Acetylation of β -catenin by CREB-binding protein (CBP). *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201196200>
- Wu, D., Ozakis, T., Yoshiharas, Y., Kubos, N., ve Nakagawara, A. (2013). Runt-related transcription factor 1 (RUNX1) stimulates tumor suppressor p53 protein in response to DNA damage through complex formation and acetylation. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.402594>
- Wu, P. F., Liang, J. Y., Yu, F., Zhou, Z. B., Tang, J. Y., ve Li, K. H. (2015). MiR-125B inhibits stromal cell proliferation in giant cell tumor of bone by targeting parathyroid hormone 1 receptor. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2015.4654>
- Wu, Z. H., Yun-Tang, ve Cheng, Q. (2020). Data Mining Identifies Six Proteins that Can Act as Prognostic Markers for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cell Transplantation*. <https://doi.org/10.1177/0963689720929308>
- Wu, Z., Yang, Z., Li, C. S., Zhao, W., Liang, Z. X., Dai, Y., ... Chen, L. A. (2019). Non-invasive detection of EGFR and TP53 mutations through the combination of plasma, urine and sputum in advanced non-small cell lung cancer. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10726>
- Xiao, K., Luo, X., Wang, X., ve Gao, Z. (2017). MicroRNA-185 regulates transforming growth factor- β 1 and collagen-1 in hypertrophic scar fibroblasts. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6179>
- Xie, L., Zhang, Z., Tan, Z., He, R., Zeng, X., Xie, Y., ... He, X. (2014). MicroRNA-124 inhibits proliferation and induces apoptosis by directly repressing EZH2 in gastric

cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2028-0>

- Xie, R. hua, Chen, Z. hua, Chen, M. yuan, Hou, J. hui, Wu, J. hui, Wu, G. hao, ve Wu, Q. liang. (2002). Expression and significance of p53 and proliferating cell nuclear antigen in malignant tumor of maxillary sinus. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer*.
- Xu, X., Zhao, J., Xu, Z., Peng, B., Huang, Q., Arnold, E., ve Ding, J. (2004). Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404298200>
- Yagishita, S., Fujita, Y., Kitazono, S., Ko, R., Nakadate, Y., Sawada, T., ... Koizumi, F. (2015). Chemotherapy-regulated microRNA-125-HER2 pathway as a novel therapeutic target for trastuzumab-mediated cellular cytotoxicity in small cell lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0625>
- Yaguchi, T., Nakano, T., Gotoh, A., ve Nishizaki, T. (2011). Adenosine promotes GATA-2-regulated p53 gene transcription to induce HepG2 cell apoptosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1159/000335770>
- Yamashita, Y., Hasegawa, M., Deng, Z., Maeda, H., Kondo, S., Kyuna, A., ... Suzuki, M. (2015). Human papillomavirus infection and immunohistochemical expression of cell cycle proteins pRb, p53, and p16INK4a in sinonasal diseases. *Infectious Agents and Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s13027-015-0019-8>
- Yan, C., Chen, Y., Kong, W., Fu, L., Liu, Y., Yao, Q., ve Yuan, Y. (2017). PVT1-derived miR-1207-5p promotes breast cancer cell growth by targeting STAT6. *Cancer Science*. <https://doi.org/10.1111/cas.13212>
- Yan, X. C., Cao, J., Liang, L., Wang, L., Gao, F., Yang, Z. Y., ... Han, H. (2016). miR-342-5p Is a Notch Downstream Molecule and Regulates Multiple Angiogenic Pathways Including Notch, Vascular Endothelial Growth Factor and Transforming Growth Factor β Signaling. *Journal of the American Heart Association*. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.003042>
- Yanagawa, T., Hayashi, Y., Nishida, T., Yoshida, H., Yura, Y., Azuma, M., ve Sato, M. (1986). Immunohistochemical demonstration of carcinoembryonic antigen (CEA) on tissue sections from squamous cell head and neck cancer and plasma CEA levels of the patients. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. [https://doi.org/10.1016/S0300-9785\(86\)80089-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9785(86)80089-8)

- Yang, B., Yan, X., Liu, L., Jiang, C., ve Hou, S. (2017). Overexpression of the cancer stem cell marker CD117 predicts poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients: Evidence from meta-analysis. *OncoTargets and Therapy*. <https://doi.org/10.2147/OTT.S136549>
- Yang, H., Ye, D., Guan, K. L., ve Xiong, Y. (2012). IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: Mechanistic insights and clinical perspectives. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1773>
- Yang, Jie, Lin, Y., Huang, Y., Jin, J., Zou, S., Zhang, X., ... Lin, D. (2019). Genome landscapes of rectal cancer before and after preoperative chemoradiotherapy. *Theranostics*. <https://doi.org/10.7150/thno.37794>
- Yang, Juan, Li, G., ve Zhang, K. (2016). MiR-125a regulates ovarian cancer proliferation and invasion by repressing GALNT14 expression. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.12.027>
- Yang, Z., Zhang, Y., Wang, X., Huang, J., Guo, W., Wei, P., ... Zhang, L. (2019). Putative biomarkers of malignant transformation of sinonasal inverted papilloma into squamous cell carcinoma. *Journal of International Medical Research*. <https://doi.org/10.1177/0300060519838385>
- Yasukawa, S., Kano, S., Hatakeyama, H., Nakamaru, Y., Takagi, D., Mizumachi, T., ... Homma, A. (2018). Genetic mutation analysis of the malignant transformation of sinonasal inverted papilloma by targeted amplicon sequencing. *International Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s10147-018-1296-1>
- Yasumatsu, R., Nakano, T., Hashimoto, K., Kogo, R., Wakasaki, T., ve Nakagawa, T. (2019). The clinical value of serum squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2018.07.010>
- Yasumatsu, R., Nakano, T., Sato, M., Jiroumaru, R., Hashimoto, K., Kogo, R., ... Nakagawa, T. (2018). Combination of serum squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 as potential diagnostic marker for sinonasal squamous cell carcinoma and inverted papilloma. *Head and Neck*. <https://doi.org/10.1002/hed.25351>
- Yu, B., Qu, L., Wu, T., Yan, B., Kan, X., Zhao, X., ... Li, Q. (2020). A Novel LncRNA, AC091729.7 Promotes Sinonasal Squamous Cell Carcinomas Proliferation and Invasion Through Binding SRSF2. *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01575>
- Yu, Y., ve Dong, W. (2001). The determination of p53 protein in maxillary sinus carcinoma

and its prognosis value. *Lin chuang er bi yan hou ke za zhi = Journal of clinical otorhinolaryngology*.

- Yuan, Y. Y., Zhu, H. Y., Wu, J. Z., Xia, Y., Liang, J. H., Wu, W., ... Xu, W. (2019). The percentage of cells with 17p deletion and the size of 17p deletion subclones show prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes and Cancer*. <https://doi.org/10.1002/gcc.22692>
- Yuzawa, S., Opatowsky, Y., Zhang, Z., Mandiyan, V., Lax, I., ve Schlessinger, J. (2007). Structural Basis for Activation of the Receptor Tyrosine Kinase KIT by Stem Cell Factor. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.055>
- Zhang, P., Shao, G., Lin, X., Liu, Y., ve Yang, Z. (2017). MiR-338-3p inhibits the growth and invasion of non-small cell lung cancer cells by targeting IRS2. *American Journal of Cancer Research*.
- Zhang, Q., Li, Q., Xu, T., Jiang, H., ve Xu, L. G. (2016). MIR-491-5p suppresses cell growth and invasion by targeting Notch3 in nasopharyngeal carcinoma. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4713>
- Zhang, Y., ve Xu, J. (2016). MiR-140-5p regulates hypoxia-mediated human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation, apoptosis and differentiation by targeting Dnmt1 and promoting SOD2 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.116>
- Zhao, X., Lu, C., Chu, W., Zhang, Y., Zhang, B., Zeng, Q., ... Liu, J. (2016). microRNA-214 governs lung cancer growth and metastasis by targeting Carboxypeptidase-D. *DNA and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1089/dna.2016.3398>
- Zhao, Y., ve Wang, X. (2018). miR-34a targets BCL-2 to suppress the migration and invasion of sinonasal squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9427>
- Zheng, H. yun, Wang, H. bo, Shen, F. jin, Tong, Y. qing, Yao, Q., Qiao, B., ... Li, Y. (2020). EGFR Gene Mutation and Methodological Evaluation in 399 Patients with Non-small Cell Lung Cancer. *Current Medical Science*. <https://doi.org/10.1007/s11596-020-2149-5>
- Zhu, J., Zhang, S., Jiang, J., ve Chen, X. (2000). Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005676200>
- Zhu, V. W., Schrock, A. B., Bosemani, T., Benn, B. S., Ali, S. M., ve Ou, S. H. I. (2018). Dramatic response to alectinib in a lung cancer patient with a novel VKORC1L1-ALK

fusion and an acquired ALK T1151K mutation. *Lung Cancer: Targets and Therapy*.
<https://doi.org/10.2147/LCTT.S186804>

İnternet kaynakları

COSMIC, COSM11483;

<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=118493834>; Son erişim
tarihi: Mart 2021

COSMIC, COSM9497247;

<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=96143976>; Son erişim
tarihi: Mart 2021

COSMIC, RAF1; <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=RAF1>; Son erişim
tarihi: Mart 2021

COSMIC, sinonazal skuamöz hücreli karsinom;

[https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue?hn=carcinoma&in=t&sh=squamous
_cell_carcinoma&sn=upper_aerodigestive_tract&ss=sinonasal_and_nasal_cavity](https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue?hn=carcinoma&in=t&sh=squamous_cell_carcinoma&sn=upper_aerodigestive_tract&ss=sinonasal_and_nasal_cavity);
Son erişim tarihi: Mart 2021

Ensembl, AKT1;

[https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=EN
SG00000142208;r=14:104769349-104795751;t=ENST00000554581](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000142208;r=14:104769349-104795751;t=ENST00000554581); Son erişim
tarihi: Mart 2021

Ensembl,

ALK; [https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;
g=ENSG00000171094;r=2:29192774-29921586;t=ENST00000389048](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000171094;r=2:29192774-29921586;t=ENST00000389048); Son erişim
tarihi: Mart 2021

Ensembl, BRAF;

[https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=EN
SG00000157764;r=7:140719327-40924929;t=ENST00000644969](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000157764;r=7:140719327-40924929;t=ENST00000644969); Son erişim tarihi:
Mart 2021

Ensembl, CTNNB1

[https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=EN
SG00000168036;r=3:41194741-41260096;t=ENST00000349496](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000168036;r=3:41194741-41260096;t=ENST00000349496); Son erişim tarihi:
Mart 2021

Ensembl, EGFR;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000146648;r=7:55019017-55211628;t=ENST00000275493 Son erişim tarihi:
Mart 2021

Ensembl, ERBB2;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000141736;r=17:39687914-39730426;t=ENST00000269571; Son erişim tarihi:
Mart 2021

Ensembl, ERBB3;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000065361;r=12:56076799-56103505;t=ENST00000267101; Son erişim tarihi:
Mart 2021

Ensembl, ESR1;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000091831;r=6:151656691-152129619;t=ENST00000440973; Son erişim
tarihi: Mart 2021

Ensembl, FOXL2;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000183770;r=3:138944224-138947137;t=ENST00000648323; Son erişim
tarihi: Mart 2021

Ensembl, GNA11;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000088256;r=19:3094362-3123999;t=ENST00000078429; Son erişim tarihi:
Mart 2021

Ensembl, GNAQ;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000156052;r=9:77716097-78031811;t=ENST00000286548; Son erişim tarihi:
Mart 2021

Ensembl, IDH1

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000138413;r=2:208236229-208266074;t=ENST00000345146; Son erişim
tarihi: Mart 2021

Ensembl, IDH2;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000182054;r=15:90083045-90102477;t=ENST00000330062; Son erişim tarihi: Mart 2021

Ensembl, KIT;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000157404;r=4:54657918-54740715;t=ENST00000288135; Son erişim tarihi: Mart 2021

Ensembl, KRAS;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000133703;r=12:25205246-25250936;t=ENST00000256078; Son erişim tarihi: Mart 2021

Ensembl, MET;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000105976;r=7:116672196-116798377;t=ENST00000318493; Son erişim tarihi: Mart 2021

Ensembl, NRAS;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000213281;r=1:114704469-114716771;t=ENST00000369535; Son erişim tarihi: Mart 2021

Ensembl, PDGFRA;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000134853;r=4:54229280-54298245;t=ENST00000257290; Son erişim tarihi: Mart 2021

Ensembl, PIK3CA;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000121879;r=3:179148114-179240093;t=ENST00000263967; Son erişim tarihi: Mart 2021

Ensembl, RAF1;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000132155;r=3:12583601-12664125;t=ENST00000442415; Son erişim tarihi: Mart 2021

Ensembl, RET;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000165731;r=10:43077064-43130351;t=ENST00000355710; Son erişim tarihi: Mart 2021

Ensembl, TP53;

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000141510;r=17:7661779-7687538;t=ENST00000269305; Son erişim tarihi: Mart 2021

KEGG, ErbB sinyalizasyonu, map04012;

https://www.genome.jp/keggbin/show_pathway?map04012 Son erişim tarihi: Mart 2021

KEGG, Kanser ilişkili yolaklar, map052002; [https://www.kegg.jp/kegg-](https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map05200&keyword=kit)

[bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map05200&keyword=kit](https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map05200&keyword=kit); Son erişim tarihi: Mart 2021

KEGG, Östrojen sinyal yolağı, map04915; [https://www.kegg.jp/kegg-](https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04915&keyword=esr1)

[bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04915&keyword=esr1](https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04915&keyword=esr1); Son erişim tarihi: Mart 2021

KEGG, PI3K/AKT yolağı, 04151; [https://www.genome.jp/kegg-](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04151)

[bin/show_pathway?hsa04151](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04151); Son erişim tarihi: Mart 2021

KEGG, WNT yolağı, map 04310; [https://www.kegg.jp/kegg-](https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04310&keyword=ctnnb1)

[bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04310&keyword=ctnnb1](https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04310&keyword=ctnnb1); Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, AKT1; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/207>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, ALK; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/238>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, BRAF; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, CTNNB1; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1499>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, EGFR; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1956> Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, ERBB2; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2064>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, ERBB3; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2065>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, ESR1; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2099>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, FOXL2;

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=668>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, GNA11 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2767>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, GNAQ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2776>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, IDH1; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3417>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, IDH2; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3418>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, KIT; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3815>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, KRAS; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3845>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, MET; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4233>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, NRAS; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4893>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, PDGFRA; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5156>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, PIK3CA; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5290>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, RAF1; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5894>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, RET; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5979>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NCBI, gen, TP53; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, AKT1; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000142208-AKT1/tissue>;
Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, ALK; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000171094-ALK/tissue>; Son
erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, BRAF; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000157764-BRAF/tissue>;
Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, CTNNB1; [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168036-
CTNNB1/tissue](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168036-CTNNB1/tissue); Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, EGFR; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000146648-EGFR/tissue>
Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, ERBB2; [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141736-
ERBB2/tissue](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141736-ERBB2/tissue); Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, ERBB3; [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000065361-
ERBB3/tissue](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000065361-ERBB3/tissue); Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, ESR1; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000091831-ESR1/tissue>;
Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, FOXL2; [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000183770-
FOXL2/tissue](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000183770-FOXL2/tissue); Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, GNA11; [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000088256-
GNA11/tissue](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000088256-GNA11/tissue); Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, GNAQ; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000156052-GNAQ/tissue>;
Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, IDH1; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000138413-IDH1/tissue>;
Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, IDH2; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000182054-IDH2/tissue>;
Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, KIT; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000157404-KIT/tissue>; Son
erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, KRAS; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000133703-KRAS/tissue>;
Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, MET; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105976-MET/tissue>;
Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, NRAS; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000213281-NRAS/tissue>;
Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, PDGFRA; [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134853-](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134853-PDGFRA/tissue)
PDGFRA/tissue; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, PIK3CA; [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000121879-](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000121879-PIK3CA/tissue)
PIK3CA/tissue; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, RAF1; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000132155-RAF1/tissue>;
Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, RET; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000165731-RET/tissue>; Son
erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, doku, TP53; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141510-TP53/tissue>;
Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, AKT1; [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000142208-](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000142208-AKT1/pathology)
AKT1/pathology; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, ALK; [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000171094-](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000171094-ALK/pathology)
ALK/pathology; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, BRAF; [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000157764-](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000157764-BRAF/pathology)
BRAF/pathology; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, CTNNB1; [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168036-](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168036-CTNNB1/pathology)
CTNNB1/pathology; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, EGFR; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000146648-EGFR/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, ERBB2; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141736-ERBB2/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, ERBB3; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000065361-ERBB3/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, ESR1; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000091831-ESR1/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, FOXL2; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000183770-FOXL2/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, GNA11; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000088256-GNA11/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, GNAQ; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000156052-GNAQ/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, IDH1; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000138413-IDH1/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, IDH2; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000182054-IDH2/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, KIT; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000157404-KIT/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, KRAS; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000133703-KRAS/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, MET; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000105976-MET/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, NRAS; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000213281-NRAS/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, PDGFRA; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134853-PDGFRA/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, PIK3CA; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000121879-PIK3CA/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, RAF1; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000132155-RAF1/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, RET; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000165731-RET/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Protein Atlas, patoloji, TP53; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000141510-TP53/pathology>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Biyoinformatik araçların internet siteleri

ATPint; <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/atpint/index.html>; Son erişim tarihi: Mart 2021

GTPbinder; <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/gtpbinder/index.html>; Son erişim tarihi: Mart 2021

DNAbinder; <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/dnabinder/submit.html>; Son erişim tarihi: Mart 2021

ISLAND; <https://island.pythonanywhere.com/welcome/default/index>; Son erişim tarihi: Mart 2021

EXPASY, TRANSLATE; <https://web.expasy.org/translate/>; Son erişim tarihi: Mart 2021

VarSome veritabanı; <https://varsome.com/>; Son erişim tarihi: Mart 2021

NLSmapper; http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi; Son erişim tarihi: Mart 2021

miRTarBase; <http://mirtarbase.cuhk.edu.cn/php/download.php>; Son erişim tarihi: Mart 2021

TFBIND; <http://tfbind.hgc.jp/>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Kinact; <http://biosig.unimelb.edu.au/kinact/>; Son erişim tarihi: Mart 2021

CCDS; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>; Son erişim tarihi: Mart 2021

Ekler

Ek 1. Etik kurul onay belgesi (EÜTF Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu;29.04.2020 tarihli 20-4.2T/24 sayılı onay)

T.C. EGE ÜNİVERSİTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR Tel : 0 232 390 2134 e-mail: tibbietik@yahoo.com.						
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ						
Microsoft Teams Programı ile Teletoplantı gerçekleştirilmiştir.						
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Paranasal Sinüs Tümöründe Moleküler Hedef Oluşturan Genomik Profiline Belirlenmesi				
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Sercan GÖDE				
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ, Prof. Dr. Ali VERAL, Doç. Dr. Çiğir BİRAY AVCI Öğr. Gör. Göksel TURHAL, Arş. Gör. Bakiye GÖKER BAĞCA, Arş. Gör. Neslihan Pinar ÖZATEŞ AY				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı				
	DESTEKLEYİCİ	BAP -Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü				
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi				
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	-				
	BİLGİLENDİRME FORMU	-				
	VERİ İZLEME FORMU/ ANKET	☐				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒				
	DİĞER	☐				
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 20-4.2T/24	Tarih: 29.04.2020				
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğu toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					
EGE ÜNİVERSİTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ÇALIŞMA ESASI	Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU					
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU Başkan	Halk Sağlığı AD	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Prof. Dr. Şafak DAĞHAN Başkan Yardımcısı	Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Prof. Dr. Zeliha KERRY Üye	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Eyüp Sabri ERCAN Üye	Çocuk Ruh Sağlığı	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
Prof. Dr. Güzide AKSU Üye	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	UYGUNDUR
 E.Ü. TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU SEKRETERİ						
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU	İMZA	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi			Sayfa	1/2