

**Ankara Üniversitesi
Biyoteknoloji Enstitüsü**

Yüksek Lisans Tezi

**Gastrointestinal Stromal Tümörlerdeki (GIST) KIT ve PDGFRA
Mutasyonlarının Hastaların Patolojik Ve Klinik Prognostik
Parametreler İle İlişkilendirilmesi**

Salim SÜNER

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Işinsu KUZU

**ANKARA
2010**

Prof. Dr. Işınsu KUZU danışmanlığında Salim SÜNER tarafından hazırlanan bu çalışma 15/07/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Işınsu KUZU

İMZA:

ÜYE: Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI

İMZA:

ÜYE: Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ

İMZA:

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Enstitü Müdürü

Gastrointestinal Stromal Tümörlerdeki (GIST) C-KIT ve PDGFRA Mutasyonlarının Hastaların Patolojik Ve Klinik Prognostik Parametreler İle İlişkilendirilmesi

ÖZET

Bu çalışmada, gastrointestinal kanalın en sık gözlenen mezenkimal tümörleri olan Gastrointestinal stromal tümörlerin (GIST), Türkiye GIST veri tabanında yer alan vakalar kapsamında mutasyon profillerini inceleyerek, ülkemize ait mutasyon profilinin ortaya çıkarılması ve mutasyonlarla klinik prognostik parametreleri ve hedeflenmiş tedavi yanıtları ile ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaca yönelik olarak tümörlere ait parafin bloklardan DNA elde edilerek, KIT geninin 9,11,13 ve PDGFRA geninin ise 12,14,18 numaralı ekzonları Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle çoğaltılmış ve sonrasında dizi analizi yöntemiyle mutasyon varlığı yönünden incelenmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen mutasyon sonuçlarına göre, gözlenen mutasyon tipleri ve bunların görülme sıklıklarının, daha önce literatürde tespit edilmiş sonuçlar ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Ayrıca PDGFRA geninin 18. ekzonunda daha önce tanımlanmamış R817P mutasyonu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: GIST, C-KIT, PDGFRA, CD117, Mutasyon

The C-KIT and PDGFRA mutations in Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST) and their correlation with the pathological and clinical prognostic parameters

ABSTRACT

Gastrointestinal stromal tumors are the most common mesenchymal tumors in the gastrointestinal tract. Our aim in this study was to examine the mutation profile of Turkish GIST cases registered in the Turkish GIST database whose pathological and clinical prognostic parameters have been documented. We also wanted to examine the relationship between the mutation status and targeted therapy (imatinib) response for Gastrointestinal stromal tumors (GIST).

For this aim, exons 9,11,13 for KIT and 12,14,18 for PDGFRA genes, by using the DNA extracted from formalin fixed parafine embedded tumor tissue sections were used. Related exons of the genes were amplified by polimerase chain reaction (PCR) and then analyzed for mutation status by using sequence analysis.

In conclusion, the observed mutation types and their frequency are in accordance with the former results reported by other groups. In addition, R817P missense mutation that hasn't been reported before, was observed in PDGFRA gene within exon 18.

Key words: GIST, C-KIT, PDGFRA, CD117, Mutation

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana gerekli araştırma olanağı ve ortamını sağlayan desteğini, rehberliğini ve hoşgörüsünü benden hiç esirgemeyen değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Işınsu KUZU'ya,

Lisans eğitimimde bilgilerini cömertçe aktararak ufkumu genişleten ve kendi alanımda bugünkü algılarımın pek çoğunun temelini atmama vesile olan değerli hocam Prof. Dr. Ahmet E. KADIKIRAN'a,

Vakaların seçimi, sonuçların değerlendirilmesi ve tezin redaksiyonu gibi kritik noktalardaki yardımları ve içten ilgisi için Doç. Dr. Gülşah KAYGUSUZ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden bilgisini, rehberliğini, ilgisini esirgemeyip değerli vaktini defalarca bana ayıran saygıdeğer hocam Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a,

Çalışmanın hemen her basamağında bilgi ve becerilerinden sayısız kere faydalandığım değerli arkadaşım Dr. Ersin KARATAYLI'ya ve değerli yardımları için tüm RefGen ailesine,

İstatistik konusundaki değerli katkıları için sayın Doç. Dr. Atilla ELHAN'a,

Çalışmalarımı yaptığım Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Bölümü İmmünopatoloji Biriminin değerli çalışanları Filiz Yeşilyurt, Nazan Güngör, Fatma Tezcan, Fethiye Ayhan, Yasemin Şahin, Cennet C. Sinup ile deneyler sırasında aynı birimde stajyerliğini yapan değerli arkadaşım Yüce Armağan ERKEK'e ve aynı bölümde isimlerini ayrıca saymadığım katkıda bulunmuş herkese,

Bilgi ve becerisini her seferinde cömertçe sunan değerli arkadaşım Nilgün CEKİN'e ilgi ve desteği; tezin redaksiyonu konusundaki yardımları için ise Marmara Üniversitesi Biyoloji bölümü öğrencisi N. Kaan KARAHAN'a,

Bu çalışmayı yapmama bir anlamda vesile olan değerli arkadaşım Kerem Mert ŞENSES'e,

Sağladığı proje desteği için Türk Patoloji Derneği'ne,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca ardı arkası kesilmeyen sorularıma her zaman içtenlikle cevaplayan ve bu zor süreci çok daha kolay geçirmeme yardımcı olan Eğitim Programları Ofisi sorumlusu sayın Asuman ERZİNCAN'a teşekkürü borç bilirim.

Kendileri çoğu zaman uzakta olsa da desteklerini ve sevgilerini her zaman yanımda hissettiğim tüm akrabalarıma ve dostlarım Abdülhalik GÜLÜCÜ, Ceren Börçek KASURKA, Semih Zafer YILMAZ'a,

Son olarak emeklerinin karşılıklarını hiçbir şekilde ödeyemeyeceğim annem ve babam başta olmak üzere aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Salim SÜNER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ.	1
2. KURAMSAL TEMELLER	2
2.1. GIST: Kısa bir tarihçe	2
2.2. GIST'lerin Epidemiyolojik, Patolojik ve Histolojik özellikleri.....	5
2.3. GIST tanısı	7
2.4. GIST'lerde Prognoz ve önerilen prognoz ölçütleri.....	7
2.5. KIT ve PDGFRA genleri ile GIST gelişimi ilişkisi.....	9
2.6. Hedefe yönelik GIST tedavisi.....	21
2.7. İmatinib'e direnç mekanizmaları ve ilaç geliştirme stratejileri	26
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	30
3.1.Çalışma kapsamındaki hastalar ve örneklerin niteliği	30
3.2. Moleküler testler	31
3.2.1. DNA eldesi.....	31
3.2.2. Elde edilen DNA moleküllerininPZR içinuygunluklarının SL PZR ile belirlenmesi.....	32
3.2.3.Hedeflenen gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılması	33
3.2.4.Direkt DNA dizi analizi yöntemiyle mutasyon analizi.....	33
3.2.5. İstatistiksel Analizler.....	35
4. ARASTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	37
5. ÖNERİLER ve DÜŞÜNCELER.....	64
5.2.SONUÇ	67
6. REFERANSLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	78
EKLER.....	78

SİMGELER DİZİNİ

ABL	Ableson lösemi virüs onkogeni
AKT	V-akt murin timoma viral onkogeni homologu,
ATP	Adenozin tri fosfat
BAD	BCL2 hücre ölümü antagonisti
BBA	Büyük büyütme alanı
Bç	Baz çifti
cDNA	Komplementer (eşlenik) Deoksiribo nükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Ekstra selüler (domeyn)
FTPG	Formalinde Tespit edilmiş Parafine Gömülmüş
FRAP1	FK506 bağlayan protein 12 rapamisin ilgili protein 1 (mTOR),
GANT	Gastrointestinal otonomik sinir tümörleri
GDP	Guanozin di fosfat
GTP	Guanozin tri fosfat
GIST	Gastrointestinal stromal tümör
HSP	Sıcaklık şoku proteinleri (Heat shock proteins)
IHK	İmmünohistokimya
JM	Juksta membran (Domeyn)
kDa	Kilo Dalton
MAP2K1	Mitojen aktifleştirilmiş protein kinaz 1 (MEK1).
MAP2K2	Mitojen aktifleştirilmiş protein kinaz 2 (MEK2).
mRNA	Elçi RNA (Messenger RNA)
NF	Nörofibromatosis
NF 1	Nörofibromin 1
NRAS	Nöroblastoma RAS viral (v-ras) onkogen homologu
P	Fosfat
PDGFRA	Trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü alfa
PIP2	Fosfatidil inositol -4,5- bisfosfat,
PIP3	Fosfatidil inositol-3,4,5-tri fosfat,
PI3K	Fosfatidil inositol 3 kinaz

PKC- θ	Protein kinaz C- θ
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAF1	V-RAF-1 murin lösemi viral onkogen homologu,
RPS6KB1	Ribozomal protein S6 kinaz (70 kD) 1,
RTK	Reseptör tirozin kinaz
SCF	Kök hücre faktörü (Stem cell factor)
SL PZR	Boyut merdiveni polimeraz zincir reaksiyonu (Size ladder polymerase chain reaction)
STAT3	Transkripsiyon 3 Sinyal aracı molekülü ve aktivatörü
STAT5	Transkripsiyon 5 Sinyal aracı molekülü ve aktivatörü
TK1	Tirozin kinaz 1 (Domeyni)
TK2	Tirozin kinaz 2 (Domeyni)
WT	Yabancıl tip (Wild Type)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: Gastrointestinal sistemin mezenkimal tümörlerinin sınıflandırılması.....	2
Şekil 2.2: KIT reseptörünün kısımları ve bu kısımların KIT cDNA'sı üzerinde karşılık geldikleri bölgeler ile reseptör üzerinde çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş mutasyonlar	10
Şekil 2.3: KIT reseptörünün faaliyet şeklinin normal koşullar altında ve mutasyon etkisinde değişen faaliyetinin karşılaştırılması.....	12
Şekil 2.4: KIT reseptörünün şematik gösterimi ve gen üzerinde gözlenen mutasyonların reseptör üzerinde denk geldikleri konum ile sıklıkları	13
Şekil 2.5: Yabanıl (wild) tip KIT reseptörünün aktif (B) ve otoinhibe edilmiş (A) formları	14
Şekil 2.6: GIST'de tanımlanmış başlıca onkogenik yollar.....	14
Şekil 2.7: KIT ve PDGFRA reseptörleri ve bu reseptörler üzerinde GIST ile ilgili olarak tanımlanmış mutasyonların şematik gösterimi	17
Şekil 2.8: Hedefe yönelik GIST tedavisinde kullanılan ve FDA tarafından da onaylanmış iki terapötik ajanın kimyasal formülleri.....	21
Şekil 2.9: İmatinib mezilat'ın tirozin kinaz inhibitörü etkisini gösterme şekli.....	22
Şekil 2.10: İmatinib bağlanma bölgeleri ve ikincil direncin gelişmesine sebep olan, İmatinib tedavisi altındaki GIST'lerde gözlenen ikincil KIT geni mutasyonları.....	23
Şekil 2.11: Etkinliği değişmiş RTK aracılığıyla gerçekleşen hücresel cevaplar ve Sunitinib'in bu süreç içerisindeki etki şeklinin şematik gösterimi.....	24
Şekil 2.12: Tirozin kinaz (TK) inhibitörlerine karşı kazanılmış bağışıklıktan sorumlu başlıca mekanizmalar	27
Şekil 3.1: DNA ekstraksiyonu sonrasında elde edilen DNA'lara ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	32
Şekil 3.2: Ekstraksiyonları yapılan DNA'ların, SL PZR yöntemiyle, PZR için uygun olup olmadıklarının kontrolü	33
Şekil 3.3: KIT geni 11. Ekzonunun PZR ile amplifikasyonu sonrasında gerçekleştirilen agaroz jel elektroforezi sonucu	35

Şekil 4.1: Çalışmamızda KIT geni 11. ekzonunda gözlenen delesyonların kodonlara göre dağılımı ve sıklıklarının(A), Lasota ve Miettinen (2008)'in verileri (B) ile kıyaslanması	43
Şekil 4.2: KIT geni 11. Ekzonda gözlenen yanlış anlamlı değişimlerin etkilediği kodonlar ve bu değişimlerin çalışmamıza ait gözlenme sıklıklarının (A), Lasota ve Miettinen (2008)'in sonuçlarıyla (B) karşılaştırılması	44
Şekil 4.3: KIT geni 11. ekzonunda, duplikasyonu gözlenen kodonlar ve gözlenme sıklıklarına ait çalışma verilerinin (A), Lasota ve Miettinen (2008)'in sonuçlarıyla (B) kıyaslanması	45
Şekil 4.4: KIT geni, 9. ekzonda duplikasyon gözlenen kodonlar ve gözlenme sıklığı.....	45
Şekil 4.5: PDGFRA geni 18. ekzonunda delesyonun etkilediği kodonlar ve mutasyonun gözlenme sıklığının Lasota Miettinen (2008)'in sonuçlarıyla kıyaslanması ..	46
Şekil 4.6: PDGFRA geni 18. ekzonunda yanlış anlamlı değişimlerin etkilediği kodonlar ve gözlenme sıklıkları	46
Şekil 4.7: İğsi, epiteloid ve mikst hücreli GIST (a-c) ile GIST'te CD117 ve CD34 ifadeleri (d,e)	55
Şekil 4.8 Hastalara ait sekans analizi verilerini içeren elektroferogram örnekleri izlenmektedir.....	59
Şekil 4.9 Çalışmamızda elde edilen diğer bazı mutasyonlara örnekler.....	60
Şekil 4.10 İmatinib kullanım bilgileri bilinen hastalarda saptanan mutasyonların, ekzon üzerinde etkilediği amino asitlerin şematik gösterimi	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1: GI mezenkimal tümörlerin immünohistokimyasal ayırıcı tanısı	7
Çizelge 2.2: GIST'lerin karakteristik özellikleri.....	8
Çizelge 2.3: GIST'in klinik ve patolojik prognostik özellikleri olarak kabul edilen risk grubunun belirlenmesinde günümüzde en yaygın kullanılan parametreler.....	9
Çizelge 2.4: Ailesel GIST sendromu ve ilgili diğer genetik sendromlarla ilişkilendirilmiş kalıtsal KIT ve PDGFRA geni mutasyonları	18
Çizelge 2.5: Multipl GIST sonucunu beraberinde getiren farklı hastalıklar ve bu hastalıkların her birinin karakteristik özellikleri	18
Çizelge 2.6: Farklı mutasyon tiplerinin İmatinib'e cevaplarının karşılaştırılması	19
Çizelge 2.7: Primer mutasyonun yeri ve tipi ile tümörün içerdiği hücre tipi ve prognoz arasındaki ilişki	20
Çizelge 2.8: GIST tedavisi için geliştirilen ikinci nesil ilaçlar/ajanlar ile bunların hedeflediği moleküller	25
Çizelge 3.1: Hastaların merkezlere göre dağılımı	31
Çizelge 3.2: SL PZR'de kullanılan primerler ve elde edilmesi beklenen ampikon uzunlukları	32
Çizelge 3.3: KIT ve PDGFRA genlerinin hedef bölgelerini çoğaltmada kullanılan primerler ve elde edilmesi beklenen ampikon uzunlukları	34
Çizelge 4.1: Tümörlerin lokalizasyonlarına göre dağılımı	37
Çizelge 4.2: Tümörlerin hücre tipine göre dağılımı	38
Çizelge 4.3: Tümörlerin lokalizasyonlarına göre tümörün hücre tipine ait sıklık dağılımı.....	39
Çizelge 4.4: Çalışmada kullanılan örneklerin risk grubu dağılımları	39
Çizelge 4.5: İntestinal ve intestinal dışı yerleşimli tümörlerde CD117 pozitifliği oranı	40
Çizelge 4.6: Tümörlerin mutasyon profilleri yönünden incelenmesiyle elde edilen dağılım	41
Çizelge 4.7: Örneklerde saptanan mutasyonların ekzonlara göre dağılımı.....	41
Çizelge 4.8: Tümör lokalizasyonuna göre mutasyon varlığı dağılımı	41
Çizelge 4.9: Saptanan mutasyonların, mutasyon çeşidine göre dağılımları.....	42

Çizelge 4.10: Her bir ekzonda saptanan mutasyonların, mutasyon tipine göre dağılımları	42
Çizelge 4.11: İmatinib'e verdikleri yanıtta göre hastaların dağılımı	47
Çizelge 4.12: İmatinib kullanımı bilgisi bulunan hastaların tümörün lokalizasyonuna göre dağılımı.....	48
Çizelge 4.13: Tümörün lokalizasyonuna göre mutasyon varlığı / mutasyon saptanan gen dağılımı	48
Çizelge 4.14: Tümörün hücre tipinin tümör durumuna göre dağılımı	49
Çizelge: 4.15: Tümör durumuna göre mutasyon varlığı ve mutasyonun saptandığı gen dağılımı.....	49
Çizelge 4.16: Tümör durumuna göre hastaların son durumlarının dağılımı.....	50
Çizelge 4.17: Mutasyon varlığı / mutant gen verilerinin hastalık durumuna göre dağılımı	51
Çizelge 4.18: Mutasyon saptanan örneklerde mutasyonların hastalık durumuna göre ekzonlara dağılımı	51
Çizelge 4.19: Saptanan mutasyon tiplerinin hastalık durumuna göre dağılımı	52
Çizelge 4.20: Mutasyonların genlere göre gözlenme sıklığının İmatinib kullanımına göre dağılımı	52
Çizelge 4.21: Mutasyon saptanan ekzonlarda mutasyonların gözlenme sıklıklarının İmatinib kullanım bilgisine göre dağılımı	53
Çizelge: 4.22: Saptanan mutasyonun tiplerinin İmatinib kullanım bilgisine göre dağılımı	53
Çizelge 4.23: Saptanan mutasyon tiplerinin, hastaların İmatinib'e yanıtına göre dağılımı	54
Çizelge 4.24: Mutasyon varlığı ve mutasyonun saptandığı genlerin, tümörün CD117 ile boyanma sonucuna göre sıklık dağılımı	54
Çizelge 4.25: Tümörü oluşturan hücre tipinin tümörün risk grubuna göre sıklık dağılımı	55
Çizelge 4.26: Mutasyon varlığı ve mutasyonların saptandıkları ekzonların, tümörün risk grubuna göre sıklıklarının dağılımı	56
Çizelge 4.27: Saptanan mutasyon tiplerinin tümörün risk grubuna göre dağılımı	57
Çizelge 4.28: Hücre tipine göre mutasyon varlığı / mutasyonun saptandığı genlere ait sıklık dağılımı	57

Çizelge 4.29: Mutasyon durumu ve mutasyonların saptandıkları ekzonların, tümörün hücre tipine göre sıklıklarının dağılımı	58
Çizelge 4.30: Saptanan mutasyonların tiplerinin, tümörün hücre tipine göre sıklık dağılımı	59
Çizelge 4.31: İmatinib kullanıp ilaç yanıtı bilinen hastaların patolojik ve klinik prognostik özellikleri ile mutasyon dağılımları	61

1. GİRİŞ

Gastrointestinal stromal tümörler (GIST), otonom sinir uyarısı oluşturan ‘pace maker’ intersitisyel Cajal hücresi kökenli, sindirim kanalının en sık görülen mezenşimal tümörleridir. Bu tümörün patogeneğinde, tirozin kinaz ilişkili reseptörler olan KIT ve PDGFRA’nın otonom uyarılması sonucunu doğuran mutasyonların bulunduğu bilinmektedir.

Geçmişte söz konusu tümörlerin tedavisi ile ilgili tek seçenek cerrahi müdahale iken; günümüzde, ‘reseptör tirozin kinaz inhibitörü’ olarak işlev gören ilaçların birbirlerinin ardı sıra GIST’in hedeflenmiş tedavisinde kullanıma sunulmaları, hastalığın tedavisine ve tedaviye yaklaşıma yeni bir boyut kazandırmış; bu hastalıktan etkilenen hastaların yaşam sürelerini ve kalitelerini arttırma amacına önemli katkılar sağlamıştır.

Ancak tedavi sürecinde zamanla ortaya çıkan direnç, ilaç tedavisine yanıt düzeyi ile hastanın ilgili genlerinde gözlenen mutasyonların türü arasındaki bağlantının araştırılmasını gerekli kılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda belirli mutasyonları taşıyan hastaların belirli bir ilaç ile tedaviye cevap verdikleri, ancak diğer bazı mutasyonları taşıyan hastaların ise aynı ilaçla tedaviye yanıt vermeyebildikleri anlaşılmıştır. Bu durum, hastaların tedavisinde mutasyon profili ile hangi ilaçların kullanılabilmesine dair bilgilerin ilişkilendirilmesi bakımından özellikle büyük önem taşımaktadır. Hastalığın mutasyon profili ile ilgili yurtdışı kaynaklı veriler ve ilaçlara direnç oluştuğundaki mutasyon profilleri kısmen bilinmesine rağmen ülkemizde bu konuda yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

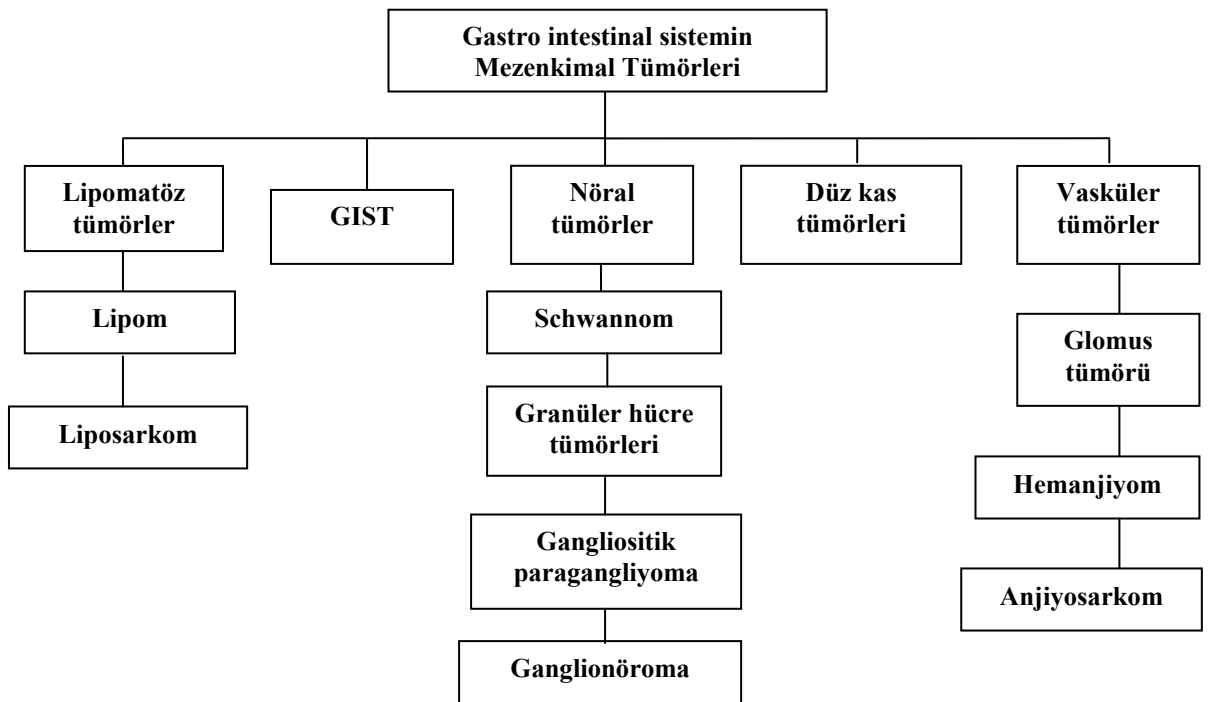
Bu çalışmada Türkiye GIST veri tabanına kayıtlı, patolojik ve klinik prognostik parametreleri bilinen, farklı merkezlerden toplanan GIST doku örneklerinde KIT ve PDGFRA genlerinin mutasyon profilinin çıkarılması, mutasyonlar ile prognostik parametreler ve imatinib yanıtı ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2) KURAMSAL TEMELLER

2.1. GIST: Kısa bir tarihçe

Gastrointestinal stromal tümörler (GIST), gastrointestinal kanalın mezenkimal tümörleri (Şekil 2.1) grubunda yer almaktadır. Tamamen veya kısmen işsi hücrelerden oluşması ve ışık mikroskopunda düz kas veya sinir kılıfı tümörü görünümüne sahip olması sebebiyle önceleri 'leiomyoma', 'leiomyoblastoma' ve 'leiomyosarkoma' gibi düz kas tümörleri olarak değerlendirilmiş; ancak ilerleyen yıllarda elektron mikroskobu ve immünohistokimya çalışmaları ile söz konusu tümörlerin çok az bir kısmının düz kas tümör özellikleri taşıdığı farklı araştırma grupları tarafından (Weiss et al. 1981, Saul et al. 1987, Fraquemont et al. 1992) ortaya konmuştur (Hirota et al. 2006). Bu çalışmalardan sonra Mazur ve Clark (1983), düz kas hücrelerinin ultrastrüktürel özelliklerini taşımayan ve Schwann hücrelerinin immünohistokimyasal özelliklerine sahip olmayan, gastrointestinal non-epitelyal neoplazmları ifade etmek için 'GIST' ifadesini ilk defa kullanan araştırmacılar olarak tarihe geçmişlerdir (Joensuu 2006).

Şekil 2.1: Gastrointestinal sistemin mezenkimal tümörlerinin sınıflandırılması (Çevlik 2006'dan uyarlanarak)



GIST'in kökeni tanımlandıktan sonra, bu tümörlerin tanısız belirteçleri olan (marker) molekül veya moleküllerin araştırılması öncelikli hedef haline almıştır. Bu konuda ilk ipucu, 1991 yılında Traweek ve arkadaşlarının CD34 ifadesinin yalnızca vasküler neoplazmlarda değil, epiteloid sarkoma ve leiomyosarcoma vakalarının da az bir kısmında görüldüğünü açıklamalarıyla elde edilmiştir. Böylelikle GIST ve CD34 arasında olabilecek muhtemel bir ilişkinin de araştırılmasının temelleri atılmıştır. Nihayet 1994'te Van de Rijn ve arkadaşları ile Monihan ve arkadaşları, gastrointestinal mezenkimal tümörlerin büyük bir kısmında CD34 ifadesinin gözlemlendiğini ortaya koydular. Bu gelişmeyi takiben 1995 yılında Miettinen ve arkadaşlarının da, schwannoma ya da leiomyoma özelliği göstermeyen tümörlerde yüksek oranda (%73) CD34 ifadesi gözlediklerini ortaya koymalarıyla, bir anlamda Traweek ve arkadaşlarının bulguları doğrulanmış; böylelikle GIST ifadesinin 1983'te kullanılmaya başlanmasından sonra, bu tümörlere yönelik bir belirtecin tanımlanması 1994 yılında mümkün olabilmiştir (Hirota et al.2006).

Tüm bu gelişmeler GIST'lerin, diğer gastrointestinal mezenkimal tümörlerden ayrımında oldukça faydalı olmuş; ancak CD34 ifadesi bulunmayan tümörlerin, CD34 pozitif tümörlerle birlikte sınıflandırılmaları konusunda yeni bir sorunu da beraberinde getirmiştir. 1998 yılında Hirota ve arkadaşlarının GIST'lerin, KIT protoonkogeni ifadesi yönünden pozitif olduğunu; dahası aynı gende 'işlev kazanımı mutasyonu' tanımlamaları ile hem GIST ile ilgili özgül bir belirteç bulma hem de hastalığın sebebinin anlaşılması konusunda büyük bir adım atılmıştır.

Bugün artık pek çok Gastrointestinal mezenkimal tümörün KIT, CD34, desmin ve S-100 proteini ile immünohistokimyasal boyanma özelliklerine göre ayırıcı tanısı yapılabilmektedir. Morfolojik bulgular yanında immünofenotipik olarak KIT ve CD34 pozitifliğinin saptanması, GIST tanısı için yardımcı bulgulardandır.

GIST'in hızlı tanısına yönelik özgül bir belirtecin araştırıldığı o yıllarda, GIST'in hangi hücre grubunun klonu olduğuna yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Yapılan araştırmalar

sonucunda GIST'in ICH (intersitisyal Cajal hücreleri) olarak adlandırılan hücre grubunun klonu olabileceği yönünde önemli bulgulara ulaşılmıştır.

ICH hücreleri ilk defa 1893'te ünlü nörolog Santiago R. Cajal tarafından gastrointestinal kanal duvarında, sıradan nöronların oluşturduğundan farklı bir ağ yapısı oluşturan özel bir hücre grubu olarak tanımlandı. Cajal o dönemde bu hücrelerin, Gastrointestinal harekette önemli bir rolü olabileceğini ileri sürmüştü. Yaklaşık 100 yıl sonra 1989'da, elektrofizyolojik incelemeler ICH yönünden zengin myenterik plexus tabakasında uyarı üretim (pacemaker) faaliyetini ortaya koydu. Son olarak Thomsen ve arkadaşları tek bir ICH'nin spontan kasılmalar gerçekleştirdiğini 1998'de göstermeyi başarmıştır. Tüm bu sonuçlar, ICH'nin gastrointestinal sistemin otonom hareketi için bir pacemaker (uyartı üretimi) işlevi üstlendiğine işaret etmektedir (Hirota et al. 2006).

1992 yılında Maeda ve arkadaşlarının KIT pozitif hücre varlığını gastrointestinal kas tabakalarında göstermeleri ve KIT pozitif hücrelerin dağılımının intersitisyel Cajal hücre dağılımına benzer bir dağılım şekli sergilemeleri, Cajal hücrelerinin KIT pozitif olduğunu ve dolayısıyla GIST'in kökeni olabilecekleri yönünde ilk ipuçlarını sağlamıştır.

1995'te ise KIT mRNA ifadesi gözlenen hücrelerin ICH oldukları açıkça ortaya konmuştur. Buna ilave olarak hem GIST hem de ICH'nin, KIT yanı sıra CD34 ifadesi yönünden de pozitif olmaları ve ailesel ile multipl GIST vakalarının ICH'nin diffüz hiperplazisinden kaynaklandığını düşündürtecek bulguların varlığı; GIST'in ICH veya onun öncü hücrelerinden köken aldığı görüşünü desteklemektedir.

Tüm bu delillere ilave olarak, GIST ve ICH arasında ortak olarak ifade edildiği bildirilen diğer proteinler arasında, düz kas miyozini ağır zincirinin embriyonik izoformu, ara filament nestin ve protein kinaz-C teta da bulunmaktadır (Sakurai et al. 1999, Tsujimura et al. 2001, Blay et al. 2004).

Bazı GIST'lerde, KIT gibi bir tip III tirozin kinaz reseptör ailesi üyesi olan ve PDGFR α reseptörünü kodlayan PDGFRA geninde de aktive edici mutasyonların görüldüğü Heinrich ve arkadaşları tarafından (2003) bildirilmiştir (Joensuu 2006).

Morfolojik ve immünofenotipik özellikleriyle GIST açısından tanısız güçlük gösteren vakalarda veya hastaya en uygun ilacın ve ilaç dozunun belirlenmesi durumunda, KIT ve PDGFRA gen mutasyonlarının araştırılması giderek önem kazanmaktadır.

2001 yılında KIT, PDGF reseptörleri BCR-ABL, ABL, ARG ve c-FMS'in seçici inhibitörü olan İmatinib mezilat'ın (2-fenilamino pirimidin türevi), GIST tedavisindeki etkinliği gösterilmiştir. Daha sonra sunitinib, vatalanib gibi diğer kinaz inhibitörleri de tedavide kullanılmaya başlanmıştır.

2.2. GIST'lerin Epidemiyolojik, Patolojik ve Histolojik Özellikleri

Gastrointestinal kanalın en sık mezenkimal tümörleri olan GIST'ler, sıklıkla 50-60 yaşlarında görülür. Ancak sık olmamakla birlikte 21 yaş öncesinde ve çok seyrek olarak çocuklarda da rastlanılabilmektedir. Kadın ve erkeklerde görülme sıklığıyla ilgili olarak aktarılan sayısal veriler, çalışmadan çalışmaya değişkenlik göstermekle birlikte belirgin bir cinsiyet baskınlığı bulunmamaktadır.

Farklı merkezlerde yürütülen çalışmalardan GIST'in görülme sıklığına dair farklı rakamlar elde edilmiştir. Bu konuda bildirilen rakamlar 11 ila 14.5 (Nilsson ve arkadaşları 2005, Tryggvason ve arkadaşları 2006, Goettsch ve arkadaşları 2005, Joensuu 2006) arasında değişmekle birlikte asemptomatik, düşük risk grubundaki GIST'lerin popülasyon genelinde sanılandan daha sık olabileceği ifade edilmiştir.

GIST'lerin malignite potansiyeli küçük boyutlu asemptomatik kitlelerden, agresif davranışa kadar uzanan çok farklı klinik özellikler sergilemektedir. Yüksek risk veya malign karakterdeki GIST'ler, tüm GIST'lerin yaklaşık %20-35'ini oluşturur ki bu da yıllık yaklaşık olarak milyonda 5'lik bir görülme sıklığına karşılık gelmektedir.

GIST'lerin risk grubu değerlendirmeleri tümörün boyutu, hücreliliği, mitoz oranı ve immünohistokimyasal profili gibi ölçütler dikkate alınarak yapılmaktadır. Risk grubunun belirlenmesi ise, hastalığın klinik seyirinin ön görülmesi ve buna yönelik doğru tedavinin belirlenmesi açısından önemlidir.

GISTlerin ortalama boyutları 5-8 cm'dir. Büyük boyutlu GIST'ler sıklıkla kistik dejenerasyon veya nekroz gösterirler. Tümörler genellikle iyi sınırlıdır. Kapsülsüz olan ya da pseudokapsül içeren bu tümörler submukozal, intramusküler veya subserozal yerleşim gösterirler.

Morfolojik olarak GIST'ler sıklıkla iğsi hücrelerden oluşmakla birlikte (%70), %20 oranında epitelioid ve daha az oranda mikst veya pleomorfik hücrelerden de oluşabilir (Joensuu 2006). İğsi hücreli tip GIST'ler kısa, fasiküller ve girdaplar oluşturan genellikle uniform eozinofilik hücrelerden oluşmakta ayrıca tümör hücreleri düz kas hücre neoplazilerinden daha soluk sitoplazmalı, sıklıkla fibriler, sinsityal görünüm sergilemektedir. Perinükleer sitoplazmik vakuoller vakaların yaklaşık % 5'inde bildirilmiş olup diğer mikroskopik özellikler nükleer palizatlanma, stromal lenfositler, mikrokistik stromal dejenerasyondur.

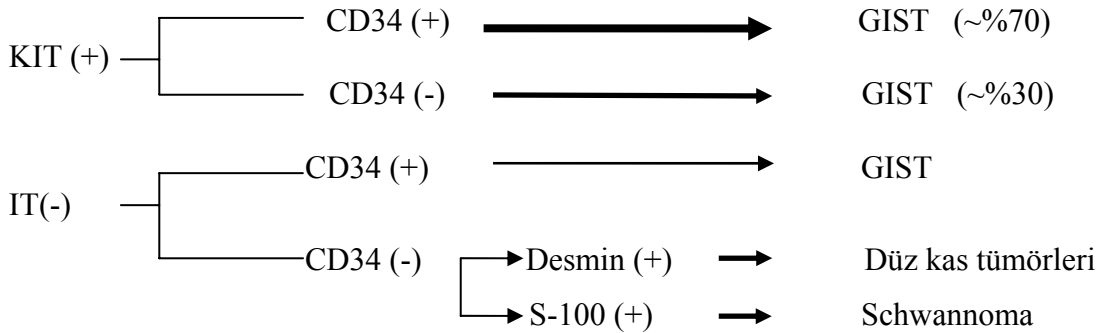
GIST'ler en sık mide (%60) ve bunu takiben sırasıyla ince barsak (%30), daha az sıklıkta ise özofagus, kalın barsak ve rektum gibi sindirim kanalının farklı bölgelerinde gelişim göstermektedir. Omentum, periton, retroperiton ve safra kesesinde gelişim gösteren olgular bildirilmiştir (Park et al. 2004). GIST'lerin, yerleşim yerlerine göre farklı klinikopatolojik özellikler sergiledikleri de bilinmektedir.

2.3. GIST TANISI

GIST tanısı, yukarıda belirtilen histopatolojik özellikler ve tümörün immünofenotipik özelliklerine dayanarak konulur (Çizelge 2.2 ve 2.3). Tanısal güçlük sergileyen olgularda KIT ve PDGFRA gen mutasyonlarının araştırılması yardımcı bir yöntemdir. İmmünofenotipik olarak GIST'lerin çoğu (~%95), KIT proteini (CD117 olarak da bilinir) için immün boyanma reaksiyonu yönünden pozitifdir. Bu özellik diğer mezenkimal tümörlerde beklenmediğinden, belirleyici GIST tanısı için son derece önemlidir.

GIST'ler düz kas aktini (SMA) ile de %30-40 oranında pozitif boyanma gösterir (Joensuu 2006). Son dönemlerde bir klorid kanal proteinini kodladığı belirtilen genin ürünü olan DOG1'in de (Discovered on GIST 1) GIST tanısında kullanılabileceği belirtilmiştir. Histopatolojik tanıda Hirota ve arkadaşlarının verdiği, Çizelge 2.2'de izlenen kriterler kullanılır.

Çizelge 2.1: GI mezenkimal tümörlerin immünohistokimyasal ayırıcı tanısı. Ok kalınlıkları sıklığı ifade edecek şekilde düzenlenmiştir (Hirota et al. 2006'dan uyarlanarak)



2.4. GIST'lerde prognoz ve önerilen prognoz ölçütleri

GIST'lerde biyolojik davranışın belirlenmesinde yardımcı özgül belirteç moleküller veya ölçüt olabilecek diğer faktörlerin belirlenmesi son derece önemlidir. Cerrahi müdahale öncesinde veya sonrasında tümörün nüksetme ya da yayılma riski bu

sınıflandırmaya dayanılarak tanımlanmakta ve tedavi planı buna göre şekillenmektedir. Örneğin tümörü karın boşluğuna yayılmış bir hasta için cerrahi müdahale öncesinde veya sonrasında tümörün nüks etme riski oldukça yüksektir (Joensuu 2006).

GIST'lerin biyolojik davranışını belirlemede gerek moleküler düzeyde gerekse tümörün lokalizasyonu ve diğer bazı morfolojik özelliklerine dayanan prognoz ölçütlerine ihtiyaç duyulmaktadır. GIST'lerin malignite potansiyellerini belirlemek üzere, üzerinde tam olarak uzlaşmış bir sistem bulunmamakla birlikte yaygın olarak kabul gören yaklaşım tümörlerin, yerleşim gösterdiği anatomik bölge dikkate alınarak mitotik indeks ve tümör boyutuna göre risk grubunun saptanmasıdır (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.2: GIST'lerin karakteristik özellikleri (Joensuu 2006'dan Türkçeleştirilerek (TY: Tam yanıt, KY: Kısmi yanıt, SH: Stabil hastalık)

Özellikler	GIST'in karakteristiği
Klinik özellikler	GI sistem orijinli (>%95) Büyük boyutlu GIST'ler genellikle intraabdominal gelişim gösterirler İntraabdominal implant ve karaciğer metastazları sık görülür Akciğer ve lenf nodu metastazları gözlenmez
Histopatoloji / immünohistokimya	İğsi, epitelooid veya mikst hücre morfolojileri gösterir KIT(CD117) pozitif (~ %95) CD34 pozitif (~ %70) PKC-θ pozitif (> %70) Desmin negatif (>%95) S-100 negatif (~ %95)
Gen mutasyon analizleri	KIT mutasyonları (% 75-85) PDGFRA mutasyonları (~ %5)
Tedavi özellikleri	İmatinib tedavisi ile kontrol edilir (TY/KY/SH ~ %80-90) Geleneksel kemoterapiye cevap çok nadir (%5)

GIST'ler sitogenetik özellikleri yönünden de incelenmiş ve 5p ve 20q kazanımı ile 9p (veya kromozom 9), 22. Kromozomun uzun kolunun kaybı da kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. (Debiec-Rychter et al. 2001).

Çizelge 2.3: GIST'in klinik ve patolojik prognostik özellikleri olarak kabul edilen risk grubunun belirlenmesinde günümüzde en yaygın kullanılan parametreler (Fletcher et al. 2007 esas alınarak Steigen ve Eide 2009'un modifikasyonlarının Türkçeleştirilmesiyle)

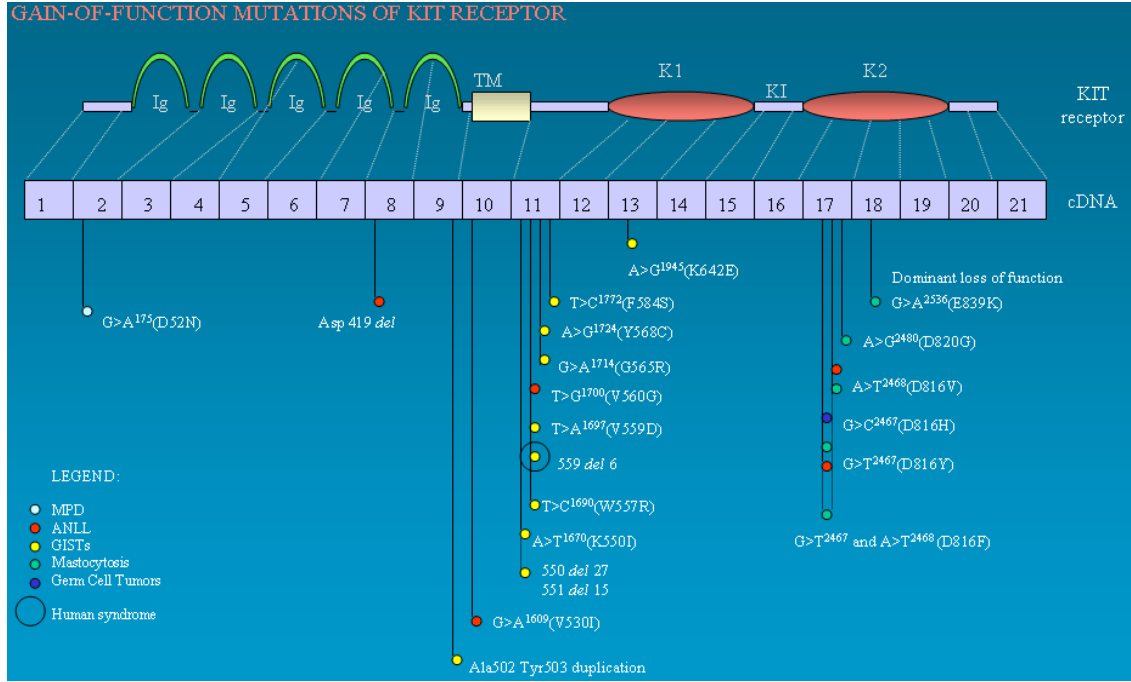
Tümör özellikleri		Progresyon riski	
Mitotik indeks	Boyut (cm)	Mide	İ.barsak ve diğer
< 5/ 50 HPF	≤ 2	Çok düşük	Çok düşük
	>2 ≤ 5	Çok düşük	Çok düşük
	>5 ≤ 10	Düşük	Orta
	>10	Orta	Yüksek
≥ 5/ 50 HPF	≤ 2	Çok düşük	Orta
	>2 ≤ 5	Orta	Yüksek
	>5 ≤ 10	Yüksek	Yüksek
	>10	Yüksek	Yüksek

HPF: High power field (Büyük büyütme alanı)

2.5. KIT VE PDGFRA GENLERİ İLE GIST GELİŞİMİ İLİŞKİSİ

KIT proteini, c-kit protoonkogeni tarafından kodlanır ve 145kDa'luk kütleyle sahiptir. KIT geni, Hardy Zuckermann-4 felin sarcoma virüs genomunda keşfedilen v-kit onkogeninin homologudur, 4. kromozom'un q11-q12 konumuna yerleşmiştir ve 21 ekzon içerir. Ligandı, sitokin (veya mast hücresi büyüme faktörü) olarak da bilinen SCF (Stem cell factor)'dür. KIT reseptörü, ligand yokluğunda iki ayrı zincir şeklinde bulunur. Normal koşullar altında iki ligand molekülünün bu iki ayrı dimere bağlanmasıyla birlikte bağımsız iki zincir birbirine bağlanır ve reseptör dimer hale gelir ve hücre içi tirozin kinaz birimlerinin aktifleştirilmesiyle, hücre proliferasyonu sonucunu beraberinde getirecek sinyal yollarının aktifleştirilmesi basamağı başlatılmış olur.

KIT reseptörü extraselüler, trans membran, juxta membran ve birbirinden kinaz insert (kinaz eklentisi) bölgeleri ile ayrılmış 2 tirozin kinaz birimlerinden oluşur. Bu yapısı sebebiyle reseptör tirozin kinazlar sınıfının tip III alt sınıfında, makrofaj koloni-uyarıcı faktörü M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) reseptörü, trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörleri (PDGFR) ile birlikte aynı grupta incelenir (Hirota and İsozaki 2006).



Şekil 2.2: KIT reseptörünün kısımları ve bu kısımların KIT cDNA'sı üzerinde karşılık geldikleri bölgeler ile reseptör üzerinde çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş mutasyonlar. Ig: İmmüoglobulin, TM: Transmembran, K1: Kinaz bölgesi 1, KI: Kinaz eklentisi (Kinase insert), K2: Kinaz bölgesi 2, cDNA: Komplementer DNA, MPD: Miyeloproliferatif hastalıklar, ANLL: Akut non-lemfositik lösemi, GIST: Gastrointestinal stromal tümör, A: Adenin, T: Timin, G: Guanin, C: Sitozin, D: Aspartik asit (Asp), N: Asparajin, F: Fenilalanin, V: Valin, G: Glisin, H: Histidin, Y: Tirozin (Tyr), E: Glutamik asit, Ala: Alanin, I: İzolösin, K: Lizin, W: Triptofan, R: Arjinin, C: Sistein, S: Serin (URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/KITID127.html>, Erişim tarihi: 03.05.2010)

Ekstraselüler birim, reseptörün ligandı tanıyıp bağladığı bölgedir ve immünoglobulin benzeri 5 ardışık şekilde birbirine bağlı, tekrar eden yapılardan oluşurken transmembran birim, reseptörün, hücre membranı içerisine gömülü olduğu bölgeye karşılık gelir.

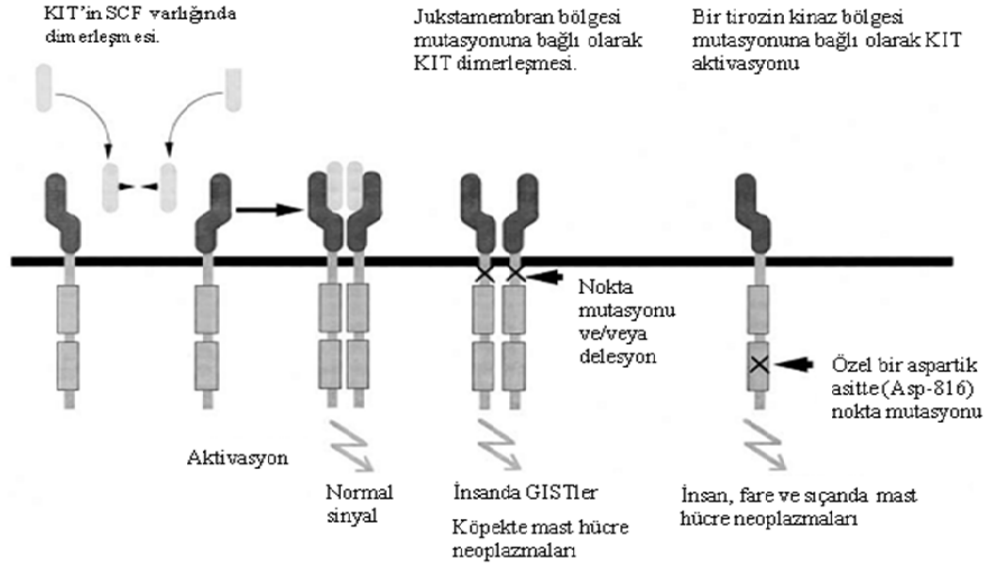
Juksta membran, hücre membranınin sitozole bakan yüzeyinin olduğu tarafta sitoplazma içerisinde yer alır ve reseptörün ligand bağımlı aktifleşme etkinliğini düzenler. KIT reseptörünün, tümör oluşumu ile sonuçlanan otoaktivasyonu (otofosforilasyonu), genellikle jukstamembran bölgesini kodlayan 11. ekzonda meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır.

Tirozin kinaz bölgelerinden gerçekleştirilen fosforilasyon aracılığıyla çeşitli yollar (PI3K/AKT ve MAPK gibi) aktive edilir ve hücre bölünmesi uyarılır (Ulrich and Schlessinger 1990).

KIT reseptörü hücrede farklı görevlerde bulunur. Farelerle yürütülen mutagenesis çalışmaları eritroblastlar, melanositler, ICH, germ hücreleri ile mast hücrelerinin gelişimleri için SCF-KIT sistemine ihtiyaç duyduklarını ortaya koymuştur. Bunların yanı sıra KIT, embriyonik dönemde farklılaşma olaylarının gerçekleştirilmesinde gereken yolların aktive edilmesinde de önemli rol oynar (Hirota and Isozaki 2006). KIT geni mutasyonlarının görüldüğü diğer hastalıklara örnek olarak piebaldism, miyeloproliferatif hastalıklar ve akut non-lenfositik lösemi verilebilir.

Başlangıçta mast hücresi neoplazmalarının nedeninin, KIT geninin TK II bölgesinde meydana gelen bir 'işlev kazanımı' mutasyonu olduğu düşünülmekteydi. Sonrasında Hirota ve arkadaşlarının daha önce de bahsedildiği üzere, GIST oluşumundan da aynı genin sorumlu olabileceğinden şüphelenmeleri ve GIST'lerde yaptıkları KIT geni mutasyon analizleri çalışmaları sonucunda GIST'lerin, KIT geninde ortaya çıkan 'işlev kazanımı' mutasyonları sebebiyle geliştiğine dair ilk bulgular elde edilmiştir. (Nishida et al. 1998, Taniguchi et al. 1999, Heinrich et al. 2002). Bugün artık GIST ile bağlantılı

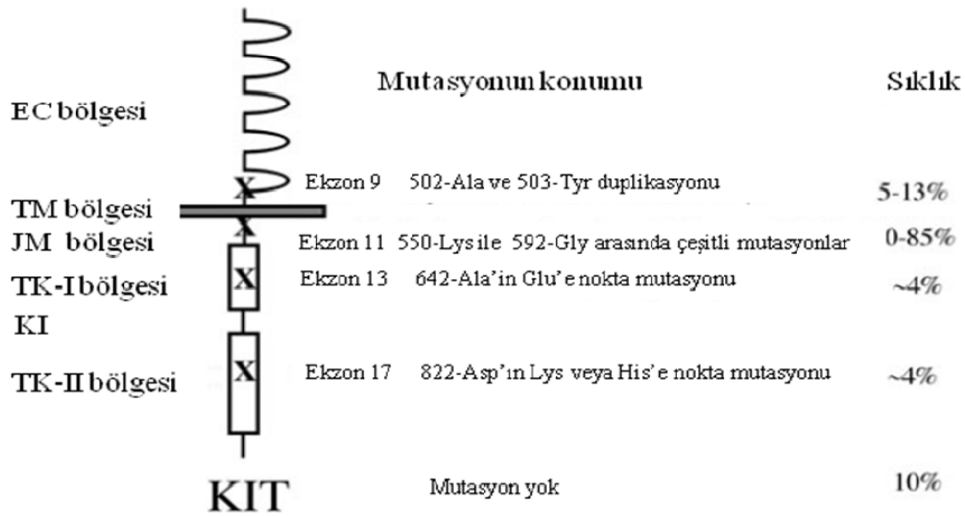
olarak KIT geninin dört ekzonunda mutasyon görüldüğü bilinmektedir. Bu ekzonlar, mutasyonların gözlenme sıklıklarına göre sırasıyla ekzon 11 (%70-85), ekzon 9 (%5-13), ekzon 13 (%4) ve ekzon 17 (%4) şeklinde bildirilmişse de (Hirota et al. 2006) bu rakamlar çalışmadan çalışmaya değişiklik göstermektedir.



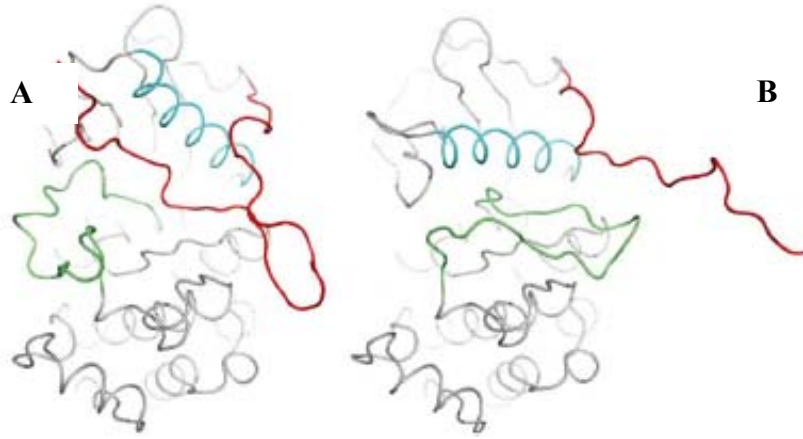
Şekil 2.3: KIT reseptörünün faaliyet şeklinin normal koşullar altında ve mutasyon etkisinde değişen faaliyetinin karşılaştırılması (Kitamura et al. 2001)

GIST'lerle ilişkili olduğu gösterilmiş diğer gen olan PDGFRA geni de KIT gibi, ürünü bir tip III reseptör tirozin kinaz olan bir genidir. KIT genine benzer özellikler taşır. Her iki gen de aynı kromozom üzerinde birbirlerine oldukça yakın konumlanmıştır. Öyle ki KIT geni 4.kromozomun q11-12 bandında yer alırken; PDGFRA geni q12 bandında yer alır. PDGFRA geni KIT'ten farklı olarak 22 ekzon içerir. Ancak iki genin amino asit dizileri arasında %35'lik bir benzerlik bulunmaktadır ve her iki gen de benzer yolları etkiler. GIST ile ilişkili olarak PDGFRA geninde tanımlanmış mutasyonlar, yine KIT genine benzer şekilde ve mutasyonun en sık görülenden başlayarak sırasıyla tirozin kinaz II (veya aktivasyon birimi, ekzon 18), juksta membran birimi (ekzon 12) ve kinaz I (ekzon 14) birimlerinde gözlenir. PDGFRA geninde görülen mutasyonlar da yine GIST'e yol açan KIT mutasyonlarında olduğu gibi 'işlev kazanımı' mutasyonlarına örnektir.

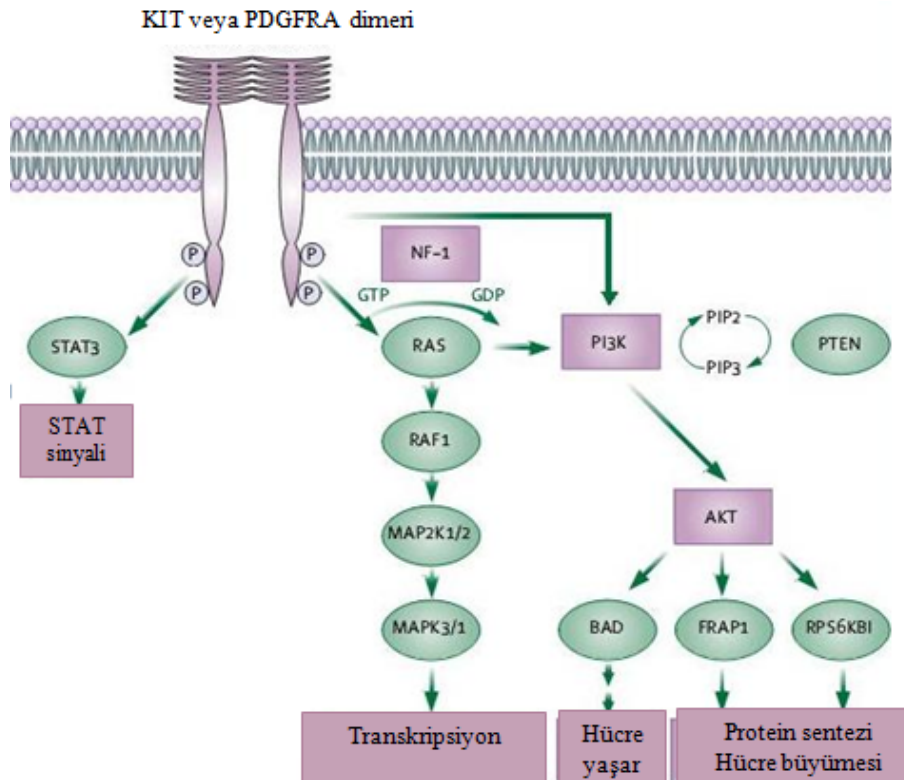
Sözü edilen mutasyonların KIT genini etkinleştirme mekanizmaları üzerine bazı araştırmalar yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir. Bu çalışmaların sonuçlarına göre ekzon 11'in kodladığı jukstamembran biriminde meydana gelen mutasyonlar, bu birimin yerine getirdiği 'ligand bağımlı reseptör dimerizasyonu' işlevini engellemekte, böylelikle reseptör; ligand gereksinimsiz olarak sürekli olarak dimer hale gelebilmekte, bir dış uyarıya ihtiyaç duymadan fosforile olabilmekte (otofosforilasyon), sonrasında gerekli sinyal yollarını (PI3K/Akt ve MAPK gibi), harekete geçirerek kontrolsüz hücre çoğalmasına ve dolayısıyla tümör gelişimine sebep olabilmektedir. Juksta membran biriminin genel olarak, inaktif KIT yapısı içinde, reseptörün aktifleşmesini inhibe edecek şekilde konumlandığı ifade edilmektedir. Bu süreçte 556-560 aralığındaki amino asitlerin, C terminal lobunun $\beta 6$ zincirini kararlı hale getirerek, $\beta 6\beta 9$ tabakasının oluşumunu engellediği belirtilmiştir. Bu bölgede meydana gelen mutasyonların, juksta membran bölgesinin inaktif kinaz yapısını kararlı hale getirme etkinliğini bozduğu sanılmaktadır. (Kitayama et al. 1995, Ulrich and Schlessinger 1990, Tornillo and terraciano 2006, Hirota et al. 2006, Loughrey et al.2006).



Şekil 2.4: KIT reseptörünün şematik gösterimi ve gen üzerinde gözlenen mutasyonların reseptör üzerinde denk geldikleri konum ile sıklıkları (Hirota and Isozaki 2006'dan Türkçeleştirilerek)



Şekil 2.5: Yabanıl (wild) tip KIT reseptörünün aktif (B) ve otoinhibe edilmiş (A) formları Juksta membran (kırmızı), A- ilmeği (yeşil) ve Ca heliks (cyan) bölgeleri, otoinhibe edilmiş ve aktif formda farklı şekillerde yönelmişlerdir.



Şekil 2.6: GIST'de tanımlanmış başlıca onkogenik yollar. Sinyal iletimi, KIT ve PDGFRA sinyal yolağının KIT veya PDGFRA mutasyonu yoluyla konstitüif aktivasyonu ile başlar ve apoptozisin inhibisyonu ve hücre proliferasyonuna sebep olur. Nörofibromin 1 geni işlev kaybı mutasyonu da GIST oluşumu ile ilgilidir ancak KIT ve PDGFRA mutasyonlarından bağımsız etkinlik göstermektedir. PI3K ve STAT3'ün

onkogenik olarak etkinleştirilmiş KIT/PDGFR α 'nın ana hedefleri olduğu düşünölmektedir. AKT: V-akt murin timoma viral onkogeni homoloğu, BAD: BCL2 hücre ölümlü antagonisti, FRAP1: FK506 bağlayan protein 12 rapamisin ilgili protein 1 (mTOR), GDP: Guanozin di fosfat, GTP: Guanozin tri fosfat, MAP2K1: Mitojen aktifleştirilmiş protein kinaz 1 (MEK1), MAP2K2: Mitojen aktifleştirilmiş protein kinaz 2 (MEK2), NF1Nörofibromin 1, P: Fosfat, PI3K: Fosfoinositid -3- kinaz, PIP2: Fosfatidil inositol-4,5-bisfosfat, PIP3: Fosfatidil inositol-3,4,5-tri fosfat, PTEN: Fosfataz ve tensin homoloğu, NRAS: Nöroblastoma RAS viral (v-ras) onkogen homoloğu, RAF1: V-RAF-1 murin lösemi viral onkogen homoloğu, RPS6KB1: Ribozomal protein S6 kinaz (70 kD) 1, STAT3: Transkripsiyon 3 Sinyal aracı molekülü ve aktivatörü, STAT5= Transkripsiyon 5 Sinyal aracı molekülü ve aktivatörü (Rubin et al. 2007'den türkçeleştirilerek)

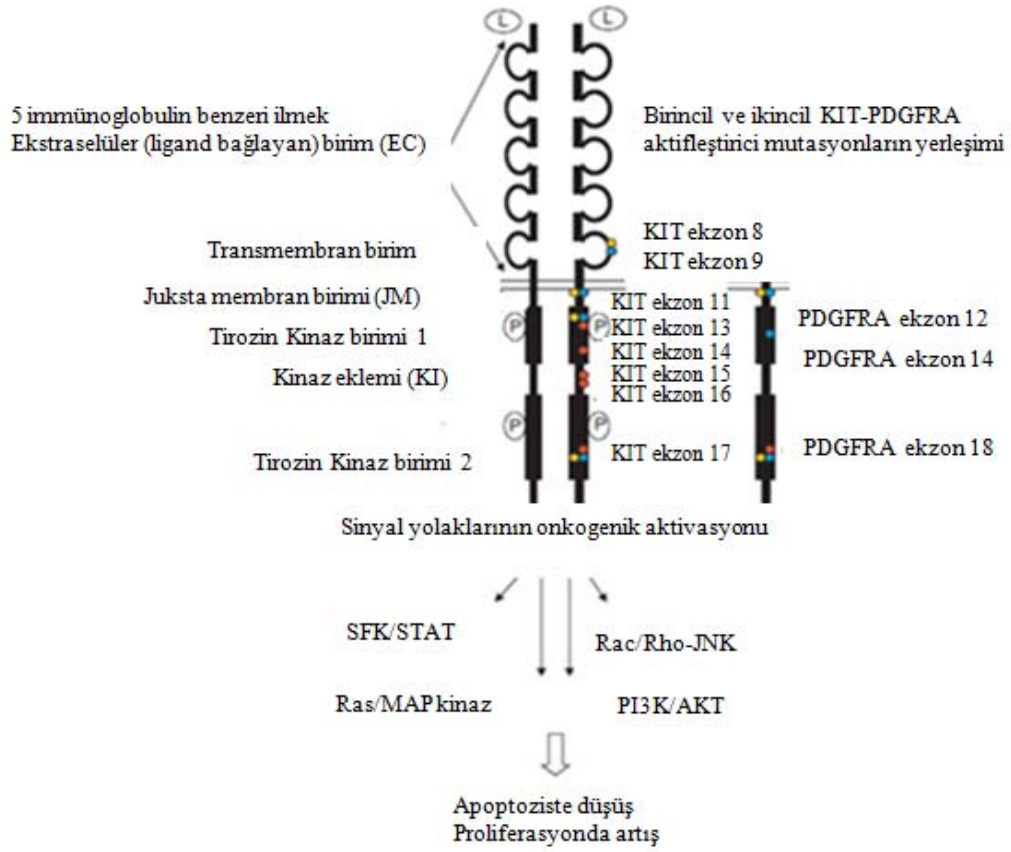
Ekzon 9'un kodladığı ekstraselöler bölgede meydana gelen mutasyonların tam olarak hangi mekanizma ile KIT genini aktifleştirdiği bilinmemekle birlikte; bu bölgeye karşılık gelen mutasyonun, ekstraselöler birimde antidimerizasyon motiflerini etkilediği ve bu yolla c-kit genini aktifleştirdiği sanılmaktadır.

Ekzon 13'te meydana gelen mutasyonun KIT genini hangi yolla aktifleştirdiğine dair kesin bilgiye literatürde rastlanmamıştır. Ancak bu bölgede görölen mutasyon genellikle 642. pozisyondaki amino asitle ilgilidir ve İmatinib tedavisine direnç ile ilişkilendirilmiştir (Nilsson et al 2005, Miettinen and Lasota 2001, Andersson et al. 2002, Heinrich et al. 2003, Sakurai et al. 2001, Lux et al. 2000, Debiec- Rychter et al. 2004, Wilmore et al. 2004, Kinoshita et al. 2003, Joensuu and Kindblom 2004).

Ekzon 17'de ortaya çıkan mutasyonların da aktifleştirme mekanizması henüz anlaşılabilmif değildir. Ancak genellikle 820 ve 822. pozisyondaki amino asitleri etkiler ve daha çok İmatinibe dirençle ilişkilendirilmiş ikincil mutasyonlar olarak ortaya çıkar (Kitayama et al. 1995, Chan et al, 2003, Tornillo and Terraciano 2006).

Ekzonların bir kısmında gözlenen mutasyonların, KIT reseptörünü ne şekilde aktifleştirdiği tam olarak bilinmese de, gerçekleştirilen mutasyon modelleme çalışmalarının çoğu meydana gelen mutasyonların, İmatinib'in ya doğrudan bağlanma bölgesini etkilediğini ya da ATP'nin bağlanma bölgesine erişimi (ulaşılabilirliği) etkilediği sonucuna işaret etmektedir (B.P.Rubin et al.2007).

Yapılan mutasyon analizi çalışmaları sırasında, bazı vakalarda KIT geni mutasyonu saptanamamıştır. Buna karşılık bir başka reseptör tirozin kinaz'ı kodlayan ve yine 4. kromozomda q12 bandında konumlanmış olan PDGFRA geninde mutasyonlar saptanmıştır (%7-12). Bu gendeki mutasyonlar, KIT geninden farklı olarak, daha çok aktivasyon bölgesine karşılık gelen ekzon 18'de meydana gelmektedir. Juxtamembran bölgesine (ekzon 12) ve kinaz I bölgesine karşılık gelen (ekzon 14) mutasyonları daha az sıklıkla görülmektedir. PDGFRA geninin 18. ekzonunda görülen mutasyonlar daha çok 842-849. kodonları etkilemektedir. Bu mutasyonlardan bazılarının İmatinib tedavisine direnç ile ilgili oldukları yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Aynı genin 12. ekzonunda meydana gelen mutasyonlar ise daha çok 561-571. kodonları etkilemekte ve İmatinib tedavisine iyi derecede yanıt alınmaktadır. 14. Ekzonda tanımlanmış tek mutasyon olan 659. pozisyondaki asparajin amino asidinin lizin'e dönüşümününün vitro ortamda İmatinib'e duyarlı olduğu saptanmıştır.



Şekil 2.7: KIT ve PDGFRA reseptörleri ve bu reseptörler üzerinde GIST ile ilgili olarak tanımlanmış mutasyonların şematik gösterimi (Lasota and Miettinen 2008'den Türkçeleştirilerek)

GIST vakalarının yaklaşık %10'luk bir kısmında ise herhangi bir mutasyon görülmemektedir. Bu bakımdan bu grup, 'wild' (yabani) tip olarak adlandırılmakla birlikte araştırmacılar bu grupta da henüz belirlenememiş bir başka reseptör tirozin kinaz kodlayan genin bundan sorumlu olabileceğini düşünmektedir.

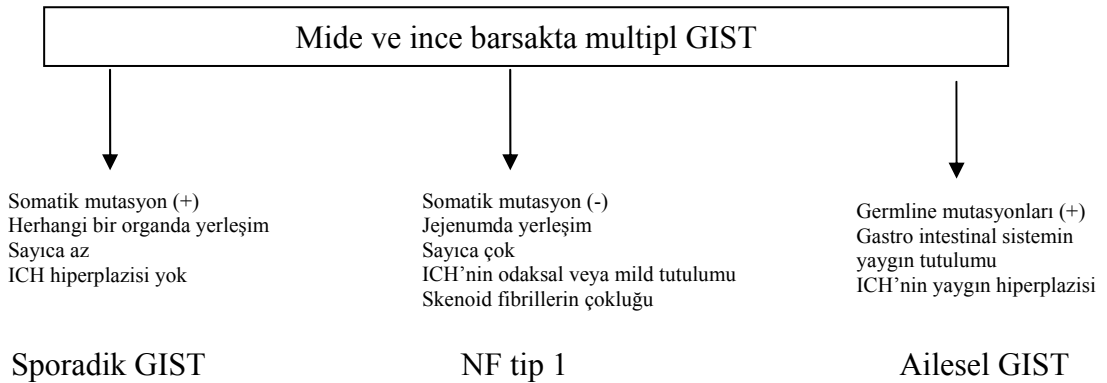
Tüm bunların dışında GIST, çocuklarda Carney triadı veya nörofibromatosis gibi sendromlarla bağlantılı olarak da ortaya çıkabilmektedir. Ancak bu vakalarda KIT veya PDGFRA gen mutasyonlarına nadir bazı vakalar dışında rastlanılmamaktadır; rastlanılanlarda da tespit edilen mutasyonlar GIST vakalarında tanımlanan 'sıcak noktalar (hot spots)' ile ilgili değildir. Hastaların %10-25'inde ise GIST, metastatik hastalıklara bağlı olarak gelişim gösterebilmektedir (Nilsson et al. 2005, Tran et al. 2005, Joensuu 2006).

Ailesel GIST vakaları oldukça nadir olmakla birlikte otozomal dominant şekilde kalıtılır ve germ hücrelerinde KIT ve PDGFRA gen mutasyonları görülür. Bazı ailelerde ise multipl GIST tanımlanmıştır. Bu ailelerin hasta bireylerinde non-nörofibromatosis tip-I hastalığı tanımlanmış olup, bu hastalıkla beraber multipl GIST'e de rastlanmıştır (Hirota and Isozaki 2006, Lasota and Miettinen 2008).

Çizelge 2.4: Ailesel GIST sendromu ve ilgili diğer genetik sendromlarla ilişkilendirilmiş kalıtsal KIT ve PDGFRA geni mutasyonları (Lasota and Miettinen 2008'den Türkçeleştirilerek)

Yerleşim yeri	MutasyonunProtein seviyesinde ifadesi	Genetik sendrom
KIT-JM	Asp419del	Ailesel GIST sendromu
KIT-JM	Trp557Arg	Ailesel GIST sendromu
KIT-JM	Val559Ala	Ailesel GIST sendromu
KIT-JM	Val560Gly	Ailesel GIST sendromu
KIT-JM	Val560del	Ailesel GIST sendromu
KIT-JM	Gln575_Leu576dup	Ailesel GIST sendromu
KIT-JM	Asp579del	Ailesel GIST sendromu
KIT-TK1	Lys642Glu	Ailesel GIST sendromu
KIT-TK2	Asp820Tyr	Ailesel GIST sendromu
PDGFRA-TK1	Tyr555Cys	Ailesel GIST sendromu
PDGFRA-TK1	Asp561Val	Çoklu ince barsak fibroz polipleri, lipomalar ve GIST
PDGFRA-TK2	Asp846Tyr	Ailesel GIST sendromu

Çizelge 2.5: Multipl GIST sonucunu beraberinde getiren farklı hastalıklar ve bu hastalıkların her birinin karakteristik özellikleri (Kang et al. 2007'den uyarlanarak)



Tümörün taşıdığı mutasyon tipinin, hem prognostik olarak hem de verilecek ilacın türünün ve dozunun belirlenmesinde önemli olduğu belirlenmiştir (Debiec-Rychter et al. 2006).

Çizelge 2.6: Farklı mutasyon tiplerinin İmatinib'e cevaplarının karşılaştırılması (Lasota and Miettinen 2008'den Türkçeleştirilerek)

Gen	Ekzon	İmatinibe cevabı araştırılan primer KIT ve PDGFRA mutasyonları	İmatinib mezilat'a duyarlılık
KIT	9	AY502-503dup. İn vitro İmatinib'e duyarlı	Stabil hastalık (% 47), İlerlemiş hastalık (%17), Yüksek doz uygulamasıyla artan 'Hastalıkta ilerleme olmaksızın sağkalım oranı'
	11	Del/ Del-İns Yanlış anlamlı değişimler Duplikasyon	En sık rastlanan mutantlar, in vitro İmatinib'e duyarlı. Nadir V559I mutanı in vitro İmatinib'e dirençli Tam yanıt %6, kısmi yanıt %61, stabil hastalık %25, ilerleyen hastalık %3
	13	K642E E635K	İn vitro İmatinib'e duyarlı Kısmi yanıt veya stabil hastalık
	17	D820Y N822K N822H	N822K ve N822H in vitro İmatinib'e duyarlı N820Y, N822K ve N822H mutasyonlu 4 hastada kısmi yanıt bildirildi. N822K için primer dirençlilik bildirildi
PDGFRA	12	D561V Del/ Del-İns Duplikasyon, İnsersiyon	D561V ve diğer bazı ekzon 12 mutantları, in vitro 'duyarlı' sonucunu vermiştir. Az sayıdaki vakalardan İmatinib tedavisi uygulananların büyük çoğunluğundan objektif yanıt alındığı bildirildi
	14	N659K	İn vitro İmatinib'e duyarlı olduğu gösterilmiştir. Ancak klinik düzeyde buna dair bilgi bulunmamaktadır.
	18	DH842-45del DM842-44del I843del IH843-45del D842V D846V	Bu ve benzeri bazı mutantların in vitro İmatinib'e duyarlı oldukları gösterilmiştir. İmatinib verilen az sayıdaki hastanın çoğundan objektif yanıt alınmıştır. D842V, in vitro İmatinib'e dirençlidir. D846Vmutanı da içeren 7 vakada direnç saptandı. Vakaların birinde 5 aylık İmatinib tedavisinden sonra stabil hastalık gözlemlendi.
KIT PDGFRA	9,11,13,17 12,14,18	Yabanıl (wild) tip Yabanıl (wild) tip	Kısmi yanıt (%23), stabil hastalık (%50) ve ilerleyen hastalık (%19)

Çizelge 2.7: Primer mutasyonun yeri ve tipi ile tümörün içerdiği hücre tipi ve prognoz arasındaki ilişki (Lasota and Miettinen 2008'den Türkçeleştirilerek)

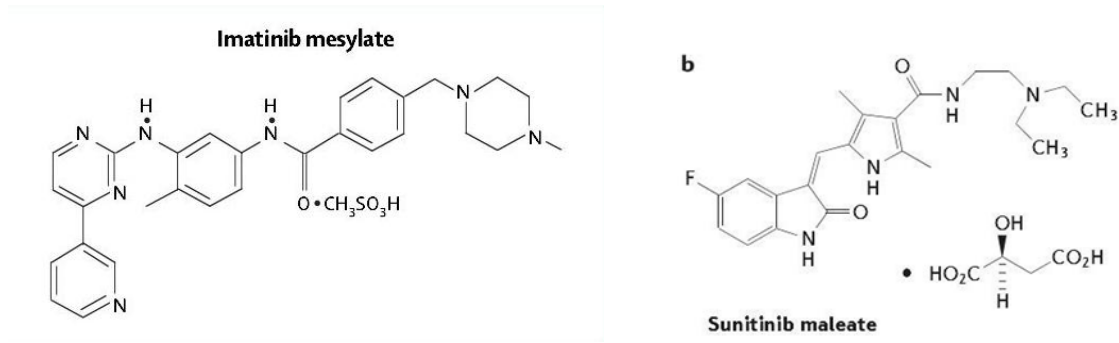
Gen	Klinikopatolojik Özellikler	Tümör Tipi	Prognostik Değeri
KIT- EC(Ekzon 9) AY502-503dup	İntestinal GIST'ler ile ilişkilendirilmiştir. Mutasyonu taşıyan tümörlerin >%90'ı İ.barsak yerleşimli	Genellikle işi hücreli	İntestinal GIST için prognostik değeri yok.
KIT-JM (ekzon 11) WK557-558del Delesyon Delesyon- insersiyon	GI sistemin farklı bölgelerindeki GIST'lerde oluşur	İşsi hücre Spektrumu ve epiteloid tümörler	Özellikle gastrik GIST için yüksek maligniteyi belirtiyor olabilir.
Değişimler			Gastrik GIST için daha az malign davranışı belirtiyor olabilir.
Duplikasyonlar	Gastrik GIST ile ilişkilendirilmiş		Gastrik GIST için daha az malign davranışı belirtiyor olabilir.
KIT-TK1 K642E	GI sistemin farklı bölgelerindeki GIST'lerde oluşur	Genelde işsi hücreli tümör	Gastrik GIST için yüksek maligniteyi belirtiyor olabilir.
KIT-TK2 (Ekzon 17) N822K	İntestinal GISTde 2 kat daha yaygın		Prognostik değeri yok
PDGFRA-JM (Ekzon12) Delesyonlar Değişimler	Gastrik GIST ile yakından ilgili (mutasyonun saptandığı örneklerin >%90'ı mide tümörü.	Genelde epiteloid ve mikst hücreli tümör	Gastrik GIST için da düşük Malign davran belirtiyor olabilir.
PDGFRA-TK1 (Ekzon14) Değişimler			
PDGFRA-TK2 (Ekzon18) Değişimler Delesyonlar			
KIT PDGFRA (Yabanıl (wild) tip	Gastrointestinal sistemin farklı bölgelerinde ortaya çıkar	İşsi ve epiteloid hücreli tümör spektrumu	Prognostik değeri yok
	NF1 hastalarında GIST (intestinal tümörler)	Çoğunlukla sadece epiteloid hücreli tümörler	Prognostik değeri yok
	Carney triadı bağlantılı GIST'ler ve pediatrik GIST'ler	Genellikle epiteloid tümörler	

2.6. HEDEFE YÖNELİK GIST TEDAVİSİ

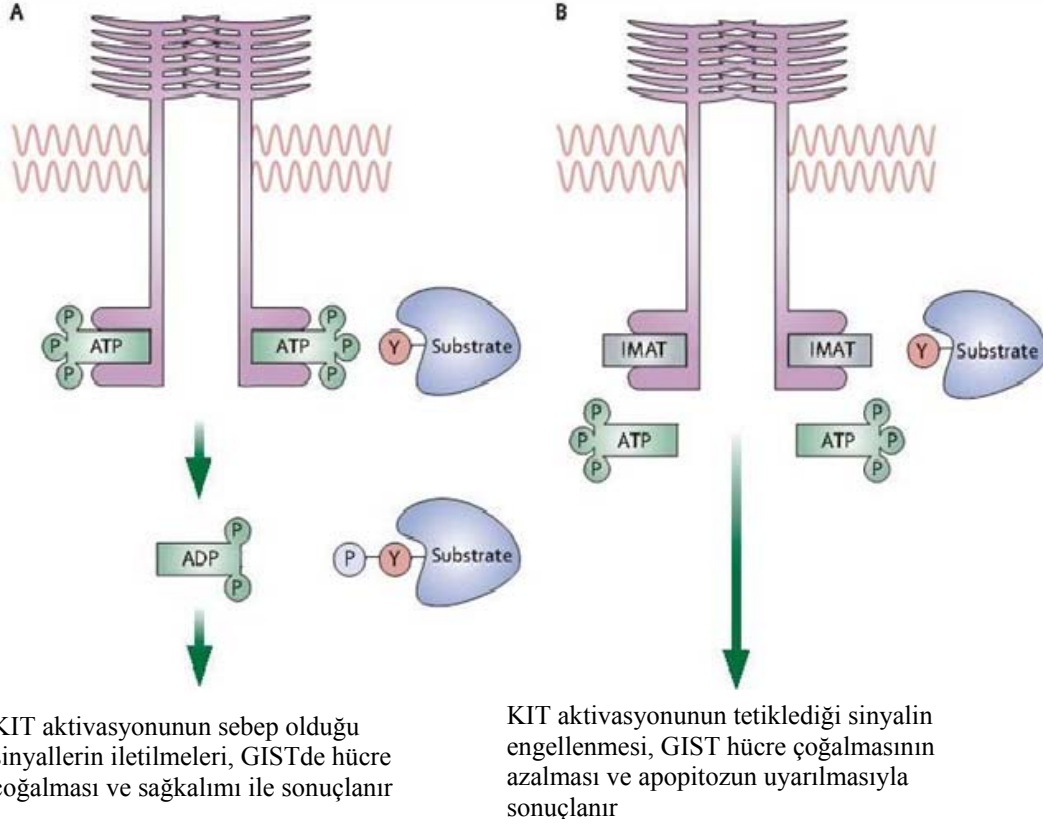
GIST tedavisi için ilk seçenek hala cerrahi rezeksiyondur. Ancak ileri evre ve metastatik tümörlerde İmatinib mezilat veya diğer seçici RTK inhibitörlerine başvurulmaktadır. Metastatik GIST'ler için ise tedavide ilk seçenek İmatinib tedavisidir (Wardelmann et al. 2007).

GIST gelişimi için KIT ve PDGFRA gibi reseptör tirozin kinazların aktivasyonunun gerekli olduğunun anlaşılması üzerine, aktifleşmiş bu tirozin kinazların inhibisyonlarının da etkili bir tedavi şekli olabileceği düşünülmüştür. Bu düşüncenin bir ürünü olarak geliştirilen ilk reseptör tirozin kinaz inhibitörü (KIT, PDGFR ve Bcr-Abl inhibitörü) bir 2-fenilamino pirimidin türevi olan 'İmatinib mezilat'tır.

Şekil 2.8: Hedefe yönelik GIST tedavisinde kullanılan ve FDA tarafından da onaylanmış iki terapötik ajanın kimyasal formülleri (Atkins et al. 2006)



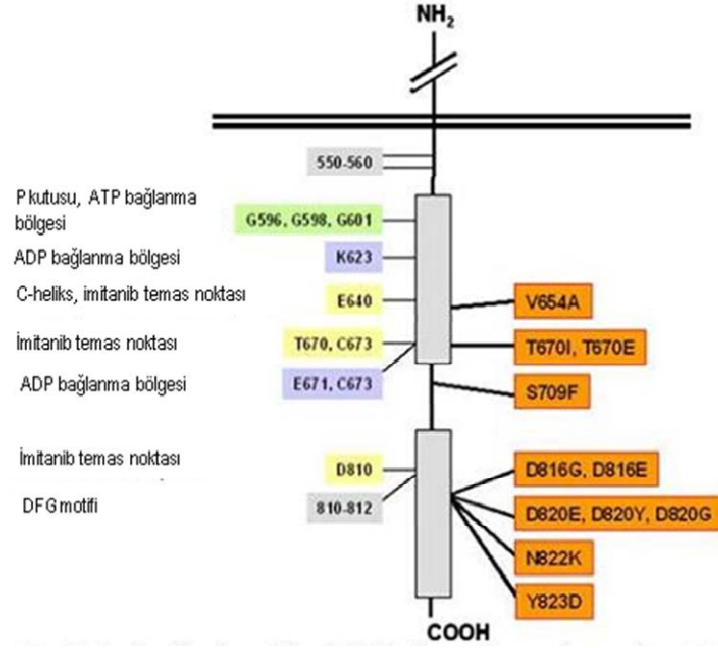
İmatinib mezilat'ın etkisini gösterme şeklinin anlaşılmasına yönelik olarak farklı yaklaşımlar ortaya atılmış, farklı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bunlardan ilkinde göre İmatinib etkisini, ATP'nin bağlandığı bölgeye bağlanarak gösterir. Böylelikle ATP'nin reseptöre bağlanması ve dolayısıyla fosforilasyonu engellenmiş olur. Bu tip inhibisyon, kompetitif (yarışmalı) inhibisyona örnek teşkil etmektedir.



Şekil 2.9:İmatinib mezilat'ın tirozin kinaz inhibitörü etkisini gösterme şekli. **A)** Normal koşullarda ATP, KIT veyaPDGFRA'nın aktif bölgesine bağlanır ve reseptörü veya hedef bir başka substratı fosforilleyerek otoaktivasyonuna sebep olur ve böylelikle sinyal iletimini de aktifleştirmiş olur. **B)** İmatinib, ATP ile aynı bölgeye bağlandığı için, yarışmalı inhibitör olarak nitelendirilir. Böylelikle sinyal iletim sürecinin sonraki basamaklarında yer alan substratların fosforilasyonunu ve dolayısıyla KIT veya PDGFRA sinyalizasyonunu inhibe etmektedir. ATP: Adenozin tri fosfat, ADP: Adenozin di fosfat, IMAT: İmatinib (Rubin et al. 2007)

Ortaya atılan diğer bir yaklaşım, KIT proteininin mutant izoformlarının kararsız olduklarını ve hızlı degradasyonlarını engellemek için bir 'sıcaklık şoku proteini' (HSP 90 gibi) ile etkileşime girmeye gereksinimleri olduğunu ifade etmektedir (Bauer et al. 2006, Rubin et al. 2007). Bu yaklaşıma göre İmatinib ikinci etkisini, HSP90 molekülleri ile mutant proteinler arasındaki etkileşimi engelleyerek (veya bir HSP90 inhibitörü ile sinerjistik olarak çalışması) dolaylı olarak mutant proteinlerin, proteazom aracılı degradasyonlarına sebep olarak gösterdiği ifade edilmektedir (Nakatani et al. 2005, Rubin et al. 2007).

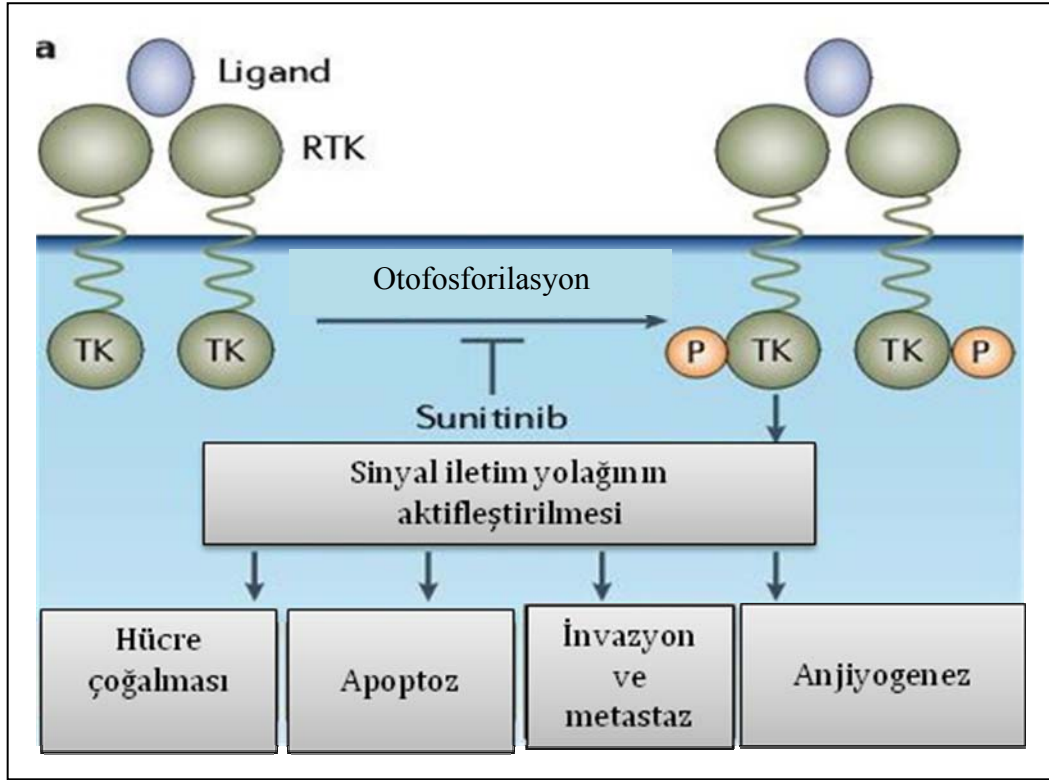
İmatinib'in KIT pozitif hastaların tedavisinde kullanılmaya başlanması devrim niteliğinde olmuştur ancak gerek cerrahi müdahale gerekse İmatinib tedavisi uygulanan hastaların yaklaşık yarısında, tedavi sonrası (radyo ve kemoterapiye dirençli) nüks ve/veya metastaz ortaya çıkmaktadır (Wardelmann et al. 2007). İmatinib'in total KIT ifadesini baskılamaksızın etkisini göstermesinin de etkisiyle bir süre sonra KIT ve PDGFRA genlerinde İmatinib'e direnç ile ilişkilendirilen ikincil mutasyonlar rapor edilmiştir.



Şekil 2.10: İmatinib bağlanma bölgeleri ve ikincil direncin gelişmesine sebep olan, İmatinib tedavisi altındaki GIST'lerde gözlenen ikincil KIT geni mutasyonları (Wardelmann et al.2007'den Türkçeleştirilerek)

Bu durum araştırmacıları moleküler direnç mekanizmalarını, mutasyonların İmatinib ile ilişkisini ve olası yeni inhibitör ve hedef moleküllerini araştırmaya itmiştir. Bu araştırmalar sonucunda hastaların İmatinib tedavisine verdikleri yanıtın, taşıdıkları mutasyonların tipi ve gerçekleştikleri bölge ile doğrudan ilgili olduğu bulgusuna ulaşılmıştır (Çizelge 2.6). İmatinib tedavisine yanıt vermeyen hastaların tedavisinde kullanılabilir yeni bir reseptör tirozin kinaz inhibitörünün bulunmasına yönelik çalışmalar 'sunitinib'in keşfiyle sonuçlandı. Sunitinib KIT, PDGFRA, FMS benzeri tirozin kinaz-3 ve VEGFR-2 inhibitördür. VEGF grubu reseptörleri ile PDGF grubu reseptörleri, kanser hücresinin proliferasyonu, hayatta kalması ve tümör anjiyogenezinde önemli rol oynamaktadır.

Preklinik ve hayvan modelleri ile yürütülen çalışmalardan elde edilen bilgiler, VEGFR-2 ve PDGFR β 'nin eşzamanlı inhibisyonlarının; tek başına bir başka RTK'nın inhibe edilmesiyle elde edilecek olandan çok daha büyük antitümör etkileri olacağını ortaya koymuştur. Sunitinib'in, İmatinib'e dirençli klonlar üzerinde baskılayıcı bir etkisinin bulunduğu yönünde deliller mevcuttur.



Şekil 2.11:Etkinliği değişmiş RTK aracılığıyla gerçekleşen hücresel cevaplar ve Sunitinib'in bu süreç içerisindeki etki şeklinin şematik gösterimi (Atkins et al. 2006)

Ne var ki zamanla Sunitinib'e de dirençli klonlar tanımlanmıştır ve bu durum yeni kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesini gerektirmiştir. Preklinik çalışmalar, İmatinib ve sunitinib'e direnç ile ilişkilendirilmiş mutasyonları taşıyan hastaların tedavilerinin, mutant kinaz proteinlerini inhibe eden daha güçlü kinaz inhibitörleri ile tedavi edilebileceğini düşündürmektedir (Fletcher and Rubin 2007).

Çizelge 2.8: GIST tedavisi için geliştirilen ikinci nesil ilaçlar/ajanlar ile bunların hedeflediği moleküller (Lasota and Miettinen 2008)

Ajan/ İlaç	İnhibisyonun moleküler hedefi	Geliştirici/ Üretici
Sunitinib malate, (Sugen) SU11248	KIT, PDGFR, VEGFR'ler, FLT3	Pfizer
AMN107 (Nilotinib)	KIT, PDGFR'ler, BCR-ABL	Novartis
AZD2171	VEGFR, KIT, PDGFR'ler	Astrazeneca
OSI-930	VEGFR, KIT	OSI pharmaceuticals
MP-470	KIT, PDGFR'ler, RET, AXL, MET	Supergene pharmaceuticals
BMS-354825 (Dasatinib)	SRC ailesi kinaz inhibitörü ABL, KIT, PDGFR'ler	Bristol-Myers Squibb
PTK787 /ZK22584	VEGFR, KIT, PDGFR'ler	Novartis ve Schering AG
XL820	KIT, PDGFRB, VEGFR	Exelixis
PKC412	KIT, PDGFR'ler, VEGFR-2 Protein kinaz C	Novartis
AMG 706	VEGFR, KIT, PDGFR'ler, RET	Amgen
Everolimus (RAD001)	AKT yolağında mTOR	Novartis
CCI-779 (Temsilolimus)	AKT yolağında mTOR	Wyeth pharmaceuticals
KRX-0401 (Perifosine)	AKT	KERYX Biopharmaceuticals
BAY 43-9006 (Nexavar)	MAPK yolağındaki RAF Kinazların inhibitörü, KIT, PDGFRB, VEGFR-2 VEGFR-3, FLT3, RET	Bayer Pharmaceuticals corp. Onyx Pharmaceuticals Inc.
IPI-504	HSP 90 inhibitörü	Infinity Pharmaceuticals
Flavopiridol	KIT ifadesi baskılayıcısı, Apoptozisi indükler, ayrıca CDK inhibitörüdür.	National Institutes of Health Bethesda, MD, USA

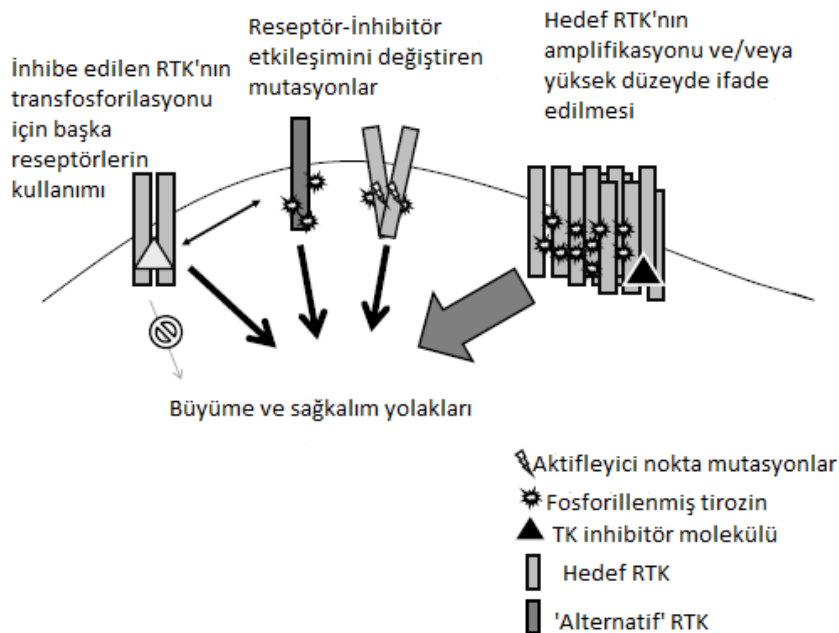
İmatinib, sunitinib ve nilotinib gibi RTK'dan farklı olarak flavopiridol, bir transkripsiyon inhibitörü olarak iş görür. Flavopiridol'un uygulandıktan çok kısa bir süre sonra tümör hücrelerinde antiapoptotik bcl-2, mcl-1 gibi proteinlerin ifade düzeyini düşürdüğü, bunu takiben KIT transkripsiyonunu baskıladığı ve bunun bir sonucu olarak (GIST hücrelerinde

apoptozis'in gerçekleşmesi için KIT baskılanmasının yeterli olduğu bildirilmiştir) sürecin apoptozis ile sonlandığı bildirilmiştir. Flavopiridol, pozitif transkripsiyonal uzama faktörünü inhibe ettiği gibi, KIT promotorünün etkinliğini de azaltmaktadır. Tüm bu etkiler sonuçta, hücre yüzeyinde işlevsel olarak olgun KIT proteini miktarında genel bir düşüşe, bu düşüş ise 703 ve 721. konumdaki tirozin köklerinden otofosforilasyon miktarında da azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (Sambol et al. 2006).

2.7. İMATİNİB'E DİRENÇ MEKANİZMALARI VE İLAÇ GELİŞTİRME STRATEJİLERİ

İmatinib tedavisine dirençli hücre kültürleri ve yine İmatinib tedavisine yanıt vermeyen hastalarla yürütülen farklı araştırmalar, bu güne dek 6 farklı mekanizmayı ortaya çıkarmıştır. Bu mekanizmalar sırasıyla:

- Fonksiyonel direnç (exon 9 ve WT KIT)
- Genomik amplifikasyon ve KIT ifadesinde artış
- Kanser hücrelerinin ikincil mutasyonlar yoluyla edindikleri kazanımlar.
- Farklı RTK'ların etkinleştirilmesi.
- İmatinib'in ABCB1/ABCC1 taşıyıcıları aracılığıyla ATP harcanarak dışarı atılması
- Yeni bir 'kinaz yolu(kinase switch)' kullanımı, şeklindedir (Mahadevan et al. 2007)



Şekil 2.12: Tirozin kinaz (TK) inhibitörlerine karşı kazanılmış bağışıklıktan sorumlu başlıca mekanizmalar (Sierra et al.2010'dan Türkçeleştirilerek)

İmatinib'in etkisini gösterme şeklinden dolayı ekzon 9 mutasyonları taşıyan ve herhangi bir mutasyon içermeyen yabancıl (wild) tip vakalarda İmatinib tedavisinden yanıt alınamayabilmektedir.

İmatinib'in, hücredeki reseptör tirozin kinazların otoposforilasyonunu engellemesine tümör hücresi, hücredeki KIT proteininin miktarını KIT geninin ifadesini arttırarak (veya genomik amplifikasyon yoluyla yükselterek) karşılık verebilmektedir (Bauer et. al. 2005, Mahadevan et al. 2007). Böylelikle tedavi sürecinde kullanılan İmatinib dozu, hücredeki hedef moleküllerinin tamamını inhibe etmede yetersiz kalabilmektedir. Bu tip direnç mekanizması, İmatinib tedavisinde doz arttırımı yoluna gidilerek çözümlenebilmektedir. Bu konuda sınırlayıcı bileşenler ise, ilacın toksik özellikleri ve ilacın belirli bir dozun üzerinde verilmesi halinde dahi bundan bir fayda elde edilememesidir (limit doz 800 mg/gün olarak ifade edilmektedir).

Tümör hücrelerinin yararlandığı diğer bir mekanizma ise, ikincil mutasyonlar yoluyla edindikleri kazanımlar sonucunda (İmatinib'in bağlandığı bölgelerin 3 boyutlu yapılarının mutasyonlar sonucunda değişmesi ile) İmatinib'in etkisiz kalmasıdır (Chen et. Al. 2004, Mahadevan et al.2007). Hedef molekülün hedef bölgesinde gerçekleşen 3 boyutlu yapı değişikliği İmatinib'in bağlanmasını engelleyeceğinden, böylesi bir durumda doz arttırımında bulunmanın herhangi bir faydası da olmamaktadır.

Hücrenin İmatinib'in hedef molekülleri yerine, benzer işlev üstlenen ve İmatinib'e hedef olmayan yeni reseptör tirozin kinazları kullanması, İmatinib'e direnç mekanizmalarından bir başkasıdır (Mahadevan et.al.2005/ Mahadevan et al. 2007). Bu durumlarda terapötik RTK inhibitörlerinin hedefi, KIT veya PDGFRA yerine kullanılan bu yeni reseptörün tirozin kinaz bölgesi olmaktadır.

Alternatif bir diğerk mekanizma da, KIT ifadesinin 100 katın da üzerinde azaltılması (bu yolun kullanımından vazgeçilmesi veya büyük ölçüde azaltılması) ve yerine bir başka ‘kinaz yolu’nun aktifleştirilmesidir. Bu direnç mekanizması örneğinde hücre, ilaca daha üst düzeyde (aynı reseptörde yapısal değişiklik ya da reseptör değişikliği yerine bütün bir yolun değiştirilmesi) bir cevap vermiş olduğundan böylesi bir değişikliğin; diğerk genlerin ifade seviyelerinde ve hücre morfolojilerinde değişimleri de beraberinde getirdiği bildirilmiştir. Bildirilen bu mekanizmanın bir gereği olarak hücrede, AXL kinaz yolu ve onun bileşenlerine ait genlerin ifadelerinde yüksek artışlar gözlenirken; KIT yolu ve onunla ilgili genlerin ifadelerinde azalma bildirilmiştir. AXL kinaz yoluyla İmatinib’e sonradan direnç geliştiren hücrelerde ise; iğsi hücre tipinden epiteloid hücre tipine bir değişim de bildirilmiştir (Mahadevan et al. 2007). Bu değişime sebep olabileceği düşünölen proteinler ise hücre iskeleti proteinleri, hücre adezyon molekülleri ve ekstra selöler matriks proteinleri başlıkları altında incelenmiştir (Mahadevan et al. 2007). Bu tip direnç mekanizmasına (ve V654A nokta mutasyonu mutantlarına) yönelik tedavide İmatinib kullanılamasa da MP470 numaralı terapötik ajanın, bu iki molekülün tirozin kinaz bölgelerine bağlanarak onları inhibe edebileceği, 3 boyutlu moleköler modelleme çalışmaları ile ortaya konmuştur (Mahadevan et al. 2007).

İmatinib’e direnç mekanizmalarından bir başkası da, hücre içine giren İmatinib moleküllerinin ATP harcanarak, ABCB1 / ABCC1 taşıyıcı proteinleri aracılığıyla, yeniden hücre dışına taşınmasıdır (Theou et al 2005, Mahadevan et al. 2007). Böylelikle İmatinib, reseptör üzerinde yer alan hedef bağlanma bölgelerine bağlanamamakta ve etkisini gösterememektedir.

İmatinib’e dirençle ilişkilendirilmiş ikincil mutasyonlar taşısa da KIT proteini, pek çok GIST vakasında önemli ölçüde ifade edilir ve bu durum aslında bir ilaç geliştirme stratejisi olarak, reseptör tirozin kinaz inhibitörü geliştirme yaklaşımının sürdürölme sebeplerinden biri olarak görölmektedir (Fletcher et al. 2003, Bauer et al. 2006). Bu yaklaşımın ürünleri olarak ilerleyen çalışmalarda daha farklı ve güçlü RTK inhibitörleri keşfedilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin ‘nilotinib’ gibi daha güçlü ilaçlarla, var olan RTK inhibitörlerine dirençli mutant proteinleri etkisiz hale getirmenin mümkün olabileceği

çalışmalarla gösterilmiştir. Bazı yeni nesil reseptör tirozin kinaz inhibitörleri, reseptör tirozin kinazlara ek olarak başka kilit molekülleri de inhibe edebilmektedir. Bunlara örnek olarak PKC 412, Protein kinaz c'yi; AMG 706, ret'i; Sorafenib, raf'ı; Dasatinib, Src-Abl ikilisini; AMN 107, Bcr-Abl füzyon proteinini; SDX 102, AMP sentezini; RAD 001, mTOR'u inhibe etmektedir.

İlaç tedavisinde gündeme alınmış bir diğer yaklaşım şekli de, KIT proteininin fosforile olmasını engellemekten farklı olarak KIT geninin transkripsiyonunun engellenmesi yaklaşımıdır. Bu yaklaşımla denenmiş transkripsiyon inhibitörlerine örnek olarak 'Flavopiridol' verilebilir (Sambol et al. 2006).

Bir diğer yaklaşımda ise Hsp 90 molekülü hedef molekül olarak belirlenmiştir (Bauer et al. 2006). Bu şekilde sentezlenen protein molekülü stabil (kararlı) olarak kalamamakta ve parçalanmaktadır. İlaç geliştirme konusunda izlenen bu yaklaşımla KIT ifadesi yönünden pozitif olan GIST'lerde onkogenik KIT proteinlerini (İmatinibe duyarlı olanlar kadar dirençli olanları da) inhibe ettiği gösterilmiştir (Bauer et al. 2006). İmatinib'e duyarlı olanlar kadar dirençli KIT proteinlerinin de inhibisyonunu sağlaması, bu yaklaşımın güçlü yanı olsa da KIT proteinlerinin HSP90 inhibisyonuna karşılık olarak HSP70 ile etkileşimlerinde gözlenen artış düşündürücüdür (Bauer et al. 2006). Farklı terapötik ajanların bir arada kullanılması ise göz önünde bulundurulan diğer bir seçenektir ve hastalığın tedavisinde kullanılabilecek ilaç geliştirmeye yönelik çalışmalar halen devam etmektedir.

3) GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışma kapsamındaki hastalar ve örneklerin niteliği:

Bu çalışma, farklı merkezlerde (Çizelge 3.1) 1996-2009 yılları arasında GIST tanısı almış 500'e yakın vakanın arasından seçilen, Türkiye GIST veri tabanında patolojik ve klinik prognostik parametreleri ile kayıtlı 104 hastanın tümörlerine ait parafin bloklardaki doku örnekleriyle gerçekleştirilmiştir. Ancak bunların 68'i mutasyon varlığı bakımından incelenebilmiş; geriye kalan örneklerin ise dizi analizi öncesinde ilgilenilen gen bölgeleri çoğaltılmadığı için çalışmadan çıkarılmıştır. Hastalara ait klinik ve patolojik prognostik veriler, GIST veri tabanı kayıtlarından elde edilmiştir. Hastalardan 14'ünün İmatinib kullanımları, ilaca yanıtları ve son durumlarına dair bilgi mevcuttur ancak diğer 54 hastaya ait ilgili verilere ulaşılamamıştır.

Çizelge 3.1: Hastaların merkezlere göre dağılımı

Merkez	Hasta sayısı
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi	56
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	8
Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi	3
Hacettepe Tıp Fakültesi	1

Söz konusu doku örnekleri, tümörün mitotik indeksi, çapı ve yerleşim yeri dikkate alınarak önceden tanımlanmış olan çok düşük, düşük, orta ve yüksek risk gruplarına göre sınıflandırılmış; çalışmanın amacı doğrultusunda ağırlıklı olarak orta ve yüksek risk grubunda değerlendirilenler mutasyon incelenmesi için çalışma kapsamına alınmıştır. (Çizelge 2.4).

Çalışma kapsamındaki hasta örnekleri, GIST veri tabanından ve merkezlerin arşivlerinden hasta kimlik bilgileri ile ilişkilendirilmeye olanak vermeyecek şekilde anonimize edilmiştir. Bu nedenle çalışma etik kurul onayı gerektirmemektedir.

3.2 Moleküler Testler

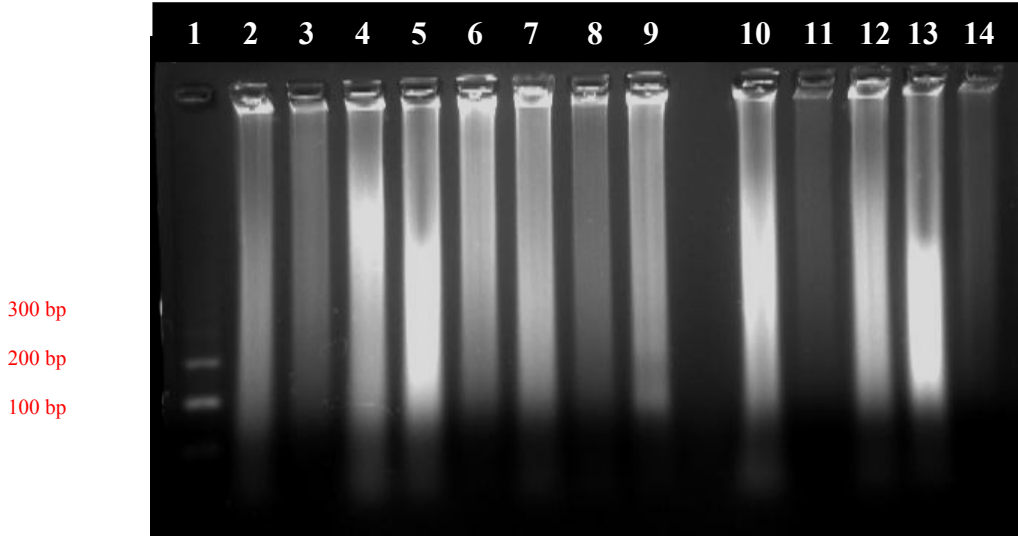
3.2.1 DNA Eldesi

Formalin tesbitli tümör dokusu içeren parafin bloklardan (FTPB) alınan 6 µm kalınlığında toplam 25 mg'dan ağır olmayan miktardaki kesitler, Ksilen (Merck, Almanya) ve saf etanol (Merck, Almanya) ile deparafinizasyon ve kurutma işlemlerinden sonra QIAGEN QIAamp DNA mini kit kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri, kısa süreli kullanım amacıyla +4; daha uzun süreli saklama amacıyla ise -20°C'de saklanmıştır.

Ekstraksiyon sonrasında elde edilen DNA'ların %1'lik agaroz (peggold universal agarose, Almanya) jel elektroforeziyle, DNA moleküllerinin bütünlüklerinin analizi amacıyla incelenmiştir. Elde edilen jel görüntülerinde, jel boyunca sürüntü gözlenen örnekler degrade olarak nitelendirilmiştir (Şekil 3.1). Ayrıca DNA örneklerinin nanodrop (NanoDrop™1000 spectrophotometer, Kanada) kullanılarak saflık ve miktar tayinleri yapılmıştır. Bu bilgiler kullanılarak PZR için uygun seyreltme oranları belirlenmeye çalışılmıştır.

3.2.2 Elde edilen DNA moleküllerinin PZR için uygunluklarının SL PZR ile belirlenmesi

Formalin tesbitli dokuların çalışılması sebebiyle tesbit işleminin DNA üzerindeki etkilerinin ve bundan sonraki mutasyon çalışmalarının güvenilirliğinin belirlenmesi için, incelenen DNA moleküllerinin degradasyon düzeyinin anlaşılması amacıyla çizelge 3.2'de belirtilen housekeeping genleri çoğaltan primerler ile multipleks PZR (size ladder) yöntemi kullanılmıştır.

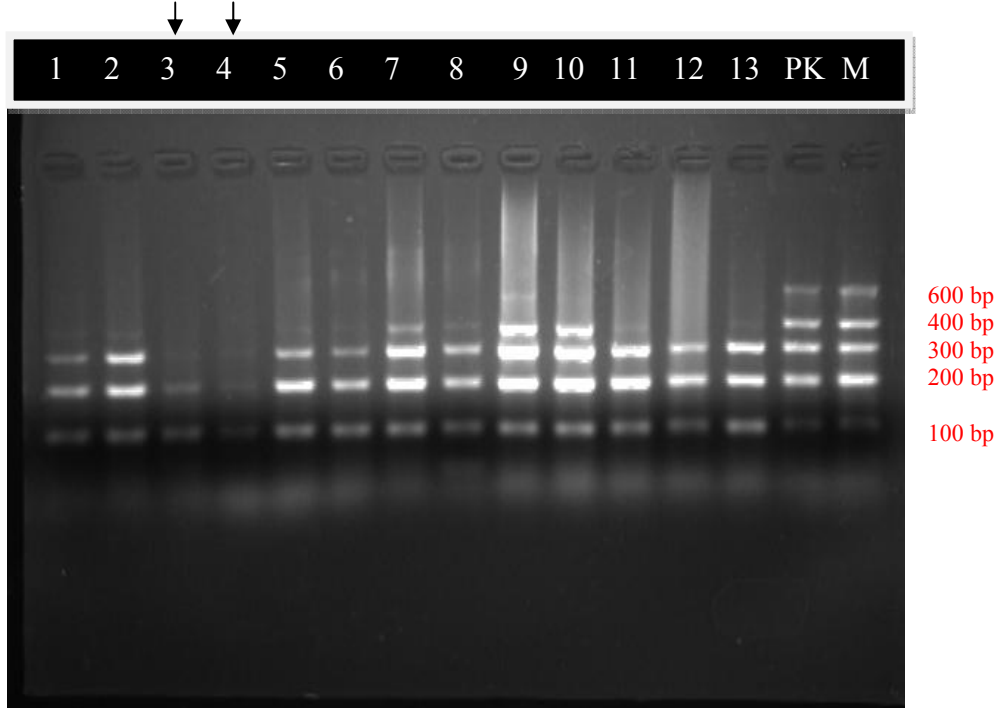


Şekil 3.1: DNA ekstraksiyonu sonrasında elde edilen DNA'lara ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Buna göre 300 bç'den daha uzun ampliconlar elde edilebilen örnekler mutasyon analizi için tercih edilmekle birlikte; çoğaltılmak istenen bölgenin uzunluğu dikkate alınarak zaman zaman 200 bç'lik amplicon veren örnekler ile de çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Çizelge3.2: SL PZR'de kullanılan primerler ve elde edilmesi beklenen amplicon uzunlukları

Gen	Amplicon uzunluğu	Primer Dizileri	PZR koşulları
AF4 Exon 3	600 bç	F: 5' GGAGCAGCATTCCATCCAGC 3' R: 3' AATACAGGCCGGGTACCTAC 5'	94°.....7' 94°.....45'' 60°.....45'' 72°.....45'' 72°.....10' 15°..... } 35 dögü
AF4 Exon 11	400 bç	F: 5' CCGCAGCAAGCAACGAACC 3' R: 3' CCTCGGCGGTCTCCTTTCG 5'	
PLZF Exon 1	300 bç	F: 5' TGCGATGTGGTCATCATGGTG 3' R: 3' CGGAGTCTGCTGTTACTGTGC 5'	
RAG 1 Exon 2	200 bç	F: 5' TGTTGACTCGATCCACCCCA 3' R: 3' AAGTCGGTTTGAACGTCGAGT5'	
TBXAS1 Exon 9	100 bç	F: 5' GCCCGACATTCTGCAAGTCC 3' R: 3' TTGGGAAGGGCCGTTGTGG 5'	



Şekil 3.2: Ekstraksiyonları yapılan DNA'ların, SL PZR yöntemiyle, PZR için uygun olup olmadıklarının kontrolü. Oklar ile işaretlenen kuyulara yüklü örneklerden sonuç elde edilemediği için çalışmanın bir sonraki basamağında kullanılmamışlardır (M: Marker, PK: Pozitif kontrol, Rakamlar yüklenen hastalara ait SL PZR ürünleri)

3.2.3 Hedeflenen KIT ve PDGFRA gen bölgelerinin PZR ile çoğaltılması

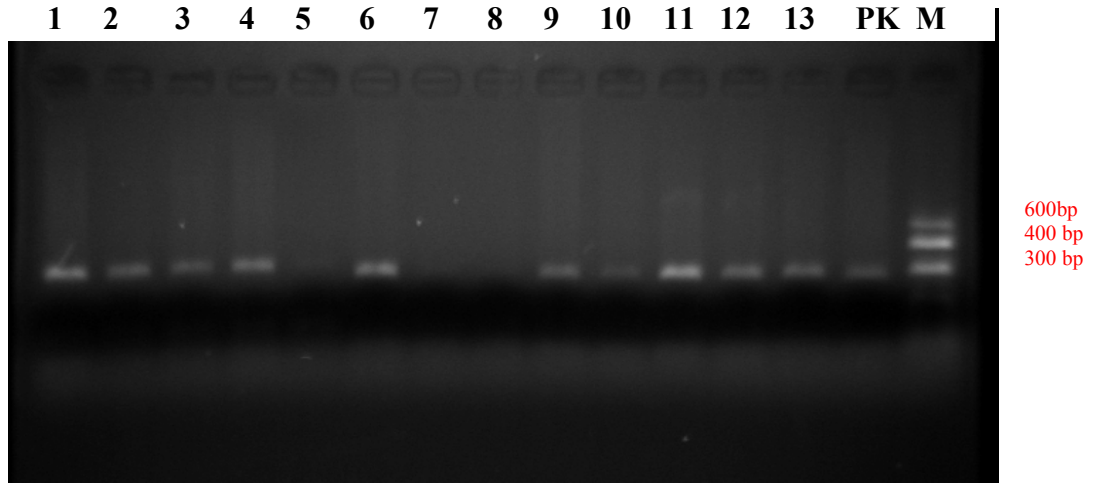
SL PZR sonrasındaki basamak, çalışılan tümör dokusundan elde edilen DNA'da mutasyon varlığı yönünden araştırılmak istenen gen bölgelerinin, KIT geninde 9, 11 ve 13 PDGFRA geninde ise 12, 14 ve 18. ekzonlar, PZR yoluyla çoğaltılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda her bir ekzon için kullanılan primerler çizelge 3.3'te sunulmuştur.

3.2.4 PZR ile çoğaltılan bölgelerin, DNA dizi analizlerinin yapılması ve sonrasında mutasyon varlığı yönünden incelenmeleri

Çalışmanın bu son basamağında PZR ile çoğaltılan ilgili gen bölgelerinin, direkt DNA dizi analizleri, RefGen laboratuvarlarında Applied Biosystems, Foster City, CA, US sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş; sonrasında ise elde edilen ham veriler (elektroferogramlar) çeşitli yazılımlar (Mega, Finch TV) aracılığıyla mutasyon varlığı yönünden incelenmiştir.

Çizelge 3.3: KIT ve PDGFRA genlerinin hedef bölgelerini çoğaltmada kullanılan primerler ve elde edilmesi beklenen amplicon uzunlukları.

Gen	Amplicon uzunluğu	Primer Dizileri	PZR Koşulları
KIT Exon 9	285 bç	F: 5' TTCCTAGAGTAAGCCAGGGCTTT 3'	94°.....5' 94°.....45'' 58°.....45'' 72°.....45'' 72°.....10' 4°..... } 40 döngü
		R: 5' GGATGTTTAGGCTCTGTCTACCA 3'	
KIT Exon 11	245 bç	F: 5' GTTCTCTCTCCAGAGTGCTCTAA 3'	
		R: 5' TCCATGTCACCTTTTTGGGT 3'	
KIT Exon 13	203 bç	F: 5' CATGCGCTTGACATCAGTTT 3'	
		R: 5' TGTCCAAGCTGCCTTTTATTG 3'	
PDGFRA Exon 12	212 bç	F: 5' CTCTGGTGCCTGGGACTTT 3'	
		R: 5' AGTTCCATGGGGTAACCTCC 3'	
PDGFRA Exon 14	185 bç	F: 5' GCTCAGCTGGACTGATATGTGA 3'	
		R: 5' TGGAGTGAGGATTTTCACTGG 3'	
PDGFRA Exon 18	195 bç	F: 5' GCTACAGATGGCTTGATCCTG 3'	
		R: 5' CCTCACTTCCCTCACTGGTC 3'	



Şekil 3.3: KIT geni 11. Ekzonunun PZR ile amplifikasyonu sonrasında gerçekleştirilen agaroz jel elektroforezi sonucu

Bu aşamada ilgili referans DNA dizisiyle kıyaslandığında, eksik dizi içeren örneklerde delesyon; referans dizide olmayıp örneğe ait DNA'da fazladan gözlenen dizi varlığında insersiyon; bu iki mutasyon tipinin bir arada gözlendiği (ve bu çalışmada gözlenmese de hem duplikasyon hem inversiyon ya da hem delesyon hem inversiyon içeren) örneklerde kompleks mutasyon olduğuna hükmedilmiştir. Yine referans diziden tek bir baz farkı gösteren, baz değişiminin gerçekleştiği vakalarda, nokta mutasyonu-polimorfizm ayrımı, 3 esas dikkate alınarak yapılır. Buna göre baz değişiminin gözlendiği kodonda, meydana gelen değişiklik amino asit değişikliği meydana getiriyor, yabancı (wild) alleldeki amino asitin yerini farklı biyokimyasal özelliklere sahip başka bir amino asit alıyor ise ve bu değişikliğin meydana geldiği kodonda, türler arasında korunmuş bir amino asit bulunuyorsa nokta mutasyonu; amino asit değişikliğine yol açmıyor ve popülasyondaki sıklığı % 1'den fazla ise polimorfizm olarak değerlendirilir. Ancak çalışmamızda popülasyon düzeyinde böyle bir araştırma yapma olanağı bulunamadığından söz konusu ayrım amino asit değişikliği ve amino asitlerin kimyasal özellikleri arasındaki benzerlik esasları dikkate alınarak yapılmıştır. Buna destek sağlayan diğer dayanak noktamız ise, saptadığımız yeni mutasyonun hasta popülasyonu içerisinde yalnızca tek bir vakada gözlenirken, polimorfizm olarak tanıladığımız değişimlerin, hasta popülasyonu içerisinde sıklığı %1'den büyük olacak şekilde karşımıza çıkması olmuştur.

3.2.5 İstatistiksel analizler

Bu çalışmadaki farklı parametrelere ait verilerin istatistiksel değerlendirilmesi için, 'ki kare testi' ve 'Fisher'in ki kare testi' yöntemleri kullanılırken; takip süresi ile ilgili analizlerde 'Mann Whitney U testi' ve 'Kruskal Wallis varyans analizi'nden faydalanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Çalışma grubunda yer alan 68 vakanın cinsiyet dağılımı incelendiğinde; vakaların % 58,8'inin erkek (n=40), %41,2'sinin (n=28) kadın olduğu belirlenmiştir. Bazı çalışmalarda GIST'lerin erkeklerde biraz daha yaygın olduğu bildirilmiş olmakla birlikte bu farkın önemsiz olduğu ifade edilmiştir. Bu konudaki yaygın görüş ise GIST'lerin dağılımlarının cinsiyet ile ilişkili olmadığı, kadın ve erkeklerde birbirine yakın oranlarda gözlemlendiği yönündedir (B.P. Rubin 2006, Corless and Heinrich 2008) . Çalışmamızda erkeklerin oranının daha yüksek olduğu görülmektedir.

Hastaların ortalama yaşı 58,65 (standart sapma 12,968) yaş dağılım aralığı 28 – 81 bulunmuştur. Saptanan bu ortalama değerin daha çok, B.P. Rubin'in (2006) yaklaşık 58 olarak ifade edilen değeriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir. Diğer bazı çalışmalarda ortalama yaş 63 olarak verilmiştir (Parfitt et al. 2006, Joensuu 2006).

Çizelge 4.1: Tümörlerin lokalizasyonlarına göre dağılımı

Tümör lokalizasyonu	Sıklık (n)	Görülme oranı (%)
Mide	33	45,5
İnce barsak	18	26,5
Kalın barsak	5	7,4
Omentum	12	17,6
Toplam	68	100

Elde edilen bu değerlerin, başka araştırmacıların (B.P. Rubin 2006) ifade ettiği rakamlarla (mide %50, ince barsak %25 ve kalın barsak %10) uyumlu olduğu; ancak omentum yerleşimli GIST'ler için serimizde gözlenen oranın (%17,6), omentum-periton gibi intestinal dışı bölgelerde yerleşim gösteren tümörler için literatürde belirtilen %10'luk görülme sıklığının üzerinde olduğu görülmüştür. Ortaya çıkan bu farklılık, omentum yerleşimli tümörlerin çoğunlukla yüksek risk grubu özellikleri taşımaları ve (Lasota and

Miettinen 2008) bu çalışmanın amacı doğrultusunda ağırlıklı olarak yüksek riskli hastaların seçilmesi etkenlerine atfedilmiştir.

Çizelge 4.2: Tümörlerin hücre tipine göre dağılımı

Tümörün hücre tipi	Sayısı (n)	Görülme oranı (%)
iğsi	42	61,8
Epiteloid	8	11,8
Mikst	18	26,5
Toplam	68	100

Gözlenen bu değerlerin, başka araştırmalarda (Joensuu 2006) ifade edilen iğsi (%70), epiteloid (%20) ve mikst veya pleomorfik (%10) oranlarından daha farklı olduğu, iğsi ve epiteloid hücre tipinde tümörlerin beklenenden daha az; ancak mikst hücre tipli tümörlerin daha sık olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçların da, lokalizasyon dağılımına benzer şekilde, seçilen hastaların risk grubu ile ilişkili olarak literatüre göre farklılık gösterdiği düşünülmüştür.

Tümörün hücresel morfolojisinin, tümörün yerleşim gösterdiği yere göre sıklık dağılımı incelendiğinde, çalışmamızda mide yerleşimli tümörlerin (n=33) %66,7'sinin (n=22) iğsi, %12,1'inin (n=4) epiteloid ve %21,2'sinin (n=7) mikst hücreli; ince barsak yerleşimli tümörlerin (n=18) %50'sinin (n=9) iğsi; %11,1'inin (n=2) epiteloid, %38,9'unun (n=7) ise mikst hücreli iken kalın barsak yerleşimli tümörlerin (n=5) tamamının iğsi hücreli olduğu gözlenmiştir. Omentum yerleşimli tümörlerin (n=12) ise %50'sinin (n=6) iğsi, %16,7'sinin (n=2) epiteloid ve %33,3'ünün (n=4) ise mikst hücreli tümörler oldukları anlaşılmıştır.

Buna karşılık başka çalışmalarda (örneğin Miettinen et al. 2005'te), mide yerleşimli GIST'lerde epiteloid ve mikst hücre tipinde tümörlerin daha yaygın gözlendiği bildirilmiştir. Çalışmada elde edilen sonucun Miettinen ve arkadaşlarının bildirdiğinden oldukça farklı olduğu (mide yerleşimli GIST'lerin %66,7'si iğsi, %12,1'i epiteloid ve %21,2'si mikst hücreli) gözlenmiştir. Ancak veri sayısının azlığı sebebiyle, istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (P=0,451). Miettinen et al.'ın çalışmasında

(2005) ise, GIST'lerin yerleşim yerleri ile tümörün hücre tipi arasında bir ilgi olduğu bildirilmiştir.

Çizelge 4.3: Tümörlerin lokalizasyonlarına göre tümörün hücre tipine ait sıklık dağılımı

Lokalizasyon	Tümörün hücresel morfolojisi			Toplam
	İgşi (%)	Epiteloid (%)	Mikst (%)	
Mide	22 (66,7)	4 (12,1)	7 (21,2)	33
İnce barsak	9 (50,0)	2 (11,1)	7 (38,9)	18
Kalın barsak	5 (100,0)	0	0	5
Omentum	6 (50,0)	2 (16,7)	4 (33,3)	12
Toplam	42 (61,8)	8 (11,8)	18 (26,5)	68

Çalışma kapsamındaki hastalar risk grubuna göre gruplandırıldığında, vakaların % 7,4'ünün (n=5) düşük, %20,6'sının (n=14) orta, %72,1'inin (n=49) ise yüksek riskli olduğu anlaşılmıştır.

Ayrıca yine çalışma kapsamındaki tümörlerin (n=66) %92,4'ünün (n=61) primer, % 7,6'sının (n=5) nüks olduğu belirlenmiştir. 2 vakaya ait veriye ise ulaşılamamıştır.

Çizelge 4.4: Çalışmada kullanılan örneklerin risk grubu dağılımları

Risk Grubu	Sayı (n)	Görülme oranı (%)
Düşük	5	7,4
Orta	14	20,6
Yüksek	49	72,1
Toplam	68	100

Hastaların tümör dokularının immünohistokimyasal olarak CD117 ile pozitif boyanma özelliği incelendiğinde vakaların, %7,4'ünde (n=5) boyanma gözlenmezken; %92,6'sında (n=63) ise pozitif boyanma görülmüştür. Bu değerlerin pek çok çalışmada (Seiichi and Hirota2006, B.P. Rubin 2006 ve diğerleri) ifade edilen değerlere (%95 pozitif, %5 negatif) oldukça yakın olduğu gözlenmiştir.

Tümörün yerleşim gösterdiği bölge intestinal (mide, ince barsak, kalın barsak) ve intestinal dışı (omentum) olarak gruplandırılıp, CD117 pozitifliği yönünden değerlendirildiğinde intestinal bölge yerleşimli GIST'lerin (n=56) %3,6'sında (n=2) CD117'nin immünohistokimyasal olarak negatif olduğu izlenmiştir. Olguların %96,4'ü (n=54) CD117 immünohistokimya reaksiyonu yönünden pozitifdir. İntestinal dışı GIST'lerin (n=12) %25'inde(n=3) CD117 negatif ve %75'inde (n=9) pozitif bulunmuştur. Bu şekilde intestinal yerleşimli tümörlerin intestinal dışı lokalizasyonlulara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde CD117 pozitifliği bulundurduğu belirlenmiştir (P= 0,035).

Çizelge 4.5: İntestinal ve intestinal dışı yerleşimli tümörlerde CD117 pozitifliği oranı

Tümörün yerleştiği bölge	CD117 pozitifliği (%)
İntestinal yerleşim	96,4
İntestinal dışı yerleşim	75

Tümörler mutasyon varlığı yönünden incelenmiş ve bunun sonucunda vakaların %22,1'inde (n=15) incelenen KIT (9,11 ve 13 numaralı ekzonlar) ve PDGFRA (12,14 ve 18 numaralı ekzonlar) genleri kapsamında herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır; %69,1'inde (n=47) KIT, %8,8'inde (n=6) ise PDGFRA geni mutasyonları saptanmıştır. İncelenen gen bölgelerine göre, mutasyon varlığı yönünden yabanıl (wild) tip'e ait oranın başka çalışmalarda (B.P. Rubin et al. 2007) ifade edilen oranlardan (%12-17) daha yüksek; her bir gende gözlenen mutasyon oranlarının ise pek çok çalışmada rapor edilen mutasyon oranı aralığında (KIT geni için %60-80, PDGFRA geni için %5-10) olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.6: Tümörlerin mutasyon profilleri yönünden incelenmesiyle elde edilen dağılım

Mutasyon profili	Mutasyonsuz	KIT geni mutasyonu	PDGFRA geni mutasyonu
Görülme sıklığı (%)	22,1	69,1	8,8

Aynı analiz ekzon düzeyinde yapıldığında ise hastaların %64,7'sinde (n=44) KIT geni 11'inci, %4,4'ünde (n=3) KIT geni dokuzuncu, %7,4'ünde (n=5) PDGFRA geni 18'inci, %1,5'inde (n=1) ise PDGFRA geninin 12. ekzonlarında mutasyon saptanmıştır. Mutasyonların saptandıkları ekzonlara göre dağılımlarının sıklık sıralaması, literatürde ifade edilene benzer şekilde gerçekleşmiştir. Her bir ekzon için elde edilen oranlar, farklı makalelerde (Rubin et al. 2007, Joensuu 2006) belirtilen yaklaşık oranlara (KIT geni 9. Ekzon %5-15; 11. Ekzon %60-70; PDGFRA geni 18. Ekzon %5, 12. Ekzon %1) yakın bulunmuştur. KIT geni 13 ve PDGFRA geni 14 no'lu ekzonlar, mutasyon varlığı yönünden araştırılmış ancak söz konusu ekzonlarda herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır.

Çizelge 4.7: Örneklerde saptanan mutasyonların ekzonlara göre dağılımı

Mutasyon dağılımı	Sayı (n)	Oran (%)
Mutasyon yok	15	22,1
KIT geni ekzon 11	44	64,7
KIT geni ekzon 9	3	4,4
PDGFRA geni ekzon 18	5	7,4
PDGFRA geni ekzon 12	1	1,5
Toplam	68	100

Çizelge 4.8: Tümör lokalizasyonuna göre mutasyon varlığı dağılımı

Tümör lokalizasyonu	Mutasyonsuz	KIT geni mutasyonu	PDGFRA geni mutasyonu
Mide	5	23	5
İ.barsak	6	12	0
K.barsak	1	4	0
Omentum	3	8	1
Toplam	15	47	6

Saptanan mutasyonların çeşitleri dikkate alındığında mutasyonların %38,2'sinin (n=26) delesyon, %26,5'inin (n=18) nokta mutasyonu, %8,8'inin (n=6) duplikasyon, %4,4'ünün (n=3) ise kompleks mutasyon tipinde olduğu belirlenmiştir. Saptanan mutasyonların tiplerinin gözlenme sıklıklarına göre sıralaması da başka araştırmacıların önceden bildirdiklerine paraleldir. Buna göre KIT geninde saptanan mutasyon tiplerinin en sık gözlenenden en az gözlenene doğru sıralaması: Delesyon (%51,1), nokta mutasyonu (%29,8), duplikasyon (%12,8) ve kompleks mutasyonlar (%6,4) şeklindedir. Lasota ve Miettinen de (2008) aynı sıklık sıralamasını bildirmişlerdir. PDGFRA geninde saptanan mutasyonların %33,3'ü (n=2) delesyon tipte iken, % 66,7'si (n=4) ise nokta mutasyondur. Böylelikle PDGFRA geni için gözlenen nokta mutasyonu, delesyon şeklindeki görülme sıklığı sıralaması da aynı makalede bildirilen verilerle uyumludur.

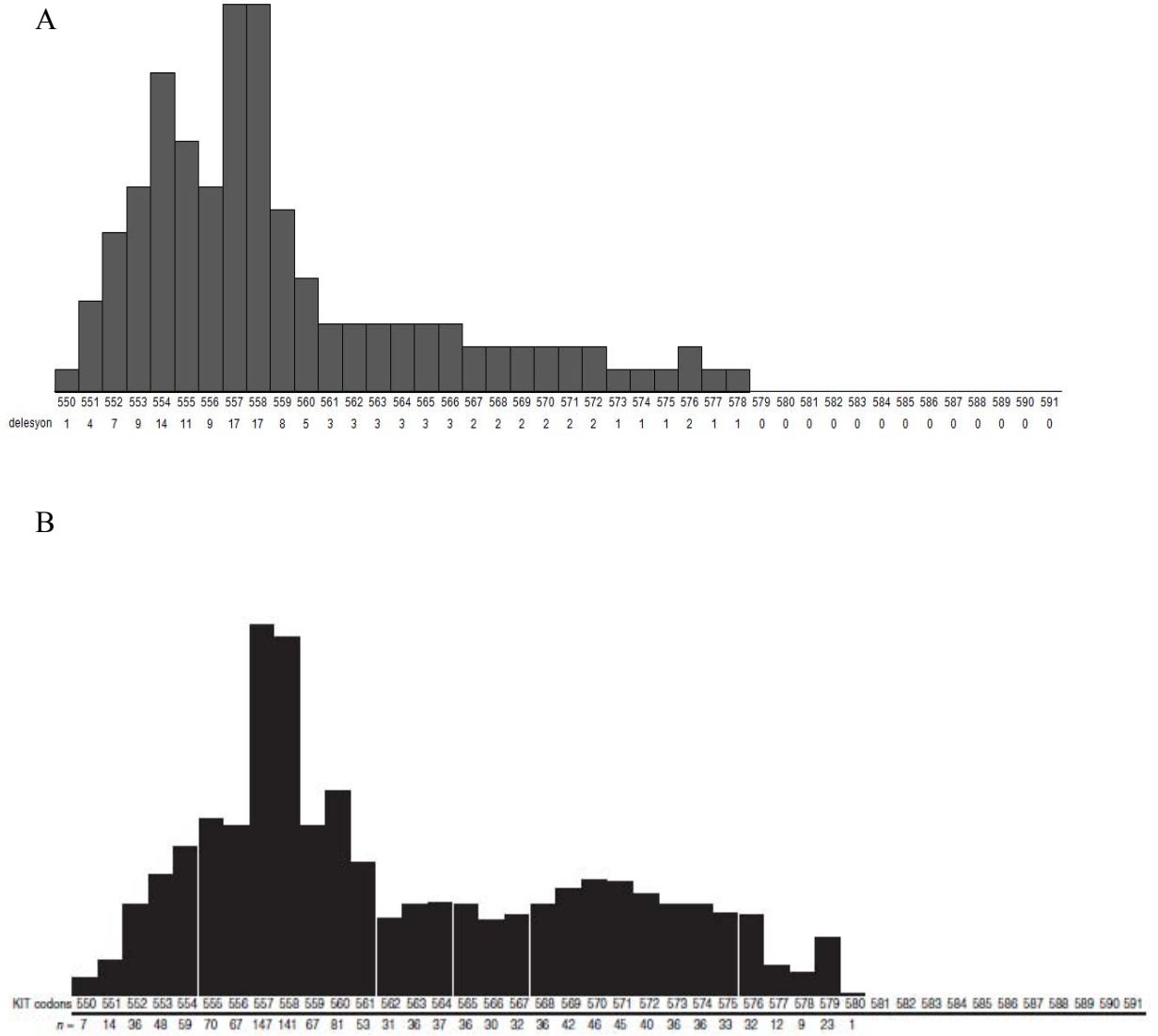
Çizelge 4.9: Saptanan mutasyonların, mutasyon çeşidine göre dağılımları

Saptanan mutasyonun tipi	Sayı	Oran (%)
Delesyon	26	49,0
Nokta mutasyonu	18	33,9
Duplikasyon	6	11,3
Kompleks mutasyon	3	5,6
Toplam	53	100

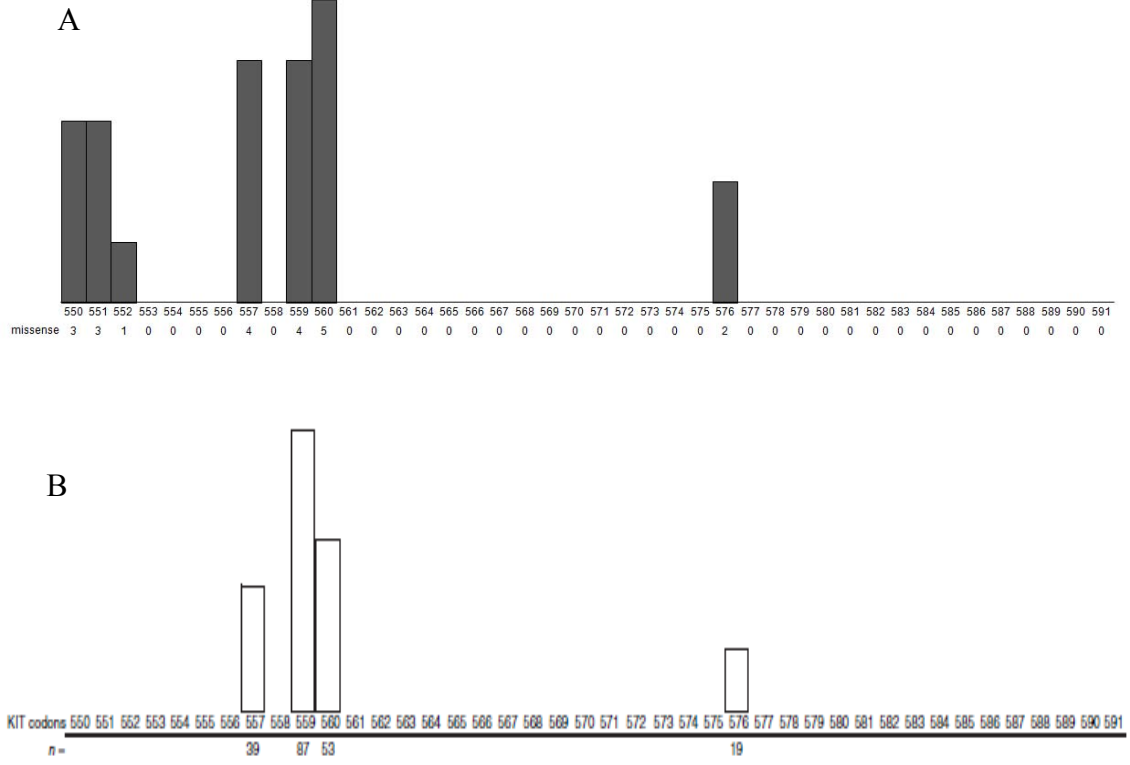
Çizelge 4.10: Her bir ekzonda saptanan mutasyonların, mutasyon tipine göre dağılımları

	Mutasyon Tipi				Toplam
	Delesyon (%)	Nokta mutasyonu (%)	Duplikasyon (%)	Kompleks mutasyon (%)	
KIT Ekzon 11	24 (54,5)	14 (31,8)	3 (6,8)	3 (6,8)	44
KIT Ekzon 9	0	0	3 (100,0)	0	3
PDGFRA Ekzon 18	2 (40)	3 (60)	0	0	5
PDGFRA Ekzon 12	0	1 (100)	0	0	1
Toplam	26 (38,2)	18 (26,5)	6 (8,8)	3 (4,4)	68

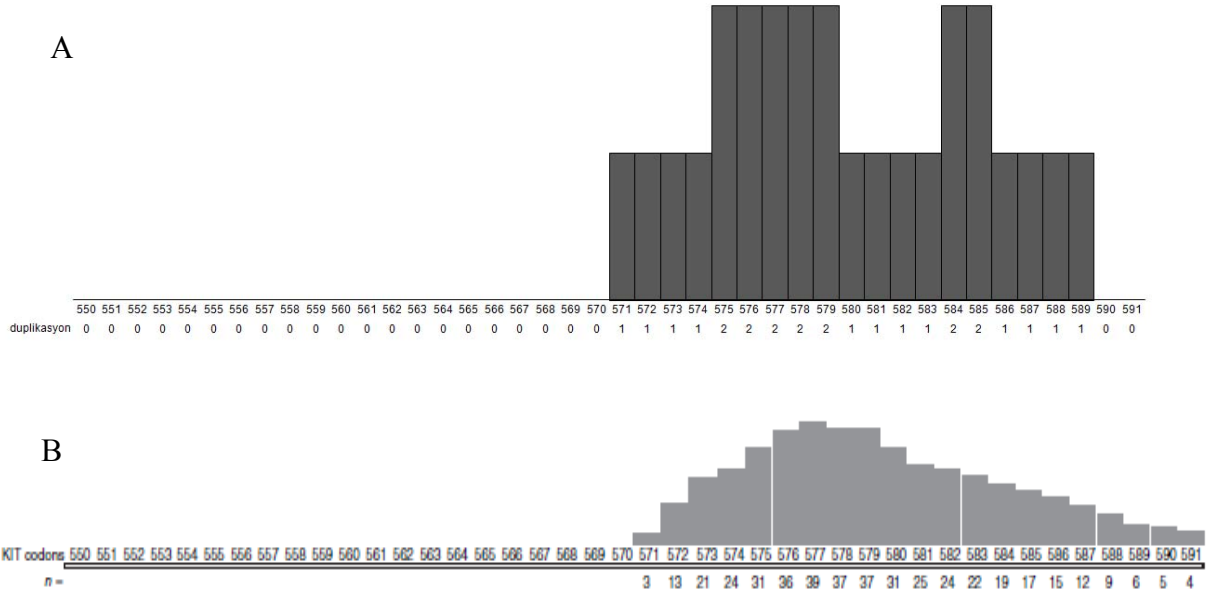
Saptanan mutasyonlardan KIT geni 11. Ekzona lokalize olanların (n=44) %54,5'i (n=24) delesyon, %31,8'i (n=14) nokta mutasyonu, %6,8'i (n=3) duplikasyon ve %6,8'i ise (n=3) kompleks mutasyonlardan oluşmuştur. Saptanan delesyonlar, ağırlıklı olarak ekzonun proksimal kısmını, ilk 10 amino asidini, etkilemektedir.



Şekil 4.1: Çalışmamızda KIT geni 11. ekzonunda gözlenen delesyonların kodonlara göre dağılımı ve sıklıklarının(A), Lasota ve Miettinen (2008)'in verileri (B) ile kıyaslanması. İki veri setinden elde edilen sonuçların genel olarak uyumlu olduğu izlenmektedir



Şekil 4.2: KIT geni 11. Ekzonda gözlenen yanlış anlamlı değişimlerin etkilediği kodonlar ve bu değişimlerin çalışmamıza ait gözlenme sıklıklarının (A), Lasota ve Miettinen (2008)'in sonuçlarıyla (B) karşılaştırılması. Çalışmamızda KIT geni mutasyonlarının gen üzerindeki dağılımı ile Lasota ve Miettinen'in çalışmalarındaki dağılımların birbirine benzer bölgelerde ve sıklıklarda olduğu izlenmiştir.



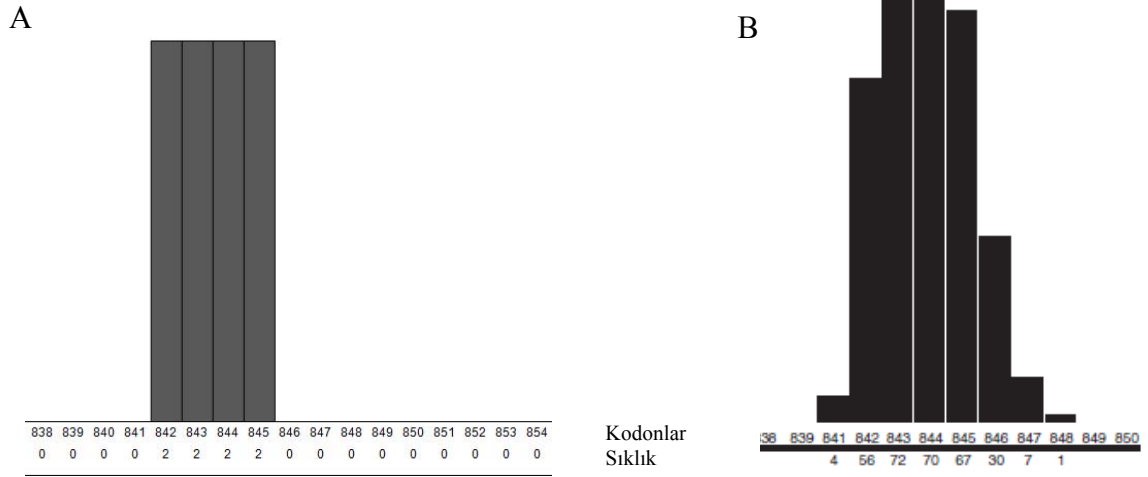
Şekil 4.3: KIT geni 11. ekzonunda, duplikasyonu gözlenen kodonlar ve gözlenme sıklıklarına ait çalışma verilerinin (A), Lasota ve Miettinen (2008)'in sonuçlarıyla (B) kıyaslanması. Duplikasyonlar ekzonun distal kısmında gerçekleşmektedir ve genel olarak Lasota ve Miettinen'in sonuçlarıyla uyumludur



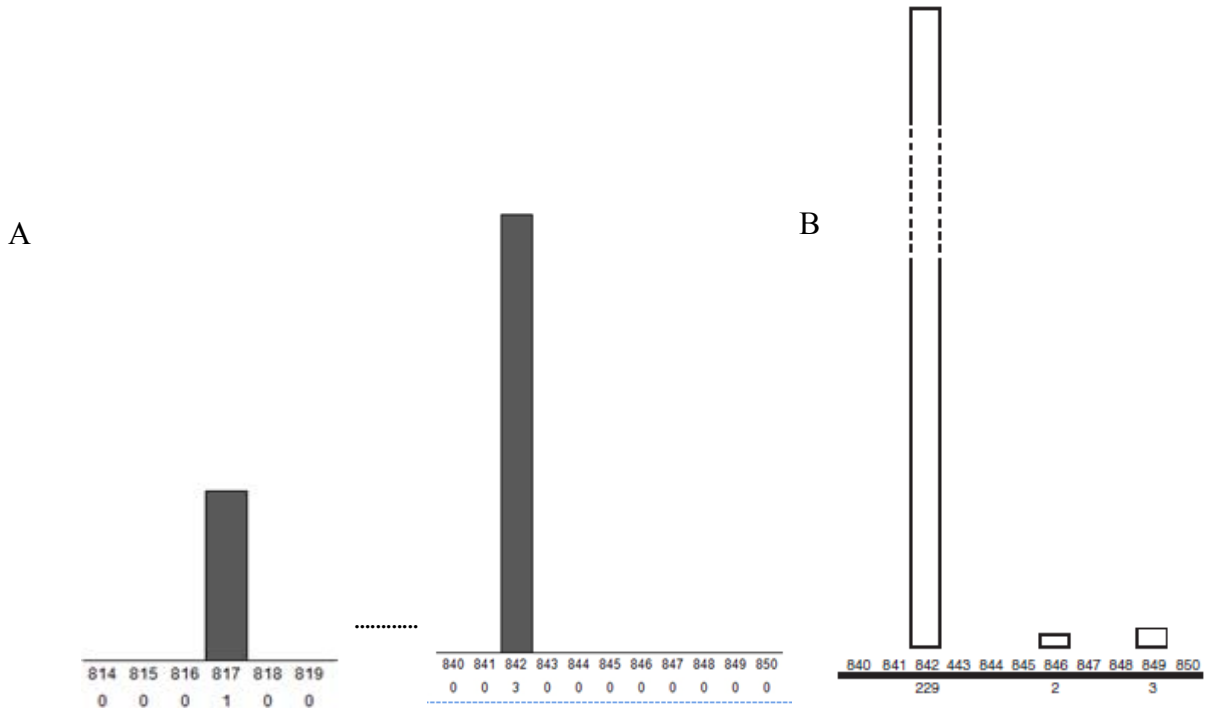
Şekil 4.4: KIT geni, 9. ekzonda duplikasyon gözlenen kodonlar ve gözlenme sıklığı

KIT geni 9. Ekzonunda lokalize olmuş mutasyonların tamamı (n=3) duplikasyon olarak gözlenmiştir.

PDGFRA geni 18. ekzonunda gözlenen mutasyonların %40'ı (n=2) delesyon, %60'ı (n=3) ise nokta mutasyonu şeklindedir. PDGFRA geninin 12. ekzonunda saptanan tek mutasyon vardır ve o da nokta mutasyonu (V561D) şeklindedir. Gözlenen mutasyon tiplerinin sıklık sıralaması, Lasota ve Miettinen (2008)'in sıralaması ile aynıdır.



Şekil 4.5: PDGFRA geni 18. ekzonunda delesyonun etkilediği kodonlar ve mutasyonun gözlenme sıklığının Lasota Miettinen (2008)'in sonuçlarıyla kıyaslanması



Şekil 4.6: PDGFRA geni 18. ekzonunda yanlış anlamlı değişimlerin etkilediği kodonlar ve gözlenme sıklıkları. Çalışmamızda elde edilen grafikte (A) sıralı noktalar, mutasyon saptanan iki nokta arasında kalan ve herhangi bir mutasyon saptanmayan kodonları ifade etmektedir. (B)'de ise referans olarak alınmış Lasota ve Miettinen(2008)'in verilerine ait grafik görünmektedir. Değişimlerin gözlemlendiği bölge ve değişimlerin en çok gerçekleştiği saptanan bölgeler, iki çalışmada da benzerdir.

Klinik takipleri bilinen hastaların (n=27) İmatinib kullanımı yönünden incelenmesinde %51,9'unun (n=14) İmatinib kullandığı anlaşılmıştır. 41 hastaya ait klinik verilere erişilememiştir.

Elde edilen verilere göre İmatinib kullanan hastaların (n=16) ilaca verdikleri yanıt: % 18,75 (n=3) nüks; % 6,25 (n=1) remisyon; % 18,75 (n=3) stabil hastalık; % 18,75 (n=3) kısmi yanıt ve % 37,5 (n=6) tam yanıt şeklinde saptanmıştır. Diğer 52 hastaya ait İmatinib kullanım ve ilaca yanıt bilgilerine ulaşılamamıştır

Çizelge 4.11: İmatinib'e verdikleri yanıtta göre hastaların dağılımı

İmatinib cevabı	Hasta Sayısı (n)	Oran (%)
Nüks	3	18,75
Remisyon	1	6,25
Stabil hastalık	3	18,75
Kısmi yanıt	3	18,75
Tam yanıt	6	37,5
Toplam	16	100

Hastaların durumları ile ilgili dağılıma bakıldığında, hastaların % 95,6'sının (n=65) opere; %4,4'ünün (n=3) ise nüks vakalar oldukları gözlenmiştir.

Hastaları takip süresi, 4 ay ile 108 ay arasında değişkenlik gösterirken; ortalama takip süresi ise 43,47 ay (standart sapma 27,856) olarak gerçekleşmiştir.

Hastaların son durumlarına ait veriler incelendiğinde dağılım, hastalık ile ölüm %23,5 (n=4), hastalıkla hayatta %41,2 (n=7), hastaliksız hayatta %35,3 (n=6) şeklinde gerçekleşmiştir. 51 hastanın son durumuna ait veri bulunmamaktadır.

Tümör lokalizasyonu ile İmatinib kullanımı verileri birlikte değerlendirildiğinde, mide yerleşimli tümörlerin (n=14) %64,3'ü (n=9), ince barsak yerleşimli tümörlerin (n=8)

%37,5'i (n=5) ve omentum yerleşimli tümörlerin (n=2) %50'si (n=1) İmatinib kullanmadığı; buna karşılık mide yerleşimli tümörlerin %35,7'si (n=5), ince barsak yerleşimli tümörlerin %62,5'i (n=5), kalın barsak yerleşimli tümörlerin (n=3) tamamı ve omentum yerleşimli tümörlerin %50'sinin ise (n=1) kullandığı belirlenmiştir. Yeterli veri bulunmadığından sağlıklı bir istatistiksel analiz gerçekleştirilememiştir (P=0,203).

Çizelge 4.12: İmatinib kullanımı bilgisi bulunan hastaların tümörün lokalizasyonuna göre dağılımı

Tümör lokalizasyonu	İmatinib kullanımı		Toplam
	Kullanmayan (%)	Kullanan (%)	
Mide	9 (64,3)	5 (35,7)	14 (100)
İnce barsak	3 (37,5)	5 (62,5)	8 (100,0)
Kalın Barsak	0	3 (100)	3 (100)
Omentum	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (100)
Toplam	13 (48,1)	14 (51,9)	27 (100)

Tümörlerin geliştiği lokalizasyonlarla mutasyonun görüldüğü genler incelendiğinde dağılımın çizelgede belirtildiği şekilde olduğu izlenmiştir. Veri eksikliği sebebiyle iki parametre arasında (Pearson ki kare analizi kullanılarak) güvenilir bir istatistiksel analiz yapılamamıştır (P=0,487).

Çizelge 4.13: Tümörün lokalizasyonuna göre mutasyon varlığı / mutasyon saptanan gen dağılımı

Tümör lokalizasyonu	Mutasyon varlığı / Mutant Gen			Toplam
	Mutasyonsuz (%)	KIT (%)	PDGFRA (%)	
Mide	5 (15,2)	23 (69,7)	5 (15,2)	33
İnce barsak	6 (33,3)	12 (66,7)	0	18
Kalın Barsak	1 (20,0)	4 (80)	0	5
Omentum	3 (25,0)	8 (66,7)	1 (8,3)	12
Toplam	15 (22,1)	47 (69,1)	6 (8,8)	68

Tümör durumu ile hücre tipi birlikte değerlendirildiğinde, iğsi hücre tipindeki tümörlerin (% 60,6; n=40) %97,5'i (n=39) primer; %2,5'i (n=1) nüks; epiteloid tipte tümörlerin (% 12,1; n=8) %75'inin (n=6) primer, %25'inin nüks (n=2); mikst tipte tümörlerin (%27,3; n=18) %88,9'unun (n=16) primer, %11,1'inin (n=2) nüks olduğu belirlenmiştir. Pearson ki kare analizinde elde edilen verilerin kullanılmasıyla (P=0,072) değeri bulunmuştur ancak veri eksikliği sebebiyle tümör durumu ile tümörün hücre tipi arasında güvenilir bir istatistiksel analiz yapmak veya iki parametre arasındaki korelasyona ilişkin yorumda bulunmak mümkün olamamıştır.

Çizelge 4.14: Tümörün hücre tipinin tümör durumuna göre dağılımı

Tümör durumu	Hücre Tipi			Toplam
	İğsi (%)	Epiteloid (%)	Mikst (%)	
Primer	39 (63,9)	6 (9,8)	16 (26,2)	61
Nüks	1 (20,0)	2 (40,0)	2 (40,0)	5
Toplam	40 (60,6)	8 (12,1)	18 (27,3)	66

Tümör durumu ve mutasyon durumu arasında bir ilişki sorgulandığında primer durumlu tümörlerin (n=61) %23'ünün (n=14) mutasyonsuz olduğu, %67,2'sinin KIT, %9,8'inin ise PDGFRA geninde mutasyon bulunduğu saptanmıştır. Nüks vakalar (n=5) için aynı dağılım yapıldığında %20'sinin mutasyonsuz iken, %80'inin KIT geninde mutasyon taşıdığı ancak nüks vakaların hiçbirinin PDGFRA mutasyonu taşımadıkları belirlenmiştir. Eldeki verilerle Pearson ki kare analizi yapılmıştır (P=0,0733) ancak verilerin yetersiz oluşu sebebiyle iki parametre arasındaki korelasyona dair güvenilir bir istatistiksel sonuç vermek mümkün görünmemektedir.

Çizelge: 4.15: Tümör durumuna göre mutasyon varlığı ve mutasyonun saptandığı gen dağılımı

Tümör durumu	Mutasyon varlığı / Mutant gen			Toplam
	Mutasyon yok (%)	KIT (%)	PDGFRA (%)	
Primer	14 (23,0)	41 (67,2)	6 (9,8)	61
Nüks	1 (20,0)	4 (80,0)	0	5
Toplam	15 (22,7)	45 (68,2)	6 (9,1)	66

Tümörün durumu ile hastanın son durum bilgileri birlikte ele alındığında, nüks olmayan (primer) tümör taşıyan hastaların (n=13) %23,1'i (n=3) kaybedilirken, %38,5'i (n=5) hastalıkla, kalan %38,5'i (n=5) ise hastaliksız hayattadır. Nüks vakaların (n=2) ise %50'sinin (n=1) kaybedildiği, diğer %50'sinin ise (n=1) hastalıkla hayatta olduğu anlaşılmıştır. Diğer bir değişle hastaliksız hayatta olanların tamamını primer durumlu tümörü olan hastalar oluşturmuştur. İki parametre arasında olası korelasyon, Pearson ki kare testi ile araştırılmıştır (P=0,523), ancak bu iki parametre arasında da anlamlı bir istatistiksel ilişki ortaya koymak, yetersiz veri sebebiyle, mümkün olamamaktadır. Ancak nüks tümörlerin genellikle daha agresif ve tedavilerinin daha zor olduğu pek çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir.

Çizelge 4.16: Tümör durumuna göre hastaların son durumlarının dağılımı

Tümör durumu	Hastanın son durumu			Toplam
	Kayıp (%)	Hastalıkla hayatta (%)	Hastaliksız hayatta (%)	
Primer	3 (23,1)	5 (38,5)	5 (38,5)	13
Nüks	1 (50,0)	1 (50,0)	0	2
Toplam	4 (26,7)	6 (40,0)	5 (33,3)	15

Hasta durumu ile mutasyon varlığı ve saptanan mutasyonların genlere dağılımı verileri birlikte değerlendirildiğinde, opere durumlu hastaların (n=65) %23,1'inin (n=15) mutasyonsuz olduğu; %67,7'sinin (n=44) KIT geninde, %9,2'sinin ise PDGFRA geninde mutasyon saptandığı anlaşılmıştır. Nüks durumlu hastaların (n=3) ise tamamında mutasyon saptanmıştır ve saptanan mutasyonların tamamı KIT geni üzerindedir. İki parametre arasındaki olası ilişki Pearson ki kare analizi ile araştırılmıştır (P=0,496) ancak yeterli veri bulunmaması sebebiyle bu konuya dair güvenilir bir yorum yapılamamıştır.

Çizelge 4.17: Mutasyon varlığı / mutant gen verilerinin hastalık durumuna göre dağılımı

Hastalık durumu	Mutasyon varlığı/Mutant gen			Toplam
	Mutasyonsuz (%)	KIT (%)	PDGFRA (%)	
Opere	15 (23,1)	44 (67,7)	6 (9,2)	65
Nüks	0	3 (100,0)	0	3
Toplam	15 (22,1)	47 (69,1)	6 (8,8)	68

Aynı analiz ekzon düzeyinde yapıldığında, opere durumlu hastaların (n=65) %63,1'inin (n=41) KIT geni 11. Ekzonunda, %4,6'sının (n=3) KIT geni 9. Ekzonunda, %7,7'sinde (n=5) PDGFRA geni 18. Ekzonunda ve son olarak %1,5'inde (n=1) PDGFRA geni 12. Ekzonunda mutasyon saptanmıştır. Nüks durumlu vakarların tamamının (n=3) KIT geni 11. Ekzonunda mutasyon taşıdıkları belirlenmiştir. Bu iki parametreye ait veriler kullanılarak Pearson ki kare analizi yapılmış (P=0,789) ancak yeterli sayıda veri bulunmadığından bu iki parametrenin birbiriyle ilişkili olup olmadığına yönelik sağlıklı bir yorum yapmak mümkün olmamıştır.

Çizelge 4.18: Mutasyon saptanan örneklerde mutasyonların hastalık durumuna göre ekzonlara dağılımı

Hastalık durumu	Mutasyon saptanan ekzon				Toplam
	11 (%)	9 (%)	18 (%)	12 (%)	
Opere	41 (63,1)	3 (4,6)	5 (7,7)	1 (1,5)	65
Nüks	3 (100,0)	0	0	0	3
Toplam	44 (64,7)	3 (4,4)	5 (7,4)	1 (1,5)	68

Hastalık durumu ile saptanan mutasyonların türü parametrelerinin birbirleriyle ilgileri istatistiksel olarak araştırıldığında, opere durumlu ve mutasyon saptanan hastaların (n=50) %50'sinde (n=25) delesyon; %34'ünde (n=17) nokta mutasyonu; %12'sinde (n=6) duplikasyon ve %4'ünde (n=2) kompleks tipte mutasyon saptanırken; nüks durumlu ve mutasyon saptanan hastaların (n=3), %33,3'ünün (n=1) delesyon; %33,3'ünün (n=1) nokta mutasyonu ve %33,3'ünün (n=1) kompleks tipte mutasyon taşıdıkları belirlenmiştir. Opere durumlu 15 hastada ise herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Pearson ki kare analizi

eldeki veri grubuna uygulanmış (P=0,136); ancak yeterli sayıda veri olmadığından iki parametre arasında ilgi olup olmadığına yönelik, güvenilir bir yorumda bulunmak mümkün olmamıştır.

Çizelge 4.19: Saptanan mutasyon tiplerinin hastalık durumuna göre dağılımı

Hastalık durumu	Mutasyon Tipi			Toplam	
	Delesyon (%)	Nokta mutasyon (%)	Duplikasyon (%)		
Opere	25 (50,0)	17 (34,0)	6 (12,0)	2 (4,0)	50
Nüks	1 (33,3)	1 (33,3)	0	1 (33,3)	3
Toplam	26 (49,0)	18 (33,9)	6 (11,3)	3 (5,6)	53

İmatinib kullanımının, mutasyon saptanan genlere göre dağılımına göre, İmatinib kullanan hastaların (n=14) tamamı KIT mutasyonu taşımaktadır. İki parametre arasındaki dağılım aşağıdaki Çizelgede verilen şekilde gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.20: Mutasyonların genlere göre gözlenme sıklığının İmatinib kullanımına göre dağılımı

İmatinib kullanımı	Mutasyon saptanan gen		Toplam
	KIT (%)	PDGFRA (%)	
Kullanmayan	12 (92,3)	1 (7,7)	13
Kullanan	14 (100,0)	0	14
Toplam	26 (96,3)	1 (3,7)	27

İmatinib kullanımının ekzonlara göre dağılımı incelendiğinde, imatinib kullanmayan 13 hastadan 11'inin (% 84,6'sının) KIT geni 11. ekzonunda; 1 hastanın (%7,7) KIT geni 9. ekzonunda, diğer 1 hastanın ise PDGFRA geni 18. ekzonunda mutasyon taşıdığı belirlenmiştir. İmatinib kullandığı bilinen hastaların (n=14) %92,8'inin (n=13) KIT geni 11. ekzonunda; %7,2'sinin (n=1) ise KIT geni 9. ekzonunda mutasyon saptanmıştır.

Çizelge 4.21: Mutasyon saptanan ekzonlarda mutasyonların gözlenme sıklıklarının İmatinib kullanım bilgisine göre dağılımı

İmatinib kullanımı	Mutasyon saptanan gen ve ekzon			Toplam
	KIT Ekzon 11 (%)	KIT Ekzon9(%)	PDGFRA Ekzon 18 (%)	
Kullanmayan	11 (84,6)	1 (7,7)	1 (7,7)	13
Kullanan	13 (92,8)	1 (7,2)	0	14
Toplam	24 (88,9)	2 (7,4)	1 (3,7)	27

İmatinib kullanım bilgisine göre saptanan mutasyonların tiplerinin dağılımları incelendiğinde, imatinib kullanmayanların (n=13) %61,5'inde (n=8) delesyon, %23,1'inde (n=3) nokta mutasyonu, ve %15,4'ünde (n=2) duplikasyon tipte mutasyonlar saptanırken; imatinib kullandığı bilinen hastaların (n=14) %64,2'sinin (n=9) delesyon, %21,4'ünün (n=3) nokta mutasyonu, %7,1'inin (n=1) duplikasyon, kalan % 7,1'inin ise kompleks mutasyon şeklinde dağılım gösterdiği izlenmiştir.

Çizelge: 4.22: Saptanan mutasyonun tiplerinin İmatinib kullanım bilgisine göre dağılımı

İmatinib kullanımı	Delesyon (%)	Mutasyon tipi			Toplam
		Nokta mutasyon (%)	Duplikasyon (%)	Kompleks mutasyon (%)	
Kullanmayan	8 (61,5)	3 (23,1)	2 (15,4)	0	13
Kullanan	9 (64,2)	3 (21,4)	1 (7,1)	1 (7,1)	14
Toplam	17 (63,0)	6 (22,2)	3 (11,1)	1 (3,7)	27

İmatinib cevabının mutasyon tipine göre dağılımında nüks cevabın (n=3), % 66,7'sinin (n=2) delesyon, % 33,3'ünün (n=1) nokta mutasyonu; remisyon cevabın (n=1) delesyon tipinde mutasyonu; stabil hastalık cevabın (n=3) % 33,3'ünün (n=1) delesyon, %66,7'sinin (n=2) nokta mutasyonu; kısmi yanıt cevabının (n=3) % 66,7'sinin (n=2) delesyon, % 33,3'ünün (n=1) kompleks mutasyon; tam yanıt cevabının ise % 83,3'ünün (n=5) delesyon, %16,7'sinin duplikasyon tipinde mutasyonlarla birlikte gözleendiği saptanmıştır.

Çizelge 4.23: Saptanan mutasyon tiplerinin, hastaların İmatinib'e yanıtına göre dağılımı

İmatinib cevabı	Mutasyon tipi				Toplam
	Delesyon (%)	Nokta mutasyon (%)	Duplikasyon (%)	Kompleks mutasyon (%)	
Nüks	2 (66,7)	1 (33,3)	0	0	3
Remisyon	1 (100,0)	0	0	0	1
Stabil hastalık	1 (33,3)	2 (66,7)	0	0	3
Kısmi yanıt	2 (66,7)	0	0	1 (33,3)	3
Tam yanıt	5 (83,5)	0	1 (16,7)	0	6
Toplam	11 (68,8)	3 (18,8)	1 (6,3)	1 (6,3)	16

CD117 ile boyanma sonucu negatif olan 5 hastaya ait tümörlerin % 60'ında (n=3) mutasyon saptanmazken, % 40'ında (n=2) PDGFRA mutasyonu saptanmıştır. CD117 negatif GIST'lerin hiçbirinde KIT geni mutasyonuna rastlanmamıştır. CD117 pozitif olan vakaların (n=63), % 19'unda (n=12) mutasyon saptanmazken, % 74,6'sında KIT geni mutasyonu, % 6,3'ünde ise PDGFRA mutasyonu saptanmıştır. CD117 ile negatif ancak PDGFRA mutasyonu saptanan 2 vakada da 18. ekzonda nokta mutasyonu saptanırken; CD117 pozitif hastaların %69,8'inde (n=44) KIT geni ekzon 11, % 4,8'inde (n=3) KIT geni ekzon 9, %1,6'sında ekzon 12 ve % 4,8'inde de ekzon 18 mutasyonu tespit edilmiştir. CD117 boyanma sonucu pozitif olan vakalarda saptanan mutasyonların % 41,3'ünün (n=26) delesyon, %25,4'ünün (n=16) nokta mutasyonu, % 9,5'inin (n=6) duplikasyon, %4,8'inin (n=3) kompleks tipte mutasyon olduğu anlaşılmıştır.

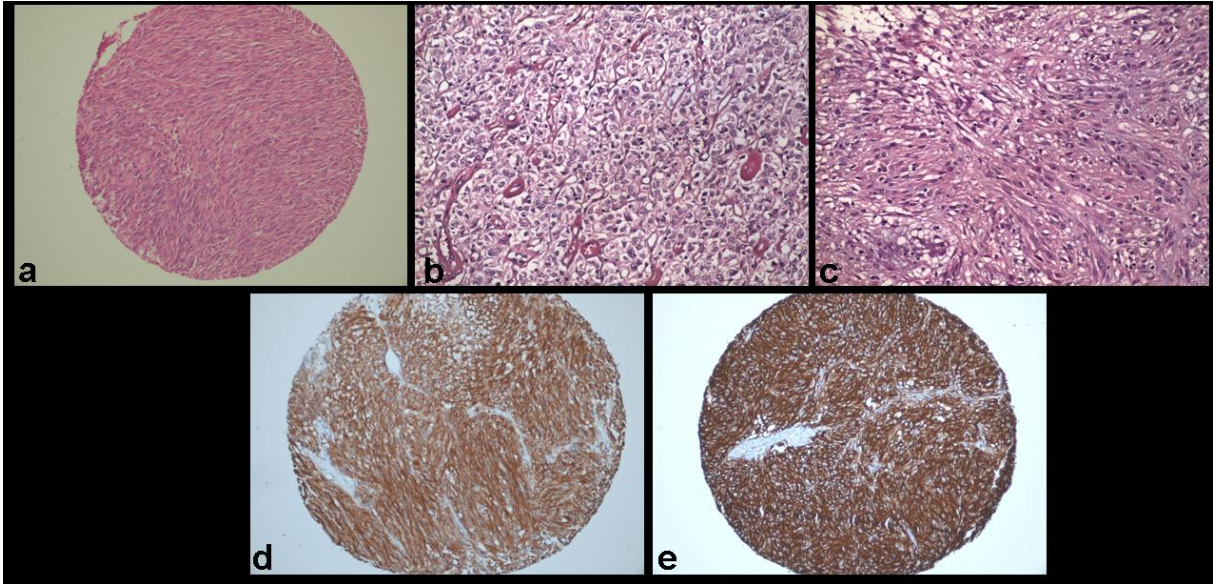
Çizelge 4.24: Mutasyon varlığı ve mutasyonun saptandığı genlerin, tümörün CD117 ile boyanma sonucuna göre sıklık dağılımı

CD117 ile boyanma	Mutasyon varlığı / Mutant gen			Toplam
	Mutasyon yok (%)	KIT (%)	PDGFRA (%)	
Boyanma yok	3 (60,0)	0	2 (40,0)	5
Boyanma var	12 (19,0)	47 (74,6)	4 (6,3)	63
Toplam	15 (22,1)	47 (69,1)	6 (8,8)	68

Risk grubuna göre hücre tipi dağılımı incelendiğinde düşük risk grubunda değerlendirilen vakaların (n=5) % 80'inin (n=4) iğsi, %20'sinin (n=1) epitelooid; orta risk grubundaki vakaların (n=14) %50'sinin (n=7) iğsi, %14,3'ünün epitelooid (n=2), %35,7'sinin (n=5) mikst; yüksek risk grubundaki vakaların (n=49) ise %63,3'ünün (n=31) iğsi, %10,2'sinin (n=5) epitelooid, % 26,5'inin (n=13) mikst tipte hücrelerden oluştuğu tespit edilmiştir. Yapılan Pearson ki kare istatistiksel analizinde (P=0,585), risk grubu ile tümörün hücre tipi arasında yetersiz veri sebebiyle, iki parametrenin birbirleriyle ilgisi konusunda güvenilir bir analiz yapılamamıştır.

Çizelge 4.25: Tümörü oluşturan hücre tipinin tümörün risk grubuna göre sıklık dağılımı

Risk grubu	Hücre tipi			Toplam
	İğsi (%)	Epitelooid (%)	Mikst (%)	
Düşük	4 (80,0)	1 (20,0)	0	5
Orta	7 (50,0)	2 (14,3)	5 (35,7)	14
Yüksek	31 (63,3)	5 (10,2)	13 (26,5)	49
Toplam	42 (61,8)	8 (11,8)	18 (26,5)	68



Şekil 4.7: İğsi, epitelooid ve mikst hücreli GIST (a-c) ile GIST'te CD117 ve CD34 ifadeleri (d,e)

Mutasyon varlığı ve mutasyonun lokalizasyonunun risk grubuna göre dağılımı şu şekilde gerçekleşmiştir: Düşük risk grubundaki hastaların (n=5), %20'sinde (n=1) mutasyon

saptanmazken, %60'ında ekzon 11 (n=3), %20'sinde (n=1) ekzon 9 mutasyonu saptanmıştır. Orta risk grubuna dâhil edilen 14 hastanın % 28,6'sında (n=4) mutasyon görülmezken, %57,1'inde (n=8) KIT geni ekzon 11 mutasyonu, % 14,3'ünde (n=2) ise PDGFRA geni ekzon 18 mutasyonları tespit edilmiştir. Yüksek risk grubunda incelenen 49 hastanın ise % 20,4'ünün (n=10) mutasyonsuz, %67,3'ünün (n=33) KIT geni ekzon 11, % 4,1'inde (n=2) KIT geni ekzon 9, %6,1' inin (n=3) ekzon 18, %2'sinin ise (n=1) ekzon 12 mutasyonu taşıdığı belirlenmiştir. Eldeki veriler ile Pearson ki kare analizi yapıldığında (P=0,682) risk grubu ile mutasyon varlığı ve lokalizasyonu arasında bir ilişki olup olmadığına dair güvenilir bir analiz yapmanın, eksik veri sebebiyle mümkün olamamıştır.

Çizelge 4.26: Mutasyon varlığı ve mutasyonların saptandıkları ekzonların, tümörün risk grubuna göre sıklıklarının dağılımı

Risk grubu	Mutasyonsuz (%)	Mutasyon saptanan ekzon				Toplam
		KIT Ekzon 11 (%)	KIT Ekzon 9 (%)	PDGFRA Ekzon 18 (%)	PDGFRA Ekzon12 (%)	
Düşük risk	1 (20,0)	3 (60,0)	1 (20,0)	0	0	5
Orta risk	4 (28,6)	8 (57,1)	0	2 (14,3)	0	14
Yüksek risk	10 (20,4)	33 (67,3)	2 (4,1)	3 (6,1)	1 (2,0)	49
Toplam	15 (22,1)	44 (64,7)	3 (4,4)	5 (7,4)	1 (1,5)	68

Mutasyon tipinin risk grubuna göre dağılımı incelendiğinde, düşük risk grubundaki vakaların (n=5) % 20'sinin (n=1) mutasyonsuz iken, % 20'sinin (n=1) nokta mutasyonu, % 60'ının (n=3) ise duplikasyon şeklinde mutasyon taşıdığı gözlenmiştir. Orta risk grubunda sınıflandırılan vakaların (n=14) %28,6'sı (n=4) mutasyonsuz iken, % 35,7'sinde (n=5) delesyon, ve diğer %35,7'lik (n=5) grupta ise nokta mutasyonu saptanmıştır. Yüksek risk grubuna dahil edilen vakalardan (n=49), % 20,4'ü (n=10) mutasyonsuz iken, %42,9'unun (n=21) delesyon, %24,5'inin (n=12) nokta mutasyonu, %6,1'inin (n=3) duplikasyon ve diğer %6,1'lik (n=3) kısımda da kompleks tipte mutasyon gözlemlendiği belirlenmiştir. Yeterli veri bulunmaması sebebiyle bu iki parametre arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin varlığına dair güvenilir bir analiz yapılamamıştır.

Çizelge 4.27: Saptanan mutasyon tiplerinin tümörün risk grubuna göre dağılımı

Risk grubu	Mutasyon tipi			Toplam	
	Delesyon (%)	Nokta Mutasyon (%)	Duplikasyon (%)		Kompleks Mutasyon (%)
Düşük risk	0	1 (25,0)	3 (75,0)	0	4
Orta risk	5 (50)	5 (50)	0	0	10
Yüksek risk	21 (53,8)	12 (30,7)	3 (7,6)	3 (7,6)	39
Toplam	26 (49,0)	18 (33,9)	6 (11,3)	3 (5,66)	53

Hücre tipine göre mutasyon varlığı ve mutasyonun gözleendiği ekzon dağılımı incelendiğinde, işsi hücre tipine sahip tümörlerde mutasyon varlığı yönünden incelenen 42 örneğin %19'unun (n=8) mutasyonsuz, %78,6'sının (n=33) KIT geni mutasyonu, %2,4'ünün ise (n=1) PDGFRA mutasyonu taşıdığı gözlenmiştir. Epiteloid tipte hücrelerden oluşan tümörlerin (n=8) % 37,5'inin (n=3) mutasyonsuz iken, % 50'sinin (n=4) KIT geni, %12,5'inin ise (n=1) PDGFRA geni mutasyonu taşıdıkları belirlenmiştir. Mikst hücre tipinde 18 vakadaki dağılım ise, % 22,2 (n=4) mutasyonsuz, % 55,6 (n=10) KIT geni mutasyonu taşıyan ve % 22,2 (n=4) PDGFRA geni mutasyonu taşıyan şekilde izlenmiştir. Hücre tipi ile mutasyon varlığı ve mutasyonun gözleendiği gen arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilginin varlığı, pearson ki kare testi ile araştırılmış ancak yetersiz veri sebebiyle sağlıklı bir analiz yapılamamıştır (P=0,083).

Çizelge 4.28: Hücre tipine göre mutasyon varlığı / mutasyonun saptandığı genlere ait sıklık dağılımı

Hücre tipi	Mutasyon varlığı / Mutant gen			Toplam
	Mutasyonsuz (%)	KIT (%)	PDGFRA (%)	
İşsi	8 (19,0)	33 (78,6)	1 (2,4)	42
Epiteloid	3 (37,5)	4 (50,0)	1 (12,5)	8
Mikst	4 (22,2)	10 (55,6)	4 (22,2)	18
Toplam	15 (22,1)	47 (69,1)	6 (8,8)	68

Mutasyonun lokalizasyonunun hücre tipine göre dağılımı incelendiğinde; İğsi hücreli tümörlerin (n=42) % 81'inde (n=34) mutasyon saptanmıştır. İğsi hücreli tümörlerin %73,8'i KIT geninde 11.ekzonda, %4,8'i (n=2) aynı genin 9. ekzonunda, %2,4'ü ise (n=1) PDGFRA geninin 18. ekzonunda mutasyon taşımaktadır. Epiteloid tipte hücrelerden oluşan tümörlerin (n=8) %62,5'inde (n=5) mutasyon saptanmıştır. Tümörlerin %50'sinde KIT geni 11. ekzonda mutasyon gözlenirken, %12,5'inde PDGFRA geni 18.ekzonda mutasyon gözlenmiştir. Mikst hücre tipli örneklerin (n=18) %22,2 sinde mutasyon saptanmazken, %50'sinde (n=9) KIT geni exon 11, %5,6'sında (n=1) exon 9, %16,7'sinde (n=3= PDGFRA geni exon 18 ve %5,6'sında (n=1) ise exon 12 mutasyonu saptanmıştır. Pearson ki kare testine göre (P=0,305) eldeki verilerin, iki parametre arasında varlığı araştırılan ilgiyle ilgili güvenilir bir sonuç alabilmek için yetersiz olduğu anlaşılmıştır.

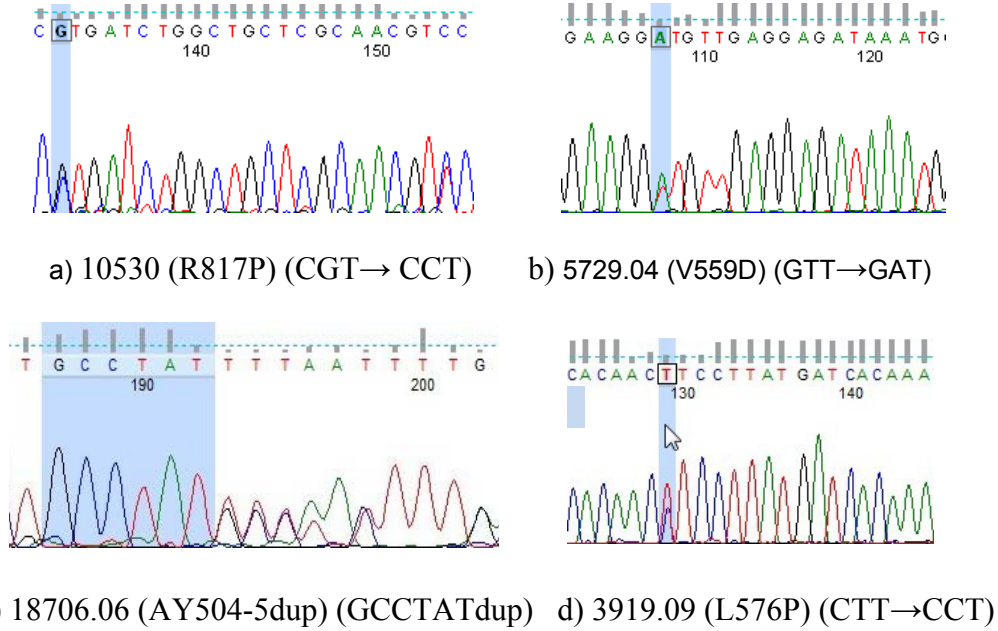
Çizelge 4.29: Mutasyon durumu ve mutasyonların saptandıkları ekzonların, tümörün hücre tipine göre sıklıklarının dağılımı

Hücre tipi	Mutasyonsuz (%)	Mutasyon saptanan ekzon				Toplam
		KIT Ekzon 11 (%)	KIT Ekzon 9 (%)	PDGFRA Ekzon 18 (%)	PDGFRA Ekzon 12 (%)	
İğsi	8 (19,0)	31 (73,8)	2 (4,8)	1 (2,4)	0	42
Epiteloid	3 (37,5)	4 (50,0)	0	1 (12,5)	0	8
Mikst	4 (22,2)	9 (50,0)	1 (5,6)	3 (16,7)	1 (5,6)	18
Toplam	15 (22,1)	44 (64,7)	3 (4,4)	5 (7,4)	1 (1,5)	68

Mutasyon tipi ile hücre tipi karşılaştırıldığında, incelenen İğsi hücre tipindeki tümörlerin (n=42) %38,1'inde (n=16) delesyon, %28,6'sında (n=12) nokta mutasyonu, %9,5'inde (n=4) duplikasyon ve %4,8'inde kompleks mutasyonlar saptanırken; örneklerin %19'unda herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır. Epiteloid tipte hücrelerden oluşan tümörlerin (n=8) % 25'inde (n=2) delesyon, %12,5'inde nokta mutasyonu (n=1), %12,5'inde (n=1) duplikasyon ve %12,5'inde (n=1) kompleks mutasyon saptanmış; %37,5'inde (n=3) herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Mikst fenotipli tümörlerin (n=18) % 44,4'ünde (n=8) delesyon saptanırken, %27,8'inde (n=5) nokta mutasyonu, %5,6'sında (n=1) duplikasyon tespit edilmiş; %22,2'sinde (n=4) ise mutasyon görülmemiştir.

Çizelge 4.30:Saptanan mutasyonların tiplerinin, tümörün hücre tipine göre sıklık dağılımı

Hücre tipi	Mutasyon tipi				Toplam
	Delesyon (%)	Nokta Mutasyon (%)	Duplikasyon (%)	Kompleks Mutasyon (%)	
İğsi	16 (47,0)	12 (35,2)	4 (11,7)	2 (5,8)	34
Epiteloid	2 (40,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	5
Mikst	8 (57,1)	5 (35,7)	1 (7,1)	0	14
Toplam	26 (49,0)	18 (33,9)	6 (11,3)	3 (5,6)	53



Şekil 4.8 Hastalara ait sekans analizi verilerini içeren elektroferogram örnekleri izlenmektedir **a)** PDGFRA geni 18. ekzonda R817P, **b)** KIT geni 11. ekzonda V559D, **c)** KIT geni 9. ekzonda AY504-5dup, **d)** KIT geni 11. ekzonda L576P

A) KP550-511L VE M552-W557del (delins)

550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561
Lys Pro Met Tyr Glu Val Gln Trp Lys Val Val Glu

A AA CCC ATG TAT GAA GTA CAG TGG AAG GTT GTT GAG (WT)

Ile Leu
ATT CTG AAG GTT GTT GAG

KIT-MT

B) 578-83YDHKWE dup

574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 (1)
T Q L P Y D H K W E F P R N R L S F G

574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 (2)
T Q L P Y D H K W E Y D H K W E F P R

C) 10.İntrondan başlayıp 11. Ekzonda devam eden mutasyon

	10. İtron	11. Ekzon
Yabanıl (Wild) tipTTTCCCTTTCTCCCCACAG	AAA CCC ATG TAT GAA GTA CAG TGG AAG
Mutant tipTTTCCCTTTCTCCCCACAG	AAA CCC ATG TAT GAA GTA CAG TGG AAG

Şekil 4.9: Çalışmamızda elde edilen diğer bazı mutasyonlara örnekler. A'da wild tip (WT)'teki amino asit dizilimi kodonlarla birlikte verilmektedir. Hemen altında yer alan mutant tip (MT)'te saptanan amino asit dizisi yer almaktadır. Wild tip üzerinde kırmızı ile işaretli kısım, mutant tipte silinen bazları; mutant tip üzerinde mavi ile işaretlenmiş bazlar ise diziye katılan (inserte olan) bazları ifade etmektedir. B'de 1 numaralı dizi wild, 2 numaralı dizi ise mutant tipe aittir. Mutant tipte duplikasyonun gerçekleştiği bölge ve duplike olan amino asitler çerçeve içinde gösterilmiştir. C'de ise 10. İntrondan başlayıp 11. Ekzonda da devam eden bir delesyon görülüyor. Mutant tipte aradan çıkan bazlar, kırmızı ile işaretlemiştir. Bu mutasyon tipinde 11. Ekzonda mutasyondan etkilenen son kodondan arta kalan 'AG', 10. İtronun silinen kısmı içerisinde yer alan 'AG' bazlarının yerine, yeni splice noktası olmaya adaydır

Aşağıda çizelge 4.31’de klinik verileri bilinen hastalarda (tamamı yüksek riskli ve tamamı KIT ifadesi yönünden pozitif) klinik durum ve mutasyon durumu ile ilgili dağılım incelendiğinde, tedavi yanıtı ile ilişkili klinik verileri bilinen hastaların tümü beklendiği üzere yüksek riskli olgulardır. Hasta sayısı az olduğundan anlamlı istatistik vermek mümkün değildir.

Çizelge 4.31: İmatinib kullanıp ilaç yanıtı bilinen hastaların patolojik ve klinik prognostik özellikleri ile mutasyon dağılımları

Örnek no	Yerleşim	Hücre tipi	Mutasyon tipi	İmatinib kullanımı / yanıt	Hastanın son durumu
1	Kolon	İğsi	E562D ve I563-L576 del	İmatinib altında nüks	24 ay takipli sonra takip dışı
2	İncebarsak	Epiteloid	557-8WKdel	5 ay İmatinib	24 ayda ex
3	İncebarsak	İğsi	557-8WKdel	2 yıl İmatinib	2 yıl takipli hayatta
4	Mide	İğsi	M552-V560del	İmatinib remisyon	Hayatta
5	İncebarsak	İğsi	W557C ve K558-V560del	İmatinib ile 24 ay stabil sonra nüks.800 mg a yanıt yok	Hastalıkla hayatta
6	Kolon	İğsi	A504-Y505ins	İmatinib 25 ay.	Tam remisyon
7	İncebarsak	İğsi	W557G	İmatinib 24 ay.3 yıl sonra nüks	Hayatta
8	Mide	İğsi	E554-D572del	İmatinib 4. ay dirençli	Exitus
9	Mide	İğsi	557-8WKdel	Parsiyel yanıt	Parsiyel yanıt ve hayatta
10	Mide	İğsi	P551-E554del	İmatinib 36 ay	Parsiyel yanıt ve hayatta
11	Omentum	Epiteloid	L576P	48 ay İmatinib 4.yıl direnç	Sunitinib ile stabil ve hayatta
12	İncebarsak	İğsi	KP550-511L ve M552-V555del	İmatinib süresi??	Parsiyel yanıt, hayatta
13	Mide	Mikst	V560-Y578del	İmatinib 24 ay	2007 sonrası takipsiz
14	Kolon	İğsi	L576P	İmatinib 6 ay yanıtızsız. Sunitinib alıyor	Hastalıkla hayatta

Tabloda hastalara ait klinik veriler, çizelge 2.6 ve 2.7’deki veriler referans alındığında, verilerin genel olarak beklenen klinik verilerle uyumlu olduğu (tümör lokalizasyonu,

mutasyon tipi, hücre tipi, imatinib'e yanıt şekli verilerinin bir arada değerlendirilmesi ile) gözlenmiştir. Ayrıca bazı araştırmacılar (Wardelmann et al. 2006) tarafından ifade edilen, imatinib tedavisinin uzunluğu ve tümörün nüks etme riski arasındaki ilişkiye dair uyumlu bulgular da tabloda (5,7 ve 11 no'lu hastalar) görülmektedir.

	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578
	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y	I	D	P	T	Q	L	P	Y
No																													
1	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	D	I	N	G	N	N	Y	V	Y	I	D	P	T	Q	L	P	Y
2	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y	I	D	P	T	Q	L	P	Y
3	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y	I	D	P	T	Q	L	P	Y
4	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y	I	D	P	T	Q	L	P	Y
5	K	P	M	Y	E	V	Q	C	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y	I	D	P	T	Q	L	P	Y
7	K	P	M	Y	E	V	Q	G	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y	I	D	P	T	Q	L	P	Y
8	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y	I	D	P	T	Q	L	P	Y
9	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y	I	D	P	T	Q	L	P	Y
10	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y	I	D	P	T	Q	L	P	Y
11	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y	I	D	P	T	Q	P	P	Y
12	I	L	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y	I	D	P	T	Q	L	P	Y
13	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y	I	D	P	T	Q	L	P	Y
14	K	P	M	Y	E	V	Q	W	K	V	V	E	E	I	N	G	N	N	Y	V	Y	I	D	P	T	Q	P	P	Y

Şekil 4.10: İmatinib kullanım bilgileri bilinen hastalarda saptanan mutasyonların, ekzon üzerinde etkilediği amino asitlerin şematik gösterimi. En üstteki kısımda yabancı tipe ait amino asitler ve kodon numaraları verilmiştir. Kırmızı ile işaretli amino asitler delesyona uğrayanları; mavi ile işaretli olanlar ise farklı amino asite dönüşümleri ifade etmektedir. 6. hastada KIT geni 9. ekzonunda mutasyon saptandığından bu tabloda yer verilmemiştir. Söz konusu 13 hastaya ait mutasyonların yer aldığı ekzon kısmı gösterilmiş ancak ekzonun son 13 amino asidinde mutasyon saptanmadığı için şekil üzerinde gösterilmemiştir

5. ÖNERİLER VE DÜŞÜNCELER

Çalışmada kullanılan vaka sayısı 68 olmakla birlikte, çalışmaya 104 parafin blok örneği ile başlanmıştır. Ancak tekrarlanan işlemlere rağmen sonuç alınamaması sebebiyle bazı örneklerin çalışma kapsamından çıkarılmak zorunda kalınmıştır.

Öncelikle, immünohistokimyasal bir çalışma olmayıp moleküler düzeyde gerçekleştirilen bir çalışma olduğundan, FTPG dokularla çalışmak bazı güçlükleri de beraberinde getirmiştir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda FTPG dokularla çalışılarak oldukça iyi sonuçlar elde edilmekle birlikte DNA veya RNA ekstraksiyonunun gerekli olduğu çalışmalarda degradasyon önemli bir sorun olmaktadır. Kalıp olarak kullanılan DNA'nın kısmen de olsa degrade nitelikte olması durumunda, PZR'den sonuç alınamayabilmektedir.

Degradasyon, dokunun tespit edilmesi amacıyla formalin çözeltisi içerisine bırakılmasıyla başlar. Çalışmada kullanılan DNA ekstraksiyon kitinin, işlem süreciyle ilgili yönergesinde de belirtildiği üzere, dokunun formalin çözeltisi içerisinde bekleme süresi uzadıkça; dokudan elde edilecek DNA veya RNA'dan moleküler düzeyde çalışma yapma olanağı da sınırlanmakta ya da ortadan kalkabilmektedir. Bu anlamda ifade edilen limit süre yaklaşık 14 saattir. 14 saatten daha uzun süre formalin içerisinde kalan doku örneğinden elde edilecek DNA örneğinin PZR'nda kullanılması halinde başarısız olunacağı ifade edilmektedir.

Bu durumun deney aşamasında yarattığı en büyük sıkıntı, DNA'yı degrade etmesinden farklı olarak, çalışma süresince ortaya çıkan sorunların kaynağının belirlenmesi aşamasında belirsizliğe sebep olmasıdır. Öyle ki, çalışmanın PZR aşamasında sonuç alınamayan, sorunun degradasyondan kaynaklandığı ama bundan emin olunamayan (ki emin olunamamasının sebebi, dokunun formol içerisinde ne kadar süreyle bekletildiğinin kayıt altında olmamasıdır) vakalarda, PZR ile ilgili hata gidermeye yönelik çabalar zaman, emek ve para kaybına sebep olmaktadır. Ayrıca sorunu aşmaya yönelik olarak aynı bloktan yeni bir ekstraksiyon denemesinde bulunmak da sorunun çözümü olamayabilmektedir. Bu

tür durumlarda degrade olmamış (veya olsa da çalışmada kullanılmaya engel teşkil etmeyecek düzeyde degradasyon içeren) DNA'nın elde edilememesi sebebi olarak, blok içerisindeki dokunun kesit alınan kısımlarına, formolün uzun süre etki etmesi düşünülmüştür. Buna göre, tümör dokusunun çözelti ile direkt temas halinde olan dış yüzeyi ile yüzeye yakın tabakalarında degradasyon seviyesinin, tümör dokusunun iç kısımlarına göre daha fazla olacağı söylenebilir. Bu durumun çalışma ile olan ilgisi, yapılan ilk ekstraksiyondan sonuç alınamadığında ortaya çıkmaktadır. Zira ikinci ekstraksiyonun gerçekleştirildiği halde sonuç alınamama sebebi açıkladığımız nedenden kaynaklanıyor olabilir. Ancak bu konuya ilişkin en sağlıklı değerlendirme dokulara göre, formaldehitin dokuya nüfuz etme özelliğinin sayısal düzeyde (dokunun büyüklüğü, fiziksel diğer özellikleri, boyutları, şekli ve içine konduğu fiksatif ortamındaki konumu ile ortamın sıcaklık ve basınç değişkenlerine göre) biyofizik bağlamında, çalışılması sonucunda elde edilecek sonuçlara göre yapılabilecektir ki bu konu, tez sahibinin bilgisine göre araştırılmayı bekleyen bir konudur.

Yaptığımız tüm bu açıklamaların önemi, patoloji arşivi oluşturulması aşamasında ortaya çıkmaktadır. Bu açıklamalara göre, formol çözeltisinde tespit edilmek istenen dokunun dış yüzeyine yakın kısımlarının immünohistokimya çalışmalarında kullanılmak üzere arşivlenmesi; dokunun daha iç kısımlarının ise moleküler nitelikteki çalışmalarda kullanılmak üzere ayrıca arşivlenip değerlendirilmesi fayda sağlayabilir.

Parafin dokudan gerçekleştirilen çalışmalarda, yukarıda belirttiğimiz sebeplerden dolayı, kullanılacak yöntemin optimizasyonunun güç olduğu bilinmektedir. Çalışmaların optimizasyonu için yapılması gereken ilk basamak, yukarıda da belirttiğimiz gibi, dokunun tespit edildiği aşamanın rastgele değil, belirlenmiş ilkelere göre yerine getirilmesidir. Optimizasyon amacına yönelik olarak yapılabilecek diğer bir uygulama ise; ekstraksiyon sonunda gerçekleştirilen elektroforez sonucunda, elde edilen bant veya sürüntülerin parlaklıklarının ve dağılım şekillerinin sayısal olarak anlamlandırılmaları ve bu verilerin nanodrop, PZR sonucu ile DNA eldesine kadar olan inkübasyon sürelerinin bir arada değerlendirilerek bunlar arasındaki ilginin araştırılması olabilir. Böyle bir çalışmada kullanılacak vaka sayısı arttıkça, eldeki değerlere ve elektroforez desenlerine göre gruplar

(veya bir albüm) oluşturulabilir ve kurulacak PZR'nin sonucuyla ilgili önceden bir tahminde bulunmaya olanak tanıyabilir.

Tüm bu sorunlara alternatif olarak düşünülebilecek diğer bir çözüm, formolde bekletmek yerine daha farklı tespit yöntemleri ile çalışmak benimsenebilir ki zaten hastanelerimizde geliştirilmesi gereken birimlerden biri de bu anlamda dokuların dondurularak tespit edildiği 'frozen' birimleridir. Bu çalışmamıza benzer diğer bazı çalışmaların dondurulmuş doku örnekleri ile gerçekleştirildiği gözlenmiştir.

Çalışmada DNA ekstraksiyonu sonrasında, DNA'nın amplifiye edilebilir olup olmadığı konusunda fikir edinebilmek için gerçekleştirilen SL PZR işleminde kullanılan DNA'ya ait seyreltme oranının ve kullanılan DNA miktarının, sonraki basamakta ilgilenilen gen bölgelerinin çoğaltılması sırasında aynen kullanımı da her zaman mümkün olamamaktadır.

Çalışma sırasında karşılaşılan güçlüklerden biri deneyin, degradasyon ile ilgili olarak, c-kit geninin 9. Ekzonunun çoğaltılmasındaki sorunlar olmuştur. 9. Ekzonda sürekli olarak böyle bir sorunun gözlenmesinden, degradasyon ve 9. Ekzona ait ampikon boyunun uzunluğunun sorumlu olduğu düşünülmüştür. Zira 9. Ekzona ait ampikon boyu 285 bç uzunluğundadır ve pek çok çalışmada 300 bç uzunluğundaki ampikonlar, FTPG dokulardan elde edilen DNA'ların kullanıldığı çalışmalar için, uzun veya limit uzunlukta ampikonlar olarak ifade edilmektedir. GIST konusu üzerinde çalışan ve kurdukları PZR'nda 9. Ekzonun çoğaltılmasıyla ilgili sorun yaşamadıklarını belirten başka bir grubun, bu bölge için kullandıkları primerleri ekzonun içinden başlayarak tasarlamaları ve bu şekilde ampikon boyunu 146 bç'ne düşürmüş olmaları, bu düşüncüyü destekler niteliktedir. Grubun kullandığı primerlerin, ekzon kısmına dâhil bölgeden tasarlanmasına rağmen, 9. Ekzonda tanımlanmış mutasyonları tespit edebilecek konumda olmasından dolayı; bu bölgede tanımlanmış mutasyonun tespiti konusunda bir sorun yaşanmamaktadır.

5.1 SONUÇ

GIST'ler, genel anlamda kansere olan bakış açılarının gelişmesine önemli katkılarda bulunmuştur ve bu tümör grubuyla ilgili bilinenlerin sürekli olarak artması ve elde edilen bulguların farklı merkezlerin verileriyle kıyaslanmasının; GIST'lerin olduğu kadar diğer tümör çeşitlerinin de teşhis ve tedavisinde, geçmişte olduğu gibi, önemli kazanımlar sağlayacağı düşünülmektedir.

Farklı merkezler tarafından aynı parametrelere ilişkin farklı sonuçların bulunması bir yanlılıktan çok hastalığın heterojen karakteristiklerinden ve hasta profilinden kaynaklanır görünmektedir. Bu anlamda en doğru bilgilere farklı popülasyonlardan alınacak çok sayıda ve çok çeşitli GIST örnekleri ile yapılacak çalışmalarla ulaşılabilecektir.

Hedefe yönelik ilaç tedavisi ile ilgili çalışmalar olanca hızla devam etmektedir. Keşfedilen ilaçlara cevabın, hastanın ilgili genlerinin mutasyon statüsü ile ilgisi olduğunun bilinmesi; söz konusu genlerdeki mutasyon araştırmalarının ve bu mutasyonların keşfedilen her bir ilaca verilen cevap ile ilgilerinin araştırılmasını gerekli kılmaktadır. Bugüne değin bu konuda yürütülen çalışmaların tamamı yurtdışında gerçekleştirilmiştir.

Bu bağlamda Türkiye'de farklı merkezlerden toplanan Gastrointestinal stromal tümör vakalarının, KIT ve PDGFRA gen mutasyonu varlığı bakımından incelenmesini kapsayan çalışmamız sonucunda; ülkemizdeki GIST vakalarının, gerek mutasyonların görülme sıklığı gerekse saptanan mutasyonların çeşidi bakımından, diğer toplumlara çok benzer olduğu gözlenmekle birlikte; PDGFRA geninin 18. ekzonunda daha önce tanımlanmamış R817P mutasyonu saptanmıştır.

Bu çalışma bundan sonra ülkemizde yapılacak çalışmalar için bir ön çalışma olarak kabul edilebilir. Hastaların klinik takiplerinin daha düzenli yapıldığı serilerde mutasyon profilleriyle ilaç yanıtı arasındaki ilişkinin yanı sıra, sonradan ortaya çıkan sekonder

mutasyonların daha önceki tümör dokularında küçük popülasyonlarda da olsa belli klonal gruplarda varlığının gösterilmesi yeni nesil sekanslama teknolojileri kullanılarak araştırılabilir.

REFERANSLAR

Allander S.V., Nupponen N.N. et al. (2001). Gastrointestinal stromal tumors with KIT mutations exhibit a remarkably homogeneous gene expression profile. *Cancer Res.* 61(24): 8624-8628.

Andersson J. et al. (2002). The complexity of kit gene mutations and chromosome rearrangements and their clinical correlation in gastrointestinal stromal (pacemaker cell) tumors. *Am. J. Pathol.* 160: 15-22

Antonescu C.R., Sommer G. et al. (2003). Association of KIT exon 9 mutations with non-gastric primary site and aggressive behavior: KIT mutation analysis and clinical correlates of 120 gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Cancer Res.* 9: 3329–3337.

Antonescu C.R., Besmer P. et al. (2005). Acquired resistance to Imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin. Cancer Res.* 11: 4182-4190.

Antonescu C.R., Viale A. et al. (2004). Gene expression in gastrointestinal stromal tumors is distinguished by KIT genotype and anatomic site. *Clin. Cancer Res.* 10: 3282–3290.

Antonescu C.R., Viale A. et al. (2004). Gene expression in gastrointestinal stromal tumors is distinguished by KIT genotype and anatomic site. *Clin. Cancer Res.* 10(10): 3282-3290.

Atkins M., Carole A. et al. (2006). Sunitinib maleate. *Nat. Rev. Drug Discov.* Vol:5, 279-280.

Bauer S., Hartmann J.T. et al. (2005). Resection of residual disease in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors responding to treatment with Imatinib. *Int. J. Cancer*, 117: 316-325.

Bauer S., Yu L.K. et al. (2006). Heat shock protein 90 inhibition in Imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Res.* 66: 9153-9161.

P. et al. (2004). Protein kinase C theta is high expressed in gastrointestinal stromal tumor but not in other mesenchymal neoplasias. *Clin. Cancer Res.* 10: 4089-4095.

Buchdunger E., Cioffi C.L., Law N., Stover D., Ohno-Jones S., Druker B.J., Lydon N.B. (2000). Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295(1): 139-145.

Chen L.L., Trent J.C. et al. (2004). A missense mutation in KIT kinase domain 1 correlates with Imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 64: 5913-5919.

Corless C.L., McGreevey L. et al. (2004). Kit gene deletions at the intron 10- exon 11 boundary in GI stromal tumors. *J. Mol. Diagn.* 6: 366–70.

Corless C.L. and Heinrich M.C. (2008). Molecular pathobiology of Gastrointestinal stromal sarcomas. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*3: 557-86.

Corless C.L., McGreevey L. et al. (2002). KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *Am. J. Pathol.* 160: 1567-1572.

Çevlik F. (2006). Gastrointestinal stromal tümörlerde histopatolojik, tanısal ve prognostik bulguların değerlendirilmesi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Uzmanlık tezi 83 syf.

Debiec-Rychter M. et al. (2001). Chromosomal aberrations in malignant gastrointestinal stromal tumors: correlation with c-KIT gene mutation. *Cancer Genet. Cytogen.* 128: 24-30.

Debiec-Rychter M., Cools J. et al. (2005). Mechanisms of resistance to Imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against Imatinib-resistant mutants. *Gastroenterology*, 128: 270–279

Debiec-Rychter M., Dumez H. et al. (2004). Use of c-kit/PDGFR α mutational analysis to predict the clinical response to Imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur. J. Cancer.* 40: 689–695

Debiec-Rychter M. et al. (2006). KIT mutations and dose selection for Imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours. *Eur. J. Cancer* 42: 1093-103

Fletcher C.D., Berman J. et al. (2002). Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum. Pathol.* 33: 459–465

Fletcher J.A., Rubin B.P. (2007). KIT mutations in GIST. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17(1): 3-7.

Fletcher J.A. et al. (2003) Mechanisms of resistance to Imatinib mesylate (IM) in advanced gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22: 3275-7.

Franquemont D.W. (1995). Differentiation and risk assessment of gastrointestinal stromal tumours. *Am. J. Clin. Pathol.* 103: 41–47.

Franquemont D.W. and Frierson H.F. (1992). Muscle differentiation and clinicopathologic features of gastrointestinal stromal tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 16: 947-954.

Goettsch W.G. et al. (2005). Incidence of gastrointestinal stromal tumors is underestimated: Results of a nation-wide study. *Eur. J. Cancer,* 41: 2868-2872.

Heinrich M.C. et al. (2002). Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic activations. *Hum. Pathol.* 33: 484-495.

Heinrich M.C., Corless C.L. et al. (2003). PDGFR α activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science,* 299: 708–710.

Heinrich M.C., Corless C.L. et al. (2003). Kinase mutations and Imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J. Clin. Oncol.* 21: 4342–4349.

Heinrich M.C., Corless C.L. et al. (2006). Molecular correlates of Imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J. Clin. Oncol.* 24: 4764-4774.

Hirota S., Isozaki K. et al. (1998). Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*, 279: 577–580.

Hirota S. (2001). Gastrointestinal stromal tumors: their origin and cause. *Int. J. Clin. Oncol.* 6(1): 1-5.

Hirota S., Nishida T. et al. (2001). Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. *J. Pathol.* 193: 505–510.

Hirota S., Ohashi A. et al. (2003). Gain-of-function mutations in platelet-derived growth factor receptor a gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology*, 125: 660–667.

Hirota S. and Isozaki K. (2006). Pathology of Gastrointestinal stromal Tumors. *Pathol. Int.* 56(1): 1-9.

Jang J.S. et al. (2004). The differential proteome profile of stomach cancer: identification of the biomarker candidates. *Oncol. Res.* 14: 491-99.

Joensuu H. (2006). Gastrointestinal stromal tumor(GIST). *Annals of Oncology* 17 (10): 280–286.

Joensuu H. and Kindblom L.G. (2004). Gastrointestinal stromal tumors- a review. *Acta Orthop. Scand. Suppl.* 75: 62-71

Kang D.Y., Park C.K. et al. (2007). Multiple gastrointestinal stromal tumors: Clinicopathologic and genetic analysis of 12 patients. *Am. J. Surg. Pathol.* 31(2): 224-32.

Kang H.J., Koh K.H. et al. (2006). Differentially expressed proteins in gastrointestinal stromal tumors with KIT and PDGFRA mutations. *Proteomics*, 6(4): 1151-7.

Kindblom L.G. et al. (1998). Gastrointestinal pacemaker cell tumor(GIPACT): Gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am. J. Pathol.* 152: 1259-1269.

Kinoshita K., Isozaki K., Hirota S. et al. (2003). C-KIT gene mutation at exon 17 or 13 is very rare in sporadic gastrointestinal stromal tumors. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18: 147-151.

Kitamura Y., Hirota S., Nishida T. (2001). A loss-of-function mutation of c-kit results in depletion of mast cells and interstitial cells of Cajal, while its gain-of-function mutation results in their oncogenesis. *Mutat Res.* 477(1-2): 165-71.

Kitayama H. et al. (1995). Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood* 85: 790-98.

Lasota J., Wozniak A. et al. (2000). Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. *Am. J. Pathol.* 157: 1091–1095.

Lasota J., Dansonka-Mieszkowska A. et al. (2004). A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab. Invest.* 84: 874–883.

Lasota J., Dansonka-Mieszkowska A. et al. (2003). Gastrointestinal stromal tumors with internal tandem duplications in 3' end of KIT juxtamembrane domain occur predominantly in stomach and generally seem to have a favorable course. *Mod. Pathol.* 16: 1257–1264.

Lasota J. and Miettinen M. (2008). Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology* 2008, 53, 245–266.

Longley B.J., Reguera M.J., Yongsheng M.A. (2001). Classes of c-KIT activating mutations: Proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk. Res.* 25: 571–576.

Lux M.L., Rubin B.P. et al. (2000). KIT extracellular and kinase mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am. J. Pathol.* 156: 791–795.

Maeda H. et al. (1992). Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development*, 116: 369-375.

Mahadevan D. et al. (2007). A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of Imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*, 26: 3909–3919.

Mahadevan D. et al. (2005). Mechanisms of Imatinib resistance in GIST and potential therapeutic interventions. AACR #507, 96th Annual Meeting April 16-20, 2005. Anaheim/Orange County, CA.

Mazur M.T. (1983) Gastric stromal tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 7: 507-519.

Merkelbach-Bruse S., Thal D., Büttner R., Wardelmann E. (2004). PDGFR and c kit mutated gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are characterized by distinctive histological and immunohistochemical features. *Histopathology*, 46: 166–175.

Miettinen M., El-Rifai W., H. L. Sobin L., Lasota J. (2002). Evaluation of malignancy and prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Hum. Pathol.* 33(5): 478-483.

Miettinen M. et al. (1995) Gastrointestinal stromal tumors: Value of CD34 antigen in their identification and separation from true leiomyomas and schwannomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 19: 207-216.

Miettinen M. et al. (2003). Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the deudenum: A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 167 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 27: 625-641.

Miettinen M., Sarlomo-Rikala M. et al. (1999). Gastrointestinal stromal tumors: Recent advances in understanding of their biology. *Hum. Pathol.* 30: 1213–1220.

Miettinen M., Sarlomo-Rikala M., Sobin L.H., Lasota J. (2000). Esophageal stromal tumors: A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 17 cases and comparison with esophageal leiomyomas and leiomyosarcomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 24: 211-222.

Miettinen M., Sobin L., Lasota J. (2005). Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long term follow up. *Am. J. Surg. Pathol.* 29: 52–68.

Miettinen M., Sobin L.H., Maklouf H., Lasota J. (2006). Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and ileum: A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 906 cases before Imatinib with long-term follow-up. *Am. J. Surg. Pathol.* 30: 477–489.

Miettinen M., Sobin L.H., Sarlomo-Rikala M. (2000). Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). *Mod. Pathol.* 13: 1134-1142.

Miettinen M., Lasota J. (2006). Gastrointestinal Stromal Tumors. Review on Morphology, Molecular Pathology, Prognosis, and Differential Diagnosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 130: 1466–1478.

Miettinen M., Lasota J. (2001). Gastrointestinal stromal tumours – definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch.* 438: 1–12.

Miettinen M., Wang Z.F., Lasota J. (2009). DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 33(9): 1401-1408.

Monihan J.M. et al. (1994). CD34 immunoexpression in stromal tumors of the gastrointestinal tract and in mesenteric fibromatoses. *Histopathology*, 25: 469-473.

Nakatani H. et al. (2005). STI571 (Glivec) inhibits the interaction between c-KIT and heat shock protein 90 of the gastrointestinal stromal tumor cell line, GIST-T1. *Cancer Sci.* 96:116-19.

Nilsson B.P. et al. (2005). Gastrointestinal stromal tumors: The incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preImatinib mesylate era. *Cancer*, 103: 821-829.

Nishida T., Hirota S. et al. (1998). Familial gastrointestinal stromal tumors with germline mutation of the KIT gene. *Nat. Genet.* 19: 323–324.

Parfitt J., Streutker C. et al. (2006). Gastrointestinal stromal tumors: A contemporary review. *Pathol. Res. Pract.* 202(12): 837-847.

Park J.K., Choi S.H., Lee S., Min K.O., Yun S.S., Jeon H.M. (2004). Malignant Gastrointestinal Stromal Tumor of the Gallbladder. *J. Korean. Med. Sci.* 19: 763-767.

Rubin B.P., Singer S. et al. (2001). KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 61: 8118-8121.

Rubin B., Heinrich M.C., Corless C.L. (2007). Gastrointestinal stromal tumors. *The Lancet*, 369(9574): 1731-1741.

Sabah M. et al. (2006). Altered expression of cell cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumors: Markers with potential prognostic implications. *Hum. Pathol.* 37(6): 648-655.

Sakurai S. et al. (1999). Embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain(SMemB/MHC-B) in gastrointestinal stromal tumor and interstitial cells of Cajal. *Am. J. Pathol.* 154: 23-28.

Wardelmann E., Thomas N. et al. (2005). Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumours caused by multiple KIT mutations. *Lancet Oncol.* 6: 249-251.

Wardelmann E., Losen I. et al. (2003). Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. *Int. J. Cancer*, 106: 887–895.

Wardelmann E., Merkelbach-Bruse S. et al. (2006). Polyclonal evolution of multiple secondary KIT mutations in gastrointestinal stromal tumors under treatment with imatinib mesylate. *Clin. Cancer Res.* 12: 1743–1749.

Wardelmann E., Büttner R. et al. (2007). Mutation analysis of gastrointestinal stromal tumors: Increasing significance for risk assesment and effective targeted therapy. *Virchows Arch.* 451(4): 743-749.

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: Salim SÜNER

DOĞUM YERİ: ANTAKYA / TÜRKİYE

DOĞUM TARİHİ: 19.06.1983

YABANCI DİLİ: İNGİLİZCE

E-mail: salimsuner@gmail.com

EĞİTİM DURUMU

2001-2007 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

1997-2000 Antakya Kurtuluş Lisesi

1994-1997 Fatih Sultan Mehmet Ortaokulu

KONGRELER

6. Ankara Biyoteknoloji Günleri, Ankara 2007

EKLER

Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Solüsyonlar ve İçerikleri

Agaroz Jel (%1)		Agaroz Jel (%2)		TBE 5X	
Agaroz	0,5 g	Agaroz	1,0 g	Tris-Base	54 g
TBE 1x	50 ml	TBE 1x	50 ml	Borik Asit	27,5 g
EtBr ₂	1,0 µl	EtBr ₂	1,0 µl	0,5M EDTA(pH 8.0)	20 ml
				ddH ₂ O	980 ml

Kimyasallar ve Reaktifler

10x PCR tamponu (Fermantas)
Agaroz (Peq Lab)
Borik Asit (Applichem)
dNTP (Fermantas)
DNA Pürifikasyon Kiti (QIAGEN Minikit)
EDTA (Applichem)
Etanol (MERCK, 1.00983)
Etidyum Bromür
Magnezyum Klorür (Fermantas)
Taq DNA Polimeraz (Fermantas)
Tris- Base (Amresco)

Cihazlar

Mikrodalga fırın (White westinghouse)
Soğutmalı Mikro santrifüj (Thermo Micromax RF)
Santrifüj (Beckmann&Coulter 367161)
Isıl Döngü Cihazı (Corbett GG1)
Kuru ısıtıcı blok (Wealtec Corp. HB-2 Taiwan)
Vorteks (Labnet)

Elektroforez tankı (Wealtec Corp. Elite 300)

Güç kaynağı (Wealtec Corp. Elite 300)

UV görüntüleme cihazı (Vilber Lourmatt, Fransa)