AKCİĞER KANSERİNDE KRAS VE p53 KO-MUTASYONUNA BAĞLI GELİŞEN ANTİ-PD-L1 DİRENCİNİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK MOLEKÜLER GEN BİYOBELİRTEÇLERİN BELİRLENMESİ

Oğuzhan AKGÜN

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Akciğer Kanserinde KRAS ve p53 Ko-Mutasyonuna Bağlı Gelişen anti-PD-L1 Direncinin Belirlenmesine Yönelik Moleküler Gen Biyobelirteçlerin Belirlenmesi

Oğuzhan AKGÜN
0000-0002-8410-1786

Prof. Dr. Ferda ARI
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2023
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

AKCİĞER KANSERİNDE KRAS VE p53 KO-MUTASYONUNA BAĞLI GELİŞEN ANTİ-PD-L1 DİRENCİNİN BELİRLENMESİNE YÖNELİK MOLEKÜLER GEN BİYOBELİRTEÇLERİN BELİRLENMESİ

Oğuzhan AKGÜN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ferda ARI

İmmünoterapi son yıllarda özellikle akciğer, melanom, baş boyun ve renal hücreli karsinom gibi birçok kanser tedavisine yeni bir umut ışığı olmuştur. İmmünoterapide sıklıkla İmmün kontrol noktası inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu alanda özellikle anti-PD-1/PD-L1 tedavileri giderek artmaktadır. Akciğer kanserlerinin büyük bir bölümünü oluşturan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) agresif bir fenotipe sahip olması nedeniyle anti-PD-1/PD-L1 tedavisi uygulanabilmektedir. PD-L1 inhibitörü olan atezolizumab 2020 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış olup halen kullanılmaktadır. İmmünoterapide en önemli sorunlardan biri hastalarda gözlenen ilaç direnci olmaktadır. Tedavi sırasında ortaya çıkan bu durumu öngörmeye yardımcı olacak prognostik ve prediktif biyobelirteçlerin belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaca yönelik tez çalışmasında KHDAK hastalarının alt gruplarındaki heterojen yapının ilaç yanıtını etkilemesi nedeniyle en sık rastlanan KRAS ve p53 ikili gen mutasyonlarına göre ilaç direnç mekanizması incelenmiştir. Tez çalışmasında yeni tanı konmuş 45 adenokarsinoma hastasından alınan biyopsi doku örnekleri KRAS ekzon-12, p53, EGFR mutasyonları ve ALK-ROS1 durumlarına göre sınıflandırma yapılmıştır. 3 boyutlu (3D) ex-vivo kültür ortamında büyütülen ve çoğalmaları sağlanan hücrelerle kan örneklerinden elde edilen periferik mononükleer kan hücreleri (PBMC) ko-kültür koşullarına tabi tutuldu. Anti-PD-L1 uygulaması sonrası yapılan bir dizi hücresel analizle tedavi yanıtı değerlendirilerek tüm hasta örnekleri tedavi yanıtlarına göre sınıflandırıldı. Bu sayede KRAS ekzon-12 mutasyonlarına eşlik eden p53 ko-mutasyonu taşıyan hastaların anti-PD-L1 tedavisine verdikleri yanıt profilleri değerlendirilmiştir. Ayrıca biyoinformatik analizlerle desteklenen veriler KHDAK hastalarının anti-PD-L1 tedavisine uygun olabileceği konusunda yol gösterici olacak ve yüksek bir maliyete sahip olan gereksiz tedavilerden kaçınılabilecektir. Bunun da birincil olarak önemli ölçüde hasta sağlığına, yaşam süresine ve kalitesine katkı sağlanırken, ikincil olarak toplum sağlığına sosyal ve ekonomik katkıları olacaktır.

Anahtar Kelimeler: İmmunoterapi, Akciğer kanseri, anti-PD-L1 direnci
2023, ix + 106 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

IDENTIFICATION OF MOLECULAR GENE BIOMARKERS FOR THE DETERMINATION OF ANTI-PD-L1 RESISTANCE DUE TO KRAS AND p53 CO-MUTATION IN LUNG CANCER

Oğuzhan AKGÜN

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ferda ARI

In recent years, immunotherapy has been a new ray of hope for the treatment of many cancers, especially lung, melanoma, head and neck and renal cell carcinoma. Immune checkpoint inhibitors are frequently used in immunotherapy. In this field, especially anti-PD-1/PD-L1 therapies are increasing. Non-small cell lung cancer (NSCLC), which constitutes the majority of lung cancers, has an aggressive phenotype and therefore anti-PD-1/PD-L1 therapy can be applied. The PD-L1 inhibitor atezolizumab was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) in 2020 and is still in use. One of the most important problems in immunotherapy is drug resistance observed in patients. There is a need to identify prognostic and predictive biomarkers to help predict this situation that occurs during treatment. In this thesis study, drug resistance mechanisms were analyzed according to the most common KRAS and p53 double gene mutations since the heterogeneous structure of NSCLC patients' subgroups affects drug response. Biopsy tissue samples from 45 newly diagnosed adenocarcinoma patients were classified according to KRAS exon-12, p53, EGFR mutations and ALK-ROS1 status. Peripheral mononuclear blood cells (PBMCs) obtained from blood samples were subjected to co-culture conditions with cells grown and proliferated in 3d ex-vivo culture medium. After anti-PD-L1 treatment, the treatment response was evaluated by a series of cellular analyses and all patient samples were classified according to their treatment response. In this way, the response profiles of patients carrying p53 co-mutation accompanying KRAS exon-12 mutations to anti-PD-L1 treatment were evaluated. In addition, data supported by bioinformatics analyses will provide guidance that NSCLC patients may be eligible for anti-PD-L1 treatment and unnecessary treatments with high costs can be avoided. This will contribute significantly to patient health, life expectancy and quality of life as a primary benefit, and social and economic benefits to public health as a secondary benefit.

Key words: Immunotherapy, Lung cancer, anti-PD-L1 resistance
2023, ix + 106 pages.

TEŞEKKÜR

Her şeyden önce, çalışmalarımda danışmanlığımı yapan lisans, yüksek lisans ve doktora sürecim boyunca bana rehberlik eden, bilimsel bir araştırmacı olarak büyümeme ve öğrenmeme izin veren her aşama ve her koşulda desteğini eksik etmeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Ferda Arı'ya,

Çalışmalarımda laboratuvar şartlarında gerekli düzenin sağlanmasında emeği geçen Bursa Uludağ Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvar (BUMKAL) üyelerine,

Tez çalışması boyunca hem deneysel hem de alanındaki bilgi birikimini benimle paylaşarak desteklerini eksik etmeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Barbaros Oral, Dr. Öğr. Üyesi Diğdem Yöyen Ermiş'e ve çalışma ekiplerine,

Tez çalışmama "221S423" nolu ARDEB projesi ile maddi proje desteği sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (Tübitak),

Her deney sonucumda benimle aynı heyecanı ve ilgiyi gösteren hem hayat arkadaşım hem laboratuvar arkadaşım olan sevgili eşim Halime Akgün'e,

Ömrümün her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyip hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak her zaman yanımda olup her türlü sıkışıklık ve yorgunluğuma koşan, bugüne gelmemde en büyük emeğin/sabrın sahibi annem Müzeyyen Akgün ve babam Zeynel Akgün'e,

En zor anlarda dahi desteklerini eksik etmeyen Levent Akgün ve İsmail Akgün'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezi, ailem ve doktora sürecimin en büyük motivasyon kaynağı canım oğlum Aybars'a ithaf ediyorum.

Oğuzhan Akgün
…/…/…….

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ ix
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 3
2.1. Akciğer Kanseri 3
2.2. Akciğer Kanseri Histopatolojisi 5
2.2.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) 5
2.2.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) 7
2.2.2.1. KHDAK Adenokarsinomları 8
2.2.2.2. Skuamöz Hücreli Karsinomlar (SCC) 9
2.3. KHDAK'inde Histolojik Belirteçler 11
2.3.1. TTF1 11
2.3.2. Napsin-A 11
2.3.3. p63 12
2.3.4. Sitokeratinler (CK) 12
2.4. KHDAK Genetik Özellikleri 13
2.4.1 EGFR 13
2.4.2 Kirsten sıçan sarkomu viral onkojen homologu (KRAS) 15
2.4.3. P53 18
2.5. KHDAK Tedavi Yaklaşımları 20
2.5.1. Kemoterapi 20
2.5.2. Hedefe Yönelik Tedaviler 21
2.5.2.1. EGFR Tirozin Kinaz İnhibitörleri (EGFR-TKİ) 22
2.5.2.2. KRAS İnhibitörleri 23
2.6. Kanser ve İmmunoterapi 25
2.6.1. Kanser-Bağışıklık Döngüsü 26
2.6.2. İmmun Kontrol Noktası İnhibitörleri 27
2.6.2.1. CTLA-4 27
2.6.2.2. PD-1/PD-L1 28
3. MATERYAL ve YÖNTEM 31
3.1. Materyal 31
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 31
3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler 32
3.1.3. Kullanılan Cihazlar 32
3.1.4. Kullanılan Kitler 33
3.2. Yöntem 33
3.2.1. Biyoinformatik Analizler 33
3.2.1.1. Anti PD-L1 Direncinden Sorumlu Yolak ve Genlerin Belirlenmesi 33
3.2.1.2. TCGA Veritabanından Hasta Gruplarının Seçilmesi 33
3.2.1.3. Diferansiyel Gen Ekspresyonu (DGE) 34
3.2.2. Hasta Örneklerinin Temini ve Karakterizasyonu 34
3.2.2.1. KHDAK Hastalarının Tanısı ve Biyopsi/Kan Örneklerinin Temini 34

3.2.2.2. Histopatolojik ve Mutasyon Durumuna Göre Sınıflandırma 35
3.2.2.3. Ekstraselüler PD-L1 İmmünfloresan Boyama 36
3.2.2.4. ALK, ROS1 Yeniden Düzenlemelerinin FİSH Yöntemiyle Analizi 36
3.3. Ex-Vivo Organoid Ko-Kültür 38
3.3.1. Biyopsi Örneklerinde Enzimatik Parçalama 38
3.3.2. Periferal Kandan Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu (PBMC) 40
3.3.3. Organoid Ex-Vivo Kültür 40
3.3.4. Organoid Primer KHDAK'i Hücrelerinin Ko-Kültür İçin Hazırlanması 42
3.3.5. Primer KHDAK'i Hücreleri ve T Hücre Ko-Kültürü 42
3.4. Hücresel Analizler 43
3.4.1. T-Hücre Aracılı Hücre Ölüm Analizi 44
3.4.2. T-Hücre Aracılı Apoptozis Analizi 44
3.4.3. T Hücre Proliferasyonlarının Değerlendirilmesi 45
3.4.4. Ko-kültürlerde IFN-γ düzeylerinin ölçülmesi 46
3.5. Tedavi Yanıtına Göre Sınıflandırma 46
4. BULGULAR 48
4.1. Biyoinformatik Analizler 48
4.1.1. Anti PD-L1 Direncinden Sorumlu Yolak ve Genler 48
4.1.2. TCGA Veritabanından Hasta Gruplarının Seçilmesi 49
4.1.3. Diferansiyel Gen Ekspresyonu (DGE) 50
4.2. Hasta Örneklerinin Temini ve Karakterizasyonu 53
4.2.1. KHDAK Hastalarının Tanısı ve Biyopsi/Kan Örneklerinin Temini 53
4.2.2. Histopatolojik ve Mutasyon Durumuna Göre Sınıflandırma 53
4.2.3. Ekstraselüler PD-L1 İmmünfloresan Boyama 57
4.2.4. ALK, ROS1 Yeniden Düzenlemelerinin FİSH Yöntemiyle Analizi 59
4.3. Ex-Vivo Organoid ve T-Hücre Ko-Kültürü 60
4.4. Hücresel Analizler 63
4.4.1. T-Hücre Aracılı Hücre Ölüm Analizi 63
4.4.2. T-Hücre Aracılı Apoptozis Analizi 64
4.4.3. T Hücre Proliferasyonlarının Değerlendirilmesi 69
4.4.4. Ko-Kültürlerde IFN-γ Düzeyleri 70
4.4.5. Tedavi Yanıtlarına Göre Sınıflandırma 71
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 73
KAYNAKLAR 78
ÖZGEÇMİŞ 105

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
mM	Milimolar
mL	Mililitre
nM	Nanomolar
µM	Mikromolar
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
w/v	Ağırlık/Hacim

Kısaltmalar	Açıklama
ALK	Anaplastik Lenfoma Kinaz
ADC	Adenokarsinoma
AIS	Adenokarsinoma İn-Sıtu
ALK	Anaplastik Lenfoma Kinaz
ASR	Age-Standardised Rates
ATP	Adenozin Trifosfat
CK	Sitokeratin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
FBS	Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum)
FITC	Fluoresin İzotiyosiyanat
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
kDa	Kilo Dalton
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KRAS	Kirsten Sıçan Sarkomu Viral Onkogen Homoloğu
LCC	Büyük Hücreli Karsinoma
LOH	Heterozigotluk Kaybı
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MIA	Minimal İnvaziv Karsinoma
MSI	Mikrosatellit İnstabilite
NE	Nöroendokrin
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)
PD-1	Programlanmış Hücre Ölümü 1
PD-L1	Programlanmış Ölüm-Ligandı 1

PD-L2	Programlanmış Ölüm-Ligandı 2
PIK3	Fosfatidil İnositol 3-Kinaz
RLU	Rölatif Işık Ünitesi
RNA	Ribonükleik Asit
ROS1	ROS proto-onkogen 1, reseptör tirozin kinaz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCC	Squamöz Hücreli Karsinoma
TTF1	Tiroid Transkripsiyon Faktörü-1
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ATP	Adenozin Trifosfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 1.	Erkek ve kadınlarda 2020 yılı yeni kanser vaka sayısı……..	3
Şekil 2.	Karsinojenez sırasında gerçekleşen değişikliklerin şeması……	4
Şekil 3.	KHAK'inde sınıflandırma…….	7
Şekil 4.	KRAS moleküler çalışma mekanizmasının şematik gösterimi…….	16
Şekil 5.	KRAS ekzon 2 mutasyonlarının animoasit değişimleri……...	17
Şekil 6.	Klinik kullanıma sahip TKİ'ler ve FDA onay tarihlerinin şematik gösterimi……...	23
Şekil 7.	Anti-PD1/PD-L1 immünoterapiye yanıtın temel mekanizmaları……..	30
Şekil 8.	ROS1 FİSH Sonuçlarının Değerlendirilmesi…….	38
Şekil 9.	Ko-kültür grupları……..	43
Şekil 10.	Hücresel analizlerin iş akış algoritması…….	44
Şekil 11.	Kaspaz-3/7 aktivitesinin luminometrik olarak ölçülmesi……..	45
Şekil 12.	Hücresel analizler sonucu elde edilen verilen işlenme algoritması……	47
Şekil 13.	TCGA veritabanından KHDAK vakalarının seçilim algoritması……..	49
Şekil 14.	$KRAS^{G12D}$ $p53^{MUT}$ ve $KRAS^{G12A}$ $p53^{MUT}$ gruplarda DGE analizi……..	50
Şekil 15.	$KRAS^{G12V}$ $p53^{MUT}$ ko-mutasyon taşıyan grupta DGE analiz sonuçları…..	51
Şekil 16.	$KRAS^{G12V}$ $p53^{MUT}$ hasta grubunda diferansiyel eksprese olan anti-PD-L1 direnciyle ilişkili genler ve yolaklar……..	51
Şekil 17.	$KRAS^{G12C}$ $p53^{MUT}$ ko-mutasyon taşıyan grupda DGE analizi sonuçları...	52
Şekil 18.	$KRAS^{G12C}$ $p53^{MUT}$ hasta grubunda diferansiyel eksprese olan anti-PD-L1 direnciyle ilişkili genler ve yolaklar……..	53
Şekil 19.	Hücre dışı PD-L1 immunfloresan boyama görüntüleri…….	58
Şekil 20.	PD-L1 immunositokimya analizleri sonucu yeşil sinyal yoğunluğu…….	59
Şekil 21.	ROS1 yeniden düzenlemelerin analizi için yapılan FISH boyamaları…..	60
Şekil 22.	3 Boyutlu Ex-Vivo kültür basamakları ve primer KHDAK hücrelerinin hazırlanması……...	61
Şekil 23.	Ko-kültür öncesi hücrelerin proliferasyon kapasitelerinin incelenmesi…	62
Şekil 24.	ATP hücre canlılık analiz sonuçlarının ısı haritası gösterimi……	64
Şekil 25.	$KRAS^{G12A}$ grubunun kaspaz aktivasyonu ve hücre canlılık analizleri…..	65
Şekil 26.	$KRAS^{G12D}$ grubunun kaspaz aktivasyonu ve hücre canlılık analizleri…..	66
Şekil 27.	$KRAS^{G12V}$ grubunun kaspaz aktivasyonu ve hücre canlılık analizleri…..	66
Şekil 28.	$KRAS^{G12C}$ grubunun kaspaz aktivasyonu ve hücre canlılık analizleri…..	67
Şekil 29.	$KRAS^{Diğer}$ ve p53 mutasyonuna bağlı kaspaz aktivasyonu ve hücre canlılık analizlerinin çizgi grafikleri……..	68
Şekil 30.	T hücre proliferasyon sonuçları…….	70
Şekil 31.	IFN-γ ELISA Sonuçları…….	71
Şekil 32.	Analizler sonucu elde verilerin korelasyon verileri ve hasta örneklerinin sınıflandırılması…….	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 1.	FISH analizleri için kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışları……..	37
Çizelge 2.	Doku parçalama solüsyonunun hazırlanması……..	39
Çizelge 3.	KHDAK adenokarsinom hücreleri büyüme besiyeri bileşenleri….	41
Çizelge 4.	Literatür taraması sonucu belirlenen hedef genler ve ilişkili yolakları……...	48
Çizelge 5.	Alınan örneklerin histopatolojik ve mutasyon durumları…….....	54
Çizelge 6.	Örneklere ait demografik ve klinik özellikler……..	56
Çizelge 7.	Hasta grupları…….	57

1. GİRİŞ

Hastanın kendi bağışıklık sistemini kullanarak gelişen kanser immünterapisi son yıllarda dünyada ve ülkemizde giderek artmaktadır. Prostat kanserinin tedavisinde 2010 yılında kullanılmaya başlanan hücre temelli "sipuleucel-T" tedavisi ve önce 2011 yılında anti-CTLA-4 ("cytotoxic T lymphocyte associated protein 4"), ardından 2014 yılında anti-PD-1 ("programmed cell death protein 1") ve anti-PD-L1 ("Programmed death-ligand 1") antikorları ile klinik kullanıma giren bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, immünoterapi sahasına büyük ivme kazandırmıştır (Farkona vd., 2016). Farklı immünoterapötik yaklaşımlar çeşitli kanser türlerine sahip birçok hastaya uygulanmak üzere geliştirilmektedir. Kanser immunoterapi yöntemlerinde iyi sonuç alınabilmesine rağmen tedavi öncesi anti-PD-1/PD-L1 terapisinden faydalanma olasılığı daha yüksek olan hastaları belirlemek için biyolojik belirteçlerin yeterli olmadığı görülmektedir. Bu nedenle immünoterapi için çözünür, hücresel ve genomik seviyelerde biyobelirteçlerin geliştirilmesine odaklanılmalıdır.

Global bir sağlık sorunu haline gelen akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %80'ini küçük hücreli dışı akciğer kanseri oluşturmaktadır. Bu grupta ise en sık rastlanılan KHDAK adenokarsinomalarıdır. Tanı sırasında, vakaların çoğunluğu zaten ilerlemiş hastalık geliştirmiştir ve 5 yıllık sağkalım %24 olup, medyan sağkalım tanıdan itibaren ortalama 18 ayı bulmaktadır (Knight vd., 2017). KHDAK adenokarsinomalarının agresif bir fenotipe sahip oldukları düşünülünce bağışıklık kontrol noktası proteinlerine ve bunların birlikte düzenleyicilerine yönelik yeni ilaçlar ve bu ilaçların önemli ölçüde onkolojik terapötik etkinliğe sahip olması tedavi açısından oldukça umut verici olmuştur. PD-L1'in (CD274) antikor inhibitörleri, KHDAK dahil olmak üzere büyüyen bir kanser listesi için ilk basamak terapötikler haline gelmiştir (Horn vd., 2018; West vd., 2019). Bu amaçla etkin bir PD-L1 inhibitörü olan "Atezolizumab" EGFR veya ALK genomik tümör sapmaları olmayan ve yüksek PD-L1 ekspresyonuna (≥%1) sahip metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanseri olan yetişkinler için birinci basamak tedavi olarak onaylanmıştır. Bazı hastalarda etkili yanıtlara rağmen, tedavi şartlarını taşıyan KHDAK hastalarının yaklaşık %36-55'i ya bağışıklık kontrol noktası monoterapilerine ya da kemoterapi kombinasyonlarına yanıt vermemektedir (Doroshow vd., 2019; Hanna vd., 2020). Son zamanlarda, KHDAK hastalarının alt gruplarındaki anahtar moleküler

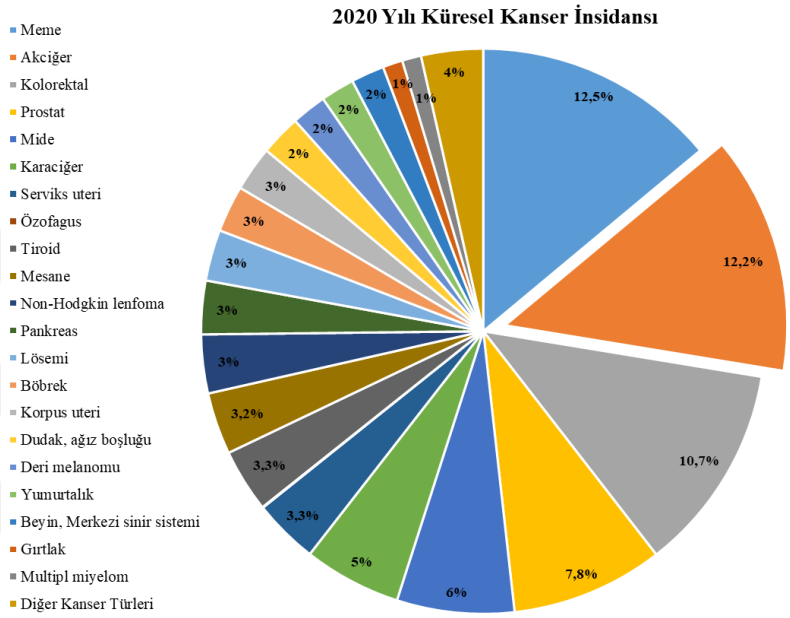
yolaklar ve mutasyon paternlerindeki değişikliklerin hem prognostik hem de prediktif önemi olduğu ve bu değişikliklerin heterojen ilaç yanıtına neden olabileceği gösterilmiştir. Bu noktada en dikkat çekeni KHDAK adenokarsinoma vakalarında oldukça sık rastlanan KRAS fonksiyon kazanımı mutasyonlarıdır. Çünkü yapılan klinik öncesi çalışmalar, KRAS G12C ve diğer alt tipler arasında belirgin sinyal ve ilaç duyarlılığı farklılıklarının bulunduğu ve bu değişimlerin tedavi yanıtı üzerine etkili olabileceği belirtilmiştir (Garassino vd., 2011; Ihle vd., 2012). Ayrıca KRAS'a eşlik eden ve en sık rastlanan mutasyon olan TP53 geninde, tüm kodlama bölgesi boyunca farklı mutasyonların gözlenmesi immun kontrol noktası inhibitörlerine karşı tedavi yanıtını etkilemektedir. KHDAK'da KRAS ve ona eşlik eden p53 mutasyonu varlığında, PD-1/PD-L1 inhibitörleri alan hastalarda tedavi cevaplarında geçerli prediktörlerinin oluşturulması için biyobelirteçlerin tanımlanması gerekmektedir (Clark, 2018). Ayrıca KRAS mutasyonunun alt tiplerine bağlı heterojen tedavi yanıtı bu biyobelirteçlerin önemini ortaya koymaktadır.

Tez çalışmasında ise KHDAK adenokarsinoma vakalarında en sık rastlanan mutasyonlardan KRAS ve p53 ko-mutasyonuna bağlı gelişen anti-PD-L1 direncinin KRAS ekzon 2 mutasyon tipleri arasındaki farklılıklarının ortaya konması ve genetik biyobelirteçlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri meme kanserinden sonra toplam yeni vaka açısından en sık tanı alan ikinci kanser türüdür. 2020 yılı verilerine göre toplam yeni vaka sayısının (18 094 716 yeni vaka) %12,2'sini (2 206 771 yeni vaka) akciğer kanseri oluşturmaktadır (Şekil 1).



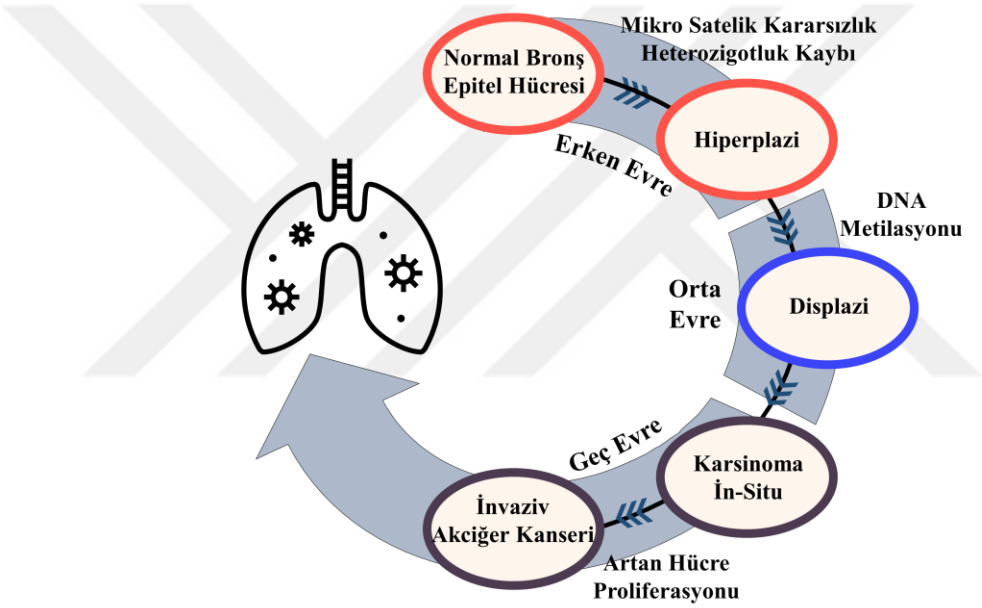
Şekil 1. Erkek ve kadınlarda 2020 yılı yeni kanser vaka sayısı. Dünya kanser araştırma vakfı 2020 yılı verilerinden düzenlenmiştir. World Cancer Research Fund (2020)

Dünya ülkeleri sıralamasında akciğer kanseri yeni vaka durumunda yaşa göre standardize edilmiş oranlar (ASR = Age-Standardised Rates) dikkate alındığında Türkiye 5. sırada yer almaktadır. Hatta ölüm oranı 35,9 (ASR/100 000) ile 4. sırada yer almaktadır.

Hastalık biyolojisinin genel olarak anlaşılmasındaki önemli gelişmeler, öngörücü biyobelirteçlerin uygulanması ve tedavideki iyileştirmeler, birçok hasta için kayda değer ilerleme ve olumlu sonuçlara yol açmıştır. Ayrıca, sigara içme oranlarını azaltmaya yönelik halk sağlığı önlemleri, akciğer kanseri insidansının azalmasına katkıda bulunmuş ve yüksek gelirli ülkelerde sağkalımı iyileştirmiştir (Ng vd., 2014; Siegel vd., 2020). Ancak, sigarayı bırakmaya yönelik halk sağlığı girişimlerinin geride kaldığı ve sağlık hizmetlerine erişimin kısıtlı olduğu düşük gelirli ülkelerde yeni akciğer kanseri tanıları artmaya devam etmektedir. Ayrıca, hiç sigara içmemiş kişilerde de akciğer kanseri teşhis edilmeye devam etmektedir (Giovino vd., 2012).

Akciğer kanserinin heterojen yapısı kanser oluşum sürecini oluşturan moleküler temellerden kaynaklanmaktadır. Moleküler temeller hücre çekirdeğinde kademeli olarak genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesiyle karakterize edilir. Bu değişiklikler, DNA yapısının zayıflamasına ve sonraki mutasyonlara karşı daha fazla duyarlı olmasına yol açar. Neoplastik bir süreç nedeniyle, hücreler artık bölünmelerini ve konumlarını kontrol eden mekanizmalara tabi değildir.

Karsinojenezin çok aşamalı modeli kademeli olarak biriken moleküler değişikliklerle ilişkilidir (Şekil 2). Erken, orta ve geç aşama olarak yapılan sınıflandırmada kademeli olarak akciğer kanseri oluşumu izlenebilmektedir (Wadowska vd., 2020).



Şekil 2. Basitleştirilmiş bir şekilde karsinojenez sırasında gerçekleşen değişikliklerin şeması.

Bronş epitelinde meydana gelen ilk moleküler değişiklik mikrosatellit değişikliklerdir. Mikro uydu değişiklikleri, küçük tekrarlayan DNA dizilerinin uzantıları veya silinmeleridir ve mikro uydu dengesizliği (MSI) veya normalde mevcut bir alelin yokluğu olan heterozigotluk kaybı (LOH) olarak görünür. Erken aşamadan sonra bir hücrenin kansere dönüşmesi için en az üç veya daha fazla değişikliğe ihtiyaç duyulurken, tümör ilerlemesi ve metastaz lezyonları ek DNA modifikasyonları ile tümör agresifliğini hızlandırır. Bu aşamada oluşan DNA metilasyonu karsinoma in-situ ve devam eden süreçte invaziv akciğer kanseriyle sonuçlanır.

2.2. Akciğer Kanseri Histopatolojisi

Akciğer kanseri, çok çeşitli klinikopatolojik özelliklere sahip heterojen bir hastalıktır. Akciğer kanseri genel olarak küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) (toplam tanıların %85'i) veya küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) (toplam tanıların %15'i) olarak sınıflandırılır. Dünya sağlık örgütü (WHO) 2021 sınıflandırması akciğer kanserlerinin tiplemeleri için büyük bir adım olmuştur. Bu sayede morfolojik özelliklerden ziyade biyobelirteç testine ve immünohistokimyaya dayanan bir sınıflandırma kabul görmüştür (Travis vd., 2015). Son yıllarda çeşitli tanı ve çok sayıda gelişmiş patolojik yöntemler, akciğer kanserlerinin daha doğru patolojik ve genetik sınıflandırmasını sağlamaktadır. Sonuç olarak iyileştirilmiş tedavi seçeneklerine olanak sağlanmıştır. Bu çerçevede akciğer kanseri için 2 ana alt gruptan bahsedebiliriz.

KHDAK'i ortalama beş akciğer kanseri vakasının dördünde teşhis edilir. Skuamöz hücreli karsinom (SCC), adenokarsinom (ADC) ve büyük hücreli karsinom (LCC) olarak alt tiplerde tanımlanmıştır (Herbst vd., 2018). Alt tiplerin birçok biyolojik özelliği paylaşmalarına rağmen köken aldıkları hücreler, akciğer içindeki yerleri ve büyüme paternleri bakımından farklılık gösterirler. Bu durumda farklı moleküler mekanizmalar yoluyla gelişen farklı hastalıklar olduğunu düşündürür.

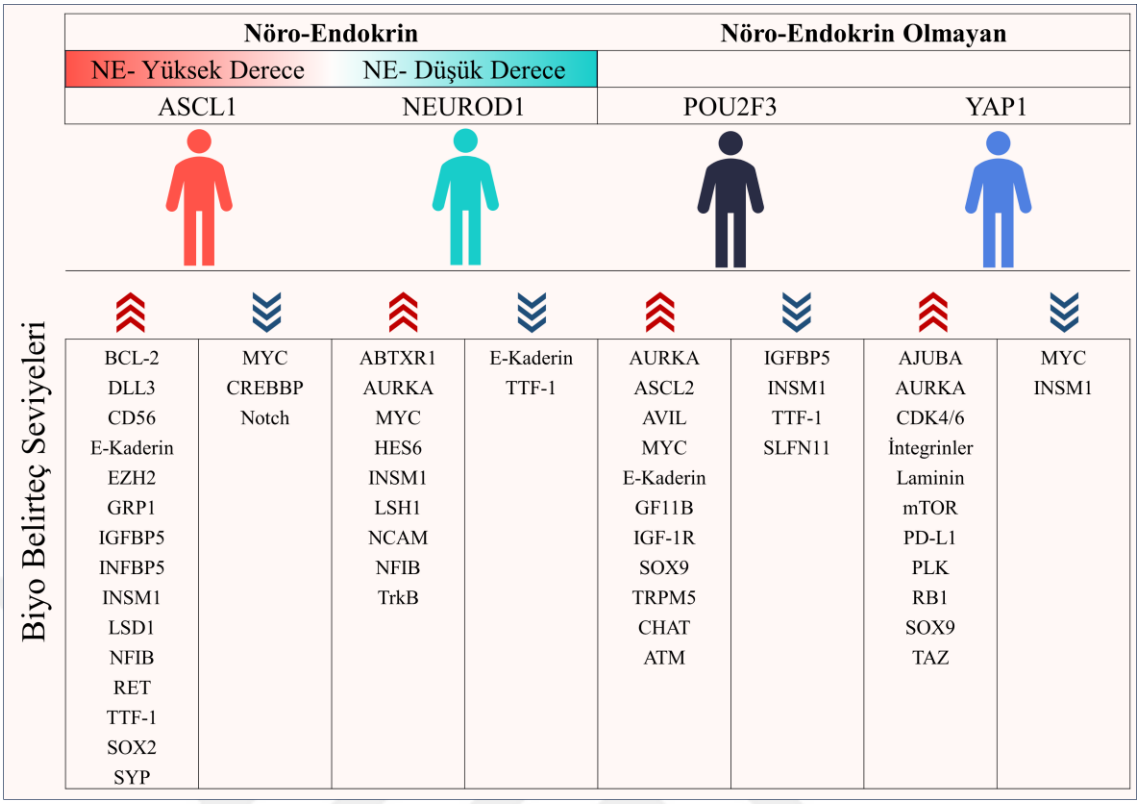
KHAK ise farklı olarak çok agresif bir seyri vardır ve genomik instabilite, TP53 ve RB1 genlerinin neredeyse evrensel inaktivasyonu, hızlı tümör büyümesi, artmış vaskülarite ve yüksek metastatik potansiyel ile karakterize edilir (Gazdar vd., 2017; George vd., 2015; Siegel vd., 2020). Hatta tanı anında, çoğu KHAK hastası zaten göğüs dışına metastatik bir yayılma ile başvurmakta ve bu da genellikle mortalite oranlarını (erken ölüm) arttırmaktadır (Carter vd., 2014). Moleküler karakteristik açısından KHAK nöero-endokrin olan ve olmayan tümörler olarak sınıflandırılmaktadır.

2.2.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)

KHAK homojen bir profil sergilemesine rağmen %7'nin altındaki 5 yıllık sağkalım oranıyla, malign hastalıkların en ölümcül biçimlerinden biridir. Çünkü KHAK başlangıçta standart tedavi protokolü olan agresif kemoterapiye iyi yanıt verse de ilk aşama tedaviler yalnızca kısa vadeli etkilere sahiptir. Tedavi sonrası nüks genellikle çok uzun sürmez ve tedavi öncesine göre daha agresif bir kanser fenotipi gözlenir.

Histopatolojik olarak geniş nekroz alanları olan, tabakalar veya şeritler halinde düzenlenmiş küçük tümör hücrelerinin yoğun proliferasyonundan oluşur. Yüksek proliferasyon alanlarında tümör hücreleri yuvarlak veya iğ şeklindedir. Genellikle dinlenme fazındaki 3 lenfosit boyutundan daha küçüktürler ve seyrek bir sitoplazmaya sahiptirler. Mitoz bölünme safhaları çoktur ve 80 mitotik faza ortalama her 2 mm^2 alan içerisinde rastlanır (Raso vd., 2021; Vollmer, 1982).

KHAK ilk olarak 1879'da Harting ve Hesse tarafından tanımlanmış ve bir lenfosarkom olarak sınıflandırılmıştır (Haerting, t.y.) Daha sonra, 1926'da, akciğerin küçük yulaf hücreli "*oat cell*" karsinomları olarak sınıflandırıldı(Barnard, 1926). Bu noktadan itibaren, tarihsel olarak oat cell karsinom olarak bilinir ve son Dünya Sağlık Örgütü tarafından akciğer tümörleri sınıflandırmasında nöroendokrin (NE) akciğer tümörleri grubuna dahil edilmiştir (Azzopardi, 1959; Watson & Berg, 1962). Günümüzde klinik olarak KHAK hala tek bir hastalık antitesi olarak görülse de geçmiş yıllardaki preklinik çalışmalar biyolojik olarak farklı KHAK alt gruplarını tanımlamıştır. Kökeni itibariyle bazı KHAK'larda farklılaşma profili farklı izlenmektedir. Bu tümör tiplerinde NE farklılaşması bulunmadığından NE olmayan tümörler olarak adlandırılırlar (Rudin vd., 2019). KHAK'da son zamanlarda anahtar transkripsiyonel düzenleyiciler olan ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1 sırasıyla SCLC-A, -N, -P ve -Y alt tipleri tanımlanmıştır (Şekil 3). Ayrıca ileri moleküler analizler sonucu kromogranin-A (CHGA), sinaptofizin (SYP), nöral hücre adezyon molekülü-1 (NCAM1/CD56) ve gastrin salgılatıcı peptid (GRP) gibi farklı NE belirteçlerinin ekspresyon modeline dayalı olarak NE-yüksek ve NE-düşük alt tipleri olarak sınıflandırılma yapılmaktadır (Lantuejoul vd., 2020; Schwendenwein vd., 2021).



Şekil 3. KHAK'inde sınıflandırma (Lantuejoul vd., 2020; Schwendenwein vd., 2021)

NE heterojenliğinin bir başka örneği de 1985 yılında Gazdar ve arkadaşları tarafından KHAK hücrelerinin in vitro ve in vivo davranışlarına dayanarak tanımlanmıştır (Carney vd., 1985; Gazdar vd., 1985). Buna göre "Klasik" fenotip tipik morfoloji, NE belirteçlerinin yüksek ekspresyonu ve hücre kültürlerinde yapışık olmayan süspanse büyüme modeli ile ilişkilidir (Carney vd., 1985; Gazdar vd., 2017). Buna karşılık, "varyant" fenotip genellikle belirgin nükleollere sahip daha büyük hücreler, NE özelliklerinin düşük ekspresyonu ve in vitro yapışık veya gevşek yapışık büyüme modeli ile karakterize edilmiştir (Rudin vd., 2019; W. Zhang vd., 2018).

2.2.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)

KHDAK evreleme ve tedavi seçenekleriyle sağkalım oranı KHAK'a oranla daha stabil seyretmektedir. Evre-I hastalar için 5 yıllık sağkalım yaklaşık %80'dir. Evre-II ve evre-III hastalarda ise 5 yıllık sağkalım %13-60 arasındadır (Goldstraw vd., 2016). Evre-I, evre-II ve bazı evre-IIIA hastalığı olan hastalar için bakım standardı cerrahi rezeksiyondur. Evre-II, evre-IIIA veya seçilmiş evre-IB hastalığı olan hastalarda adjuvan kemoterapinin eklenmesi sağkalımı %5-10 oranında artırabilir, ancak önemli

toksisitelerle ilişkilidir (Goldstraw vd., 2016; Pignon vd., 2008). Histopatolojik olarak KHDAK'ın 3 ana histolojik alt tipi vardır. ADC %40, SCC %25-30 ve LCC %10 – %15 (Duma vd., 2019). Diğer bir alt tip ise yukarıda belirtilen alt tiplerin spesifik özelliklerinden hiçbirine sahip olmayan "NOS" olarak ifade edilir (Duma vd., 2019; Travis vd., 2015).

2.2.2.1. KHDAK Adenokarsinomları

ADC'ler klasik olarak glandüler bir modelde ortaya çıkan papiller yapılara sahip bezlerden veya sitoplazmik mukus üreten katı kanser fenotipi olarak tanımlanmaktadır. Lepidik, asiner, papiller, mikropapiller, katı (solid) tümörler ve karışık altipler olmak üzere çeşitli histolojik alt tiplemeleri tanımlanmıştır. Asinar morofoloji en yaygın invaziv patern iken katı model, neoplastik hücrelerin bir araya toplanmasını temsil eder. Katı tümörler 3 boyutlu olarak düşünüldüğünde muhtemelen bir hücre topunu temsil eder ve bölümlere ayrıldığında katı bir hücre yuvası gibi görünür. Papiler model ise bir fibrovasküler çekirdeğe sahip arborize edici yapıları (dallanmış yapıları) kaplayan neoplastik epitel proliferasyonu ile karakterize edilir. Alt gruplar içerisinde son yıllarda en çeşitli karaktere sahip olan mikropapiller eklenmiştir. Mikropapiller kötü prognozlu yüksek dereceli bir alt tip olarak değerlendirilir (Travis vd., 2011, 2013, 2015).
Adenokarsinomların ilerlemesi daha çok atipik adenomatöz hiperplazi olarak adlandırılan daha az iyi karakterize premalign lezyonlarla ilişkilidir (Yoshizawa vd., 2011). Bu nedenle preinvaziv lezyonlar olarak da sınıflandırmaları mevcuttur.

- ***Atipik Adenomatöz Hiperplazi:*** Atipik adenomatöz hiperplazi en yaygın olarak tesadüfi bir histolojik bulgu olarak teşhis edilir ve akciğer kanseri rezeksiyon örneklerinin %5-20'sinde bulunur. Bu atipik proliferasyonun BT taramasındaki görünümü 5 mm veya daha küçük buzlu cam nodüllerinin varlığı ile karakterizedir (Nicholson vd., 2022; Travis vd., 2015).

- ***Adenokarsinoma İn-Situ (AIS):*** Bu, invazyon olmadan tamamen lepidik bir paternle büyüdüğü için yeni ADC sınıflandırmasında preinvaziv bir lezyon olarak kabul edilmiştir. Eğer BT taraması sonrası AIS tamamen çıkarılırsa 5 yıllık hastalıksız sağkalımın %100'e ulaşabilmektedir (Nicholson vd., 2022).

- ***Minimal İnvaziv ADC (MIA):*** Bu kavram, neredeyse %100 5 yıllık hastalıksız sağkalım ile nispeten iyi huylu bir ADC formunu tanımlamak için kullanılmaktadır. MIA; 5 mm veya daha az bir invazyon özelliğine sahip baskın lepidik büyüyen küçük (≤3 cm) soliter bir ADC anlamına gelir. Bu tümörlerin çoğu müsinöz değildir, ancak müsinöz form da mevcuttur (Nicholson vd., 2022).

- ***İnvaziv ADC:*** Yeni WHO sınıflamasına göre invaziv adenokarsinom nadir varyantlara ek olarak müsinöz olmayan ve müsinöz tipler olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır. Klinik pratikte müsinöz olmayan tipe daha sık rastlansa da müsinöz tip hala invaziv adenokarsinomların %3 ila %10'unu oluşturmaktadır (Nicholson vd., 2022).

2.2.2.2. Skuamöz Hücreli Karsinomlar (SCC)

KHDAK sınıflandırmaları içinde adenokarsinomlar akciğer kanserinin en yaygın alt tipidir ve bunu skuamöz hücreli karsinomlar izlemektedir. İlginç bir şekilde SCC, doza bağlı bir şekilde sigara içmekle en güçlü şekilde ilişkilidir (Barbone vd., 1997). Hatta yapılan bir çalışmada SCC vakalarının %91'inin sigara içilmesine bağlı olduğu düşünülmektedir (Ettinger vd., 2013, 2022). Tarihsel olarak skuamöz hücreli karsinomların üçte ikisi merkezi akciğer tümörleri olarak sunulurken, geri kalan üçte birlik kısmın çoğu periferiktir. Skuamöz farklılaşmayı düşündüren morfolojik özellikler arasında hücreler arası köprüleşme, skuamöz inci formasyonu (pearl formation) ve tek hücre keratinizasyonu yer almaktadır (Funai vd., 2003). İyi diferansiye tümörlerde bu özellikler kolayca görülürken az diferansiye tümörlerde tespit edilmeleri oldukça zordur (Carlile & Edwards, 1986). Skuamöz hücreli karsinom en sık segmental bronşlarda ortaya çıkar ve lober ve anastem bronşların tutulumu uzanım yoluyla gerçekleşir. SCC bazaloid, keratinize ve keratinize olmayan şeklinde üç patolojik alt tip ile sınıflandırılmıştır. Hatta 2021 yılı WHO çalışmasına göre keratinize ve keratinize olmayan alt tipleri birlikte tek bölüm içerisine entegre edilmiştir (Ettinger vd., 2022; Nicholson vd., 2022).

- ***Bazoloid Skuamoz Hücreli Karsinomlar (BSH)***

BSH hem skuamöz hücreli akciğer karsinomunun hem de bazal hücreli karsinomun sitolojik ve doku mimarisi özelliklerini sergileyen hücrelerden oluşan akciğer kanserinin

nadir görülen bir histolojik varyantıdır (Crapanzano vd., 2011; L. C. Wang vd., 2011). Histopatolojik özellikler arasında periferal palisading, lobüler veya anastomotik trabeküler büyüme paterni, belirgin nükleolleri olmayan hiperkromatik çekirdekli nispeten küçük küboidal veya fusiform hücreler bulunmaktadır. Ek olarak bu hücre topluluklarında yüksek mitotik oran ve nekroz gözlenmektedir (Brambilla vd., 1992; Crapanzano vd., 2011; Nagakawa vd., 2006).

- ***Keratinize Skuamoz Hücreli Karsinomlar (KSH)***

Keratinize edici alt tipte daha az farklılaşmış bazal benzeri hücrelerden farklılaşmış keratinize edici hücrelere doğru bir kanser hücre hiyerarşisi bulunur. Keratin incileri olarak adlandırılan doku yapılarının oluşumu gözlenmektedir (Drilon vd., 2012). Histolojik olarak bu tümör hücreleri bol miktarda eozinofilik keratinize sitoplazmaya sahiptir ve skuamöz farklılaşmanın karakteristiği olan yuvalar ve keratin incileri oluşturur (Travis, 2020).

- ***Keratinize Olmayan Skuamoz Hücreli Karsinomlar***

Keratinizasyon, hücre bütünlüğünü fiziksel hasar, enfeksiyon veya ksenobiyotik maddeler gibi çevresel etkilerden korumak için epitel hücre adaptasyonunun bir örneğidir. Keratinler epitelyal hücre koruyucu rollerine ek olarak apikal-bazal polarizasyonu, hücre boyutu tayini, protein translasyonu ve organel pozisyonu regülasyonu gibi hücrenin fonksiyon düzenleyicileri olarak başka önemli rollere de sahiptirler (Karantza, 2011).

Keratinize fenotipte tümörlerin çoğu merkezi hava yollarından (akciğer proksimal bölgesi) kaynaklanır. Bununla birlikte tümörler akciğerin herhangi bir yerinde bulunabilirken çoğunlukla ana bronş veya bronşun dallarında tutulum gösterirler. Bazı tümörlerde ise periferde ortaya çıkar ve bronş duvarı ve akciğer dokusunu istila ederek endobronşiyal büyüme paterni sergileyebilir. Histolojik olarak periferik (yıldız benzeri) çıkıntılara sahip polipoid bir kitle olarak görünür (R. Chen vd., 2019).

2.3. KHDAK'inde Histolojik Belirteçler

KHDAK kategorizasyonu için yaygın olarak kullanılan biyobelirteçler tiroid Transkripsiyon Faktörü-1 (TTF-1), Napsin-A, p63, sitokeratin-5/6/7, desmokolin ve nöroendokrin belirteçleridir (Ao vd., 2014).

2.3.1. TTF1

TTF-1 doğrudan akciğer gelişimi ve hücre döngüsüyle ilişkilidir. Ekspresyonu erken ve geç akciğer gelişiminde önemli ölçüde artar ve doğrudan gelişimle ilişkili akciğer hücre döngüsü efektörlerinde yukarı regüle edilir(Tagne vd., 2012). Moleküler düzeyde akciğer adenokarsinomlarında TTF-1 ekspresyonu müsinöz olmayan karsinomlarda yüksek oranda eksprese edilir. Bu durumda tümör hücresi proliferasyonunun ve sağkalımının artmasına katkıda bulunur (Kaufmann & Dietel, 2000; Kwei vd., 2008; H. Tanaka vd., 2007). Histolojik ayrımda TTF-1, akciğer kanserlerinin tanısında en sık kullanılan immünohistokimyasal belirteçlerden biridir (Brunnström vd., 2013; Folpe vd., 1999). Akciğer adenokarsinomlarının ~%60-90'ında, küçük hücreli akciğer kanserlerinin ~%90'ında ve tiroid karsinomlarının çoğunda eksprese edilir. Diğer bölgelerin adenokarsinomlarında veya skuamöz hücreli akciğer karsinomlarında ise hiç eksprese edilmez veya nadiren eksprese edilir (Rekhtman vd., 2011).

2.3.2. Napsin-A

Napsin-A, pepsin A ailesinin yeni aspartik proteinazı olarak bilinir. Katepsin-E, renin ve pepsin gibi peptidaz A1 ailesine aittir. Genomik olarak 19q13.3 kromozomunda bulunur ve NAPSA geni tarafından kodlanır (Hirano vd., 1995; Ordóñez, 2012). Napsin-A esas olarak tip II pnömositlerin sitoplazmasında, intra-alveolar makrofajlarda, proksimal ve kıvrımlı renal tübüllerde, pankreatik kanallarda ve ayrıca akciğer adenokarsinomlarında, papiller renal hücreli karsinomlarda ve berrak hücreli ovaryum karsinomlarda eksprese edilir (Hirano vd., 2000; Iwamoto vd., 2015; Mori vd., 1997; B. Xu vd., 2014). Napsin-A yaklaşık 25 yıl önce ilk tanımlandığında akciğere özgü bir belirteç olduğu düşünülmüştür. Ancak kısa bir süre sonra napsin-A'nın böbrek tümörlerinde de eksprese edildiği gösterilmiştir (Hirano vd., 2000; B. Xu vd., 2014). Tanısal patolojide immünohistokimyasal olarak napsin-A temelde KHDAK tiplendirilmesi için kullanılır. Çünkü napsin-A akciğer adenokarsinomlarının yüksek bir yüzdesinde (>%80) ifade

edilirken skuamöz hücreleri akciğer karsinomlarında nadiren ifade edilir (Ordóñez, 2012).

2.3.3. p63

3q27–29 kromozomunda yer alan p63 geni 15 ekzon içerir ve p53 ile dikkate değer bir sekans ve yapısal homoloji sergiler. p53 gibi p63 geni de bir N-terminal işlem alanını, bir çekirdek DNA bağlama alanını ve bir karboksi-oligomerizasyon alanını kodlar (Schmale & Bamberger, 1997; A. Yang vd., 1998).

Moleküler olarak hücre döngüsünde ve skuamöz hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynar (Hosny Mohammed vd., 2017). Belirli hücrelerde, dokularda ve gelişimsel/farklılaşma zamanlamalarında sürekli olarak ifade edilir. Embiroyonik epidermiste epitelyal katman oluşum programının başlatılması için moleküler bir anahtardır. Postnatal epidermisteki ekspresyonu ise deri, özofagus, tonsil, ürotelyum, prostat, meme ve bronşların glandüler yapılarının bazal hücreleri ile sınırlıdır (Koster vd., 2004; Steurer vd., 2021).
Histolojik olarak normal akciğerde p63, yüksek rejeneratif potansiyele sahip bir katman olan hava yolu epitelinin bazal katmanında eksprese edilir. Bronşiyal bazal (reserve-yedek) hücrelerin çekirdekleri, p63'ü yoğun bir şekilde eksprese ederken, siliyer hücreler, alveolar epitel hücreleri ve epitel dışı hücreler p63'ü eksprese etmez (Hibi vd., 2000; Pelosi vd., 2002). Neoplastik bağlamda skuamöz hücreli akciğer kanserlerinde p63 ifadesi gözlenirken ADC ve KHAK vakalarının neredeyse tamamı p63 için negatiftir (B. Y. Wang vd., 2002).

2.3.4. Sitokeratinler (CK)

CK ailesi farklı moleküler ağırlıklara ve izoelektrik noktalara sahip 20 polipeptitten oluşur. CK proteinleri iki ana tipte gruplandırılır. Tip-1 sitokeratinler (CK9-20) küçük asidik polipeptitler. Tip-2 sitokeratinler ise (CK1-8) büyük nötral polipeptitlerdir (Sundström & Stigbrand, 1994). CK5/6 ise orta büyüklükte asidik bir sitokeratindir. Normal dokularda, CK5/6 esas olarak keratinize (epitel) ve keratinize olmayan (mukoza) skuamöz epitelde eksprese edilir. Ayrıca prostat, meme ve tükürük bezlerinin bazal miyoepitelyal hücre tabakasında ekspresyonları gözlenmektedir (Cooper vd., 1985;

Miettinen, 1993). CK5/6 ifadesi normal dokulara ek olarak epitel, skuamöz mukoza ve miyoepitelden kaynaklanan iyi huylu ve/veya kötü huylu tümörlerde gözlenebilir. Meme kanserinde bazal benzeri karsinom ve mezotelyomadaki ifade seviyelerinin gözlenmesi en iyi örneği temsil edebilir (Carella vd., 2001; Kaufmann vd., 2001). KHDAK alt tiplemesi için kullanılan yaygın belirteçler adenokarsinomlar için TTF-1 ve p63 iken skuamöz hücreli karsinom için yüksek molekül ağırlıklı keratinleri CK5/6'yı içermektedir. Bu nedenle p63 ve p40'a ek olarak CK5/6 skuamöz hücreli karsinomların teşhisi için spesifik belirteçler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (King vd., 2006). Yapılan çalışmalarda CK5/6'nın akciğer ADC'den akciğer skuamöz hücreli karsinomları tanımlama duyarlılığı %78,9 ve özgüllüğü %97,7 gibi yüksek bir orandadır (Whithaus vd., 2012).

2.4. KHDAK Genetik Özellikleri

Genotipleme çalışmaları, akciğer kanserinin çeşitli alt tiplerinde genetik/moleküler anormallikler ortaya çıkarmıştır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), anaplastik lenfoma kinaz (ALK) ve ROS proto-onkogen-1 (ROS1) mutasyonları/değişiklikleri dahil olmak üzere birkaç sürücü mutasyonu tanımlanmıştır (Pao & Hutchinson, 2012). Bu sürücü mutasyonları sinyal proteininin yapısal olarak aktive olmasına neden olarak hücre proliferasyonu, anjiyogenez, metastaz ve apoptozisin inhibisyonuna yol açar (Sos & Thomas, 2012).

2.4.1 EGFR

Dinlenme koşulları altında EGFR genel koşullarda otomatik olarak inhibe edilen bir monomerik formda bulunur. Ancak ligand bağlanması diğer reseptörleride içeren homodimerler veya heterodimerler oluşturmaya hazır bir konformasyon sağlar. Reseptörün aktivasyonu, bir kinaz bölgesinin diğerini allosterik olarak aktive ettiği kinaz bölgelerinin asimetrik bir dimerinin oluşumuna bağlıdır (Kovacs vd., 2015). Asimetrik dimerde, "aktivatör kinazın" kinaz alanının C lobu, "alıcı kinazın" N lobu ile etkileşime girer ve bu da katalitik uyarım gerçekleştirir. Daha sonra alıcı kinaz, aktivatör kinazın spesifik tirozin kalıntılarını trans-fosforile eder. Yeni fosforlanmış tirozinler, çeşitli adaptörler (örn. GRB2), sitoplazmik enzimler (örn. PLC-gama) veya transkripsiyon düzenlemesinde yer alan spesifik faktörler (örn. STAT3) için bağlanma bölgeleri olarak

hizmet eder. Bu sinyal efektörleri ve adaptör proteinler birlikte aktive edilmiş reseptörleri doğrudan veya dolaylı olarak kanonik hücre içi yollara veya aktif reseptörleri duyarsızlaştıran endositik mekanizmaya bağlar. EGFR sinyal yolağının en önemli noktası EGFR'ın tirozin kenetlenme bölgesinden kaynaklı birden fazla bağdaştırıcıyı veya efektörü bağlayabilmesidir. Örneğin, fosforlanmış tirozin kalıntısı RAS yolu gibi pozitif sinyal yollarını başlatabilmektedir (Waterman vd., 2002).

EGFR'nin onkojenik mutant formları, ligandla aktive olan vahşi tip formu taklit eder. Fakat ilginç bir şekilde tümörlerin mutasyona uğramış EGFR'leri enzimatik olarak aktif ve transforme olmalarına rağmen, bunların tirozin fosforilasyon durumu ligandla aktive olan vahşi tip reseptörlere kıyasla önemli ölçüde daha düşüktür (Shtiegman vd., 2007). Fakat buna rağmen mutant EGFR'de nispeten düşük ancak kalıcı aktivite, kanonik biyokimyasal mekanizmadan farklı hücre içi sinyaller üretmektedir. Buna ek olarak, EGFR mutantları sıklıkla reseptör endositozu ve degradasyonu gibi negatif regülasyondan (duyarsızlaştırma) kaçınmaktadırlar (Mosesson vd., 2008).
Akciğer kanserlerinde ise EGFR mutasyonları sergileyen akciğer tümörleri sıklıkla EGFR gen amplifikasyonu ile ilişkilidir. Bunların en yaygın olanları ekson 19 delesyonları ve ekzon 21 L858R ikamesidir (E. L. Stewart vd., 2015). Ek olarak, EGFR'nin 18-25 eksonlarında nokta mutasyonları, indeller ve duplikasyonlar gibi nispeten nadir sapmalar meydana gelmektedir (Yasuda vd., 2013). EGFR mutasyon prevalansı etnik kökene göre değişmektedir. Mutasyonlar beyaz ırktan hastaların ≈ %17'sinde ve Asyalı KHDAK'li hastaların ≈ %39'unda saptanmaktadır (Y.-L. Zhang vd., 2016). EGFR'de gerçekleşen mutasyonlar EGFR-TKI'ların geliştirilmesini sağlamıştır. EGFR'nin aktive edici mutasyonları geliştirilen EGFR-TKI'ların ise ana hedefleridir. Birinci nesil EGFR'ye özgü tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) olan erlotinib ve gefitinib, hastaların progresyonsuz sağkalımı (PFS) açısından kemoterapiye kıyasla açık bir üstünlük elde etmiştir (Mitsudomi vd., 2010; Mok vd., 2009). Bununla birlikte, birinci kuşak TKİ'lere başlangıçtaki iyi yanıtlara rağmen, hastalar kaçınılmaz olarak 10-14 ay içinde direnç geliştirmektedir (Pao vd., 2005). EGFR geninin ekzon 20 790. amino asit pozisyonunda treoninin metionine ikame edilmesiyle üretilen T790M mutasyonu, erken nesil EGFR-TKI alan hastalara direnç kazandırır ve %50- oranıyla en sık görülen direnç mekanizmasını oluşturur (Kuiper vd., 2014; Z.-F. Wang vd., 2018; S.-G. Wu vd., 2016).

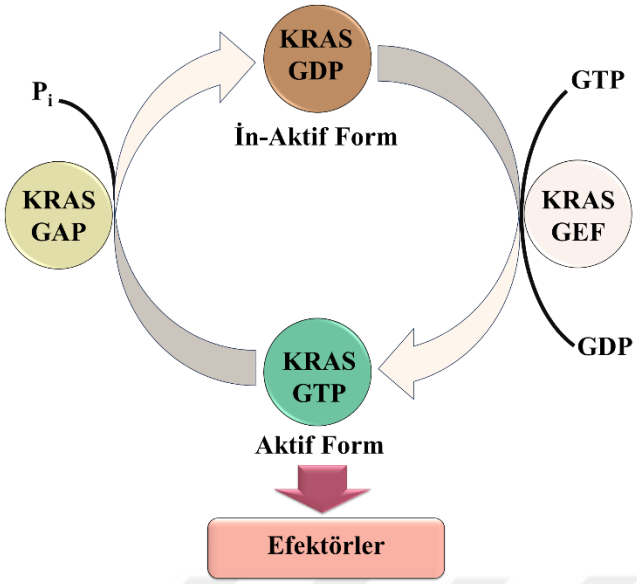
T790M gibi direnç mutasyonu tarafından ortaya çıkarılan erken nesil EGFR-TKI'lere duyarlılığın azalması sorunu, üçüncü nesil EGFR-TKI'lar ile özellikle osimertinib'in geliştirilmesiyle çözülmüş gibi görülmektedir (Z. Zhao vd., 2020).

2.4.2 Kirsten sıçan sarkomu viral onkojen homologu (KRAS)

KRAS geni, insanlarda iki izoform daha içeren sıçan sarkomu viral onkogen ailesinin (RAS) bir üyesidir. 1982 yılında Weinberg ve Barbacid, insan mesane kanseri hücre hatlarından izole ettikleri gen daha sonra 11. kromozomun kısa kolunda (11p15.1-11p15.3) bulunan HRAS olarak adlandırılan RAS geninin insan homoloğu olarak tanımlanmıştır (Barbacid, 1987). Aynı yıl, insan akciğer kanseri hücrelerinde, kromozom 12'nin kısa kolunda (12p11.1-12p12.1) bulunan KRAS adlı başka bir homolog bulundu (Chang vd., 1982; Parikh vd., 2022). NRAS adı verilen son gen ise insan nöroblastomunda bulunur ve kromozom 1'in kısa kolunda (1p22-1p32) yer alır (McBride vd., 1983).

Fonksiyon açısından bakıldığında RAS, guanozin trifosfataz ailesine ait guanin nükleotid bağlayan bir tür membrana bağlı düzenleyici proteindir. Aktive edilmiş membran reseptörlerinden hücre içi moleküllere kadar sinyal iletimini kontrol eden bir guanozin difosfat (GDP)/trifosfat (GTP) ikili anahtarı olarak işlev görür (Román vd., 2018; Takai vd., 2001). İkili anahtar mekanizmasında esas olarak SOS (son of sevenless) ve nörofibromin 1 (NF1) gibi GTPaz aktive edici proteinler (GAP'lar) bulunmaktadır (Drugan vd., 2000).

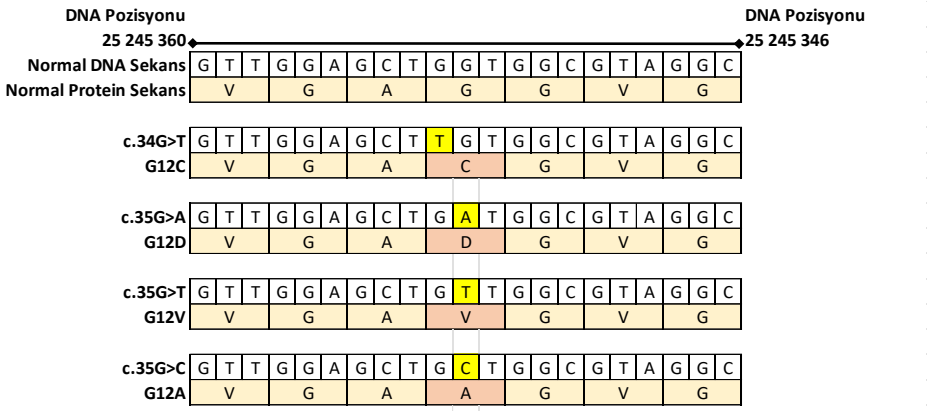
KRAS dinlenme durumunda, GTP'yi GDP'ye hidrolize edebilen içsel GTPaz aktivitesi nedeniyle normalde GDP ile inaktive bir durumda bağlanır. Hücreler EGF ve EGFR etkileşimi gibi ilgili uyaranları aldığında, in aktif KRAS-GDP kompleksi aktif formu olan KRAS-GTP kompleksine dönüşmesi gerekmektedir (Scheffzek vd., 1997). Mekanizmanın gerçekleşmesi ise guanin nükleotid değişim faktörlerinin (GEF) varlığında KRAS'ın GDP ile afinitesi azalarak ve GDP'den yaklaşık 10 kat daha yüksek bir hücresel konsantrasyona ve yüksek bir afiniteye sahip GTP ile kompleks oluşturmasıyla gerçekleşir (Bos vd., 2007; Scheffzek vd., 1997) (Şekil 4).



Şekil 4. KRAS moleküler çalışma mekanizmasının şematik gösterimi

KRAS aktivasyonu ise hızla hızlandırılmış fibrosarkom (RAF), mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), hücre dışı düzenlenmiş protein kinazlar (ERK), fosfoinositid 3-kinaz (PI3K), protein kinaz B (AKT) ve rafamisinin memelilerde hedefi (mTOR) gibi merkezi hücre sinyal yolaklarını aktive edebilir. Bu durumda KRAS'ın çoklu sinyal yollarıyla geniş bir iletişim yelpazesini ortaya koymaktadır (Huang vd., 2021).

KRAS mutasyonları ağırlıklı olarak, KHDAK'ın en yaygın histolojik alt tipi olan akciğer adenokarsinomlarında meydana gelir. Ayrıca akciğer skuamöz hücreli karsinomalarda düşük bir frekansta gözlenmiştir, ancak KHAK'da çok nadirdir. Mutasyonlar ağırlıklı olarak KRAS'ın 12. kodonunda, ara sıra 13. kodonda ve nadiren 61. kodonda meydana gelir. Frekansları çalışmalara göre farklılık gösterse de KHDAK'da ekzon 12 mutasyonlarının frekansı G12C (~%40), G12D(~%25), G12V(~%20) ve G12A(~%8) olacak şekilde sıralanmaktadır (Şekil 5).



Şekil 5. KRAS ekzon 2 mutasyonlarının animoasit değişimleri ve DNA lokasyonları

KRAS'ın bilinen bu kompleks işlevleri düşünüldüğünde ve birçok insan tümöründe mutasyona uğradığının keşfedilmesinden bu yana, kanser terapötiklerindeki en büyük zorluklardan biri, "onkojenik" RAS için seçici bir inhibitör bulmak olmuştur. O zamanlar tek uygulanabilir yaklaşım, Ras için lipit antikoru sağlayan makineyi bloke ederek RAS'ın zar lokalizasyonuna müdahale etmekti. Bu nedenle, birçok ilaç şirketi farnesil transferaz inhibitörlerini keşfetmek için programlar geliştirdi. KRAS'ın da geranil-geranillenmiş olduğunun keşfinden sonra geranil-geranil transferaz inhibitörlerini tanımlamak için araştırma girişimleri başlamıştır (Kazi vd., 2019; Whyte vd., 1997). Bununla birlikte, bu inhibitörler ayrıca tümör olmayan hücrelerde normal Ras'ı ve şimdi anladığımız gibi çok çeşitli RAS benzeri küçük G proteinlerini etkiler. Aslında, bu inhibitörlerin bazılarının klinik yararları olmasına rağmen, hiçbiri "onkojenik" RAS'a özgü olmadığı için etkinlikleri çok ileri düzeye gidememiştir (Baranyi vd., 2020).

İlerleyen çalışmalar KRAS'ın aşağı akışında bulunan sinyal yolaklarının hedeflenme stratejini düşündürmüştür. Fakat yapılan bir klinik faz-III çalışmasında dosetaksel ile kombinasyon halinde selumetinib (MEK 1/2 inhibitörü) kullanılarak KRAS'ın aşağı akışında bulunan MEK'in inhibisyonu hayatta kalma veya yanıtta önemli gelişmeler göstermemiştir (Jänne vd., 2017). Yapılan girişimlerin başarısızlığı mutant KRAS'ı hedefleyen I. nesil KRAS inhibitörlerinin doğmasına yol açmıştır. Temelde I. nesil KRAS inhibitörleri, Switch II cebini (SII-P) bağlayarak seçici olarak G12C mutantlarını hedef almak üzere tasarlanmıştır. Hatta AMG510 (Sotorasib) ve MRTX840 (Adagrasib) ismiyle KHDAK KRASG12C mutasyonu taşıyan hastalar için FDA onayı alarak kullanıma sunulmuştur (Jänne vd., 2022; Skoulidis vd., 2021). Araştırmacılar KRAS

G12C pozisyonundaki sistein kalıntısını hedef alan bir dizi KRas inhibitörü geliştirilmiştir. Sotorasib aslında bu çalışmalarda üretilen ARS-1620 kodlu inhibitörün üzerinde yapılan bir gelişmedir. Yapısal değişiklikler, yeni inhibitörün KRAS G12C mutantlarının Cys12 kalıntısına kovalent bağlanmasına yol açmıştır (Fell vd., 2020; Kessler vd., 2019). Özellikle, yapıya bir benzen halkasının eklenmesi, proteinin SII-P bölgesine proksimal bir cep oluşturan His95, Tyr96 ve Glu99 kalıntılarına ek bağlanmaya izin vermiştir. Adagrasib ise GTP'ye bağlı KRAS G12C mutantlarının SII-P bölgesine kovalent olarak bağlanarak MAPK sinyalini inhibe eder. Adagrasib için onay, lokal olarak ilerlemiş veya metastatik KHDAK'lı hastalarda %43'lük bir objektif yanıt oranı gösteren Faz I klinik çalışmasından sonra gelmiştir.

2.4.3. P53

TP53 17. kromozomun (17p13.1) kısa kolunda bulunur. 11 ekzon, 10 intron, 393 amino asit kalıntısından oluşan p53 proteini amino-terminal alanı, DNA bağlama alanı ve karboksi-terminal olarak üç fonksiyonel alana ayrılan bir transkripsiyon faktörüdür. Yabani tip p53, birkaç hedef genin transkripsiyonunu düzenleyerek birçok önemli biyolojik sürecin merkezinde rol oynar (Hernández Borrero & El-Deiry, 2021).

TP53, 1979 yılında ilk kez rapor edildiğinden beri sıcak bir araştırma konusu olmuştur. Bugüne kadar tanımlanan insan tümörleri ile en yüksek korelasyona sahip gendir. P53 anlayışı onkogenden tümör baskılayıcı gene doğru anlayışı tamamen değiştirmiştir (Levine & Oren, 2009). p53, DNA hasarı, onkogenlerin aktivasyonu, besin yoksunluğu ve hipoksi gibi çeşitli dış veya iç streslere yanıt vermedeki rolü nedeniyle "genomun koruyucusu" olarak anılmıştır. Ne yazık ki, p53'ün inaktivasyonu insan primer tümörlerinin %50'sinden fazlasında meydana gelen mutasyonlarla beraber tümör oluşumunda yaygın bir olaydır (Boutelle & Attardi, 2021; Hafner vd., 2019; Levine & Oren, 2009; Z. Wang vd., 2022). p53'teki mutasyonlar incelendiğinde çoğu yanlış anlamlı mutasyonlardır. Ayrıca ilginç bir şekilde tümör baskılayıcı özelliklerindeki fonksiyon kaybına ek olarak, bu mutantlar sıklıkla fonksiyon kazanma aktivitesine sahiptir ve agresif kanser fenotipine katkıda bulunur (Vaddavalli & Schumacher, 2022). Fibroblastlarda yapılan çalışmalarda V143A, R175H, R248W, R273H ve D281G mutant suşları (p53 mutant) taşıyan fibroblastalar in-vivo fare modellerinde yüksek tümörijenik potansiyel göstermiştir (Dittmer vd., 1993). p53-aracılı apoptozu tamamen ortadan

kaldıran p53 K117R mutant knock-in fare modellerinde ise p53 eksikliği olan veya doğal p53 geni taşıyan farelere oranla mut.p53 (K117R mutant) farelerdeki tümörler daha agresif ve metastatik özellikler sergilemiştir (Hanel vd., 2013; T. Li vd., 2012; Muller & Vousden, 2014; Y. Zhang vd., 2018). p53 mutasyonlarının yaklaşık %80'i yanlış anlamlı mutasyonlardır. Mutasyonlar esas olarak DNA bağlanma alanını kodlayan ekzon 5-8'de bulunur ve en yaygın mutasyon bölgeleri R175, G245, R248, R249, R273 ve R282'de meydana gelir (Chiang vd., 2021). Yüksek hasta sayılı mutasyon profilleme çalışmalarında en çok sübstitüsyon mutasyonlarının gözlendiği ve bunlarında G'den A'ya geçişler olduğunu ve bunu C'den T'ye geçişlerin izlediği gözlenmiştir. Bir diğer nokta ise p53 geninde gözlenen yanlış anlamlı (missense) mutasyonlardır ve genellikle iki kategoriye ayrılırlar. DNA ile temas halindeki amino asitlerde meydana gelen ve p53 R273H ve R248Q mutantları gibi p53'ün DNA'ya bağlanamamasına neden olan DNA temas mutasyonları ilk kategoriyi oluşturmaktadır. Diğer kategori ise yapıyı koruyan amino asitlerde meydana gelen ve p53 R175H, Y220C ve R249S mutantları gibi katlanmamış proteinlerle sonuçlanan konformasyonel mutasyonlardır (Chasov vd., 2020). Ek olarak p53 mutasyonlarında agredat mutant p53 proteinlerinin oluşumu söz konusu olabilmektedir. Bu fenomende mutasyon varlığında üretilen ve artmış yapısal kararsızlığa sahip p53 proteinlerinin hidrofobik çekirdeklerine sarılmış yapışma sekansı proteinin yüzeyine maruz kalmakta ve protein agregatlarının oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Soragni vd., 2016). Daha da önemlisi artmış kenserojen özelliğe ek olarak mutant p53 agredatları, p63 ve p73 ile birlikte toplanabilmektedir. Bu durumda p63 ve p73'ün transkripsiyon düzenleyici işlevleri yerine getirmek üzere çekirdeğe girişleri engellenmekte ve tümorojenik potansiyel en üst seviyeye çıkmaktadır (Costa vd., 2016; Maan & Pati, 2018; Y. Zhang vd., 2020).

Tedavi rejimleri içerisinde p53 mutasyonunun yeri oldukça önem arz etmektedir. Mutant p53'ün ekspresyonunun farklı tümörlerde artan kemoterapi direnci ile pozitif olarak ilişkili olduğu bilinmektedir. Normal koşullarda p53 Bax, Bak ve voltaja bağlı anyon kanallarının (VDAC) oligomerizasyonunu indükleyerek dış mitokondriyal membranın geçirgenliğini artırır ve sitokrom-c salınımını teşvik eder (McDermott vd., 2005). 5-florourasil ve oksaliplatin gibi kemoterapötik ajanların kullanımı ise vahşi tip 53 taşıyan kanser hücrelerini Fas aracılı apoptoza duyarlı hale getirir. Buna karşılık, p53 R175H,

L194F, R249S ve R280K mutantları, Bax/Bak lipid dengesini aktive etme ve kanser hücrelerinde apoptozda yaşanan VDAC multimerizasyon durumunu değiştirme yeteneğini kaybederek tedavi yanıtlarını değiştirmektedir (McDermott vd., 2005; Wolff vd., 2008).

2.5. KHDAK Tedavi Yaklaşımları

KHDAK'lı hastaların yönetimi genellikle hastanın rezektabilitesine, evresine ve genel performans durumuna bağlı olarak cerrahi, radyoterapi ve/veya kemoterapinin bir kombinasyonunu içeren multidisipliner bir yaklaşımı içerir (Achiwa vd., 2004; Jemal vd., 2008). Geleneksel yaklaşıma ek olarak, kanser hücrelerinde spesifik sinyal iletimini engelleyen moleküler hedefli tedaviler ve intrinsik antitümör bağışıklığını doğrudan veya dolaylı olarak etkinleştiren immünoterapiler geliştirilmiştir (Waldman vd., 2020; Yuan vd., 2019).

2.5.1. Kemoterapi

Hedefe yönelik tedavilerden önce, akciğer kanseri için klinik tedaviye kemoterapi hakimdi. KHDAK'nin gen tipleri klinikte tanımlandıktan sonra kemoterapi kademeli olarak hedefe yönelik tedaviyle yer değiştirdi. Ancak şu anda KHDAK'da kemoterapi çoğunlukla sisplatin ve karboplatin artı gemsitabin veya taksanlar ve pemetrexed artı VEGFR inhibitörü (bevacizumab) veya EGFR inhibitörü (erlotinib) gibi bazı hedeflenmiş tedavi ilaçlarını içermektedir (Ramalingam & Belani, 2008). Tedavide kullanılan kemoterapi ilaçlarının oldukça geniş yelpazede bir etki mekanizması bulunmaktadır. Sisplatin, karboplatin ve gemsitabin DNA onarım sistemini hedefleyerek DNA hasarını indükler ve biriken DNA hasarı kanser hücresinde apoptotik hücre ölümüyle sonuçlanır (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014; Mini vd., 2006). Taksanlar mikrotübül dinamiklerini ve hücre döngüsün müdahale ederek apoptozu indüklerler (N. Tan vd., 2011; J. Zhao vd., 2005). Bir antifolat ilacı olan Pemetrexed ise S fazında hücre döngüsünün durmasına neden olmaktadır (Dubey & Schiller, 2005). Kemoterapi rejiminde etkili birçok ajan olmasına rağmen akciğer kanseri tedavisinde kemoterapinin sınırlamaları bulunmaktadır. Ajanların ilk erken tedavide bazı etkileri olabilse de tümör hızla direnç kazanabilir. Bu da akciğer kanseri tedavisinde kemoterapi sürecini sekteye uğratmakta ve hasta sağkalımını olumsuz yöne çevirmektedir (Kim, 2016). Bu yönde

akciğer kanserinde kullanılan standart kemoterapi rejiminde çeşitli direnç mekanizmaları vardır. Bu mekanizmaların başında platin temelli ilaç direnci gelmektedir. Örneğin DNA onarım yolunun yukarı regülasyonu, platin bazlı kemoterapötik ajanlara karşı dirence aracılık eder (Martin vd., 2008). Hatta KHAK ile karşılaştırıldığında, KHDAK'ın yüksek DNA onarım kapasitesi nedeniyle sisplatine daha düşük bir yanıt gösterebilmektedir (Zeng-Rong vd., 1995). Benzer şekilde eksizyon onarım çapraz tamamlama grubu 1 (ERCC1) gibi nükleotid eksizyon onarım (NER) sistemi ile ilgili genlerin aşırı ekspresyonunun sisplatin direncine dahil olduğu bildirilmiştir (Martin vd., 2008b; Vilmar & Sørensen, 2009). DNA tamir mekanizmalarına ek olarak ilaç alımının inhibisyonu, ilaç akışının ve detoksifikasyonun arttırılması yoluyla platin ilaçların hücre içi konsantrasyonunda azalma ile tedavi direnci gözlenebilmektedir Kimyasal konformasyonları itibariyle platin bileşikleri polardır; bu nedenle platin bileşiklerinin alımı pH, sodyum ve potasyum iyon konsantrasyonları gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilir (Kelland, 2007; D. J. Stewart, 2007). Pasif difüzyona ek olarak, bakır taşıyıcı 1 (CTR1) ve organik katyon taşıyıcıları (OCT'ler) gibi birkaç katyon taşıyıcının da platin ilaçlarının alımında yer aldığı bildirilmiştir. Hatta tümöral CTR1 ekspresyonun kaybı veya azalması, hücre içi platin konsantrasyonunda azalma ve tümör tepkisi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Zhou vd., 2020). Platin bazlı kemoterapi ile tedavi edilen KHDAK hastalarında negatif bir prognostik faktör olan P-tipi adenozin trifosfatazların (ATP7A ve ATP7B) artan ekspresyonu tedavi direncinin göstergesidir (INOUE vd., 2010; Z. Li vd., 2012). İlaç direnci noktasında ilaç alımı ve taşınmasında anahtar rol alan ATP bağlayıcı (ABC) ilaç taşıyıcı süper aileside oldukça fazla çalışılan bir sistemdir. MRP1/ABCC1 ve MRP3/ABCC3 gibi taşıma proteinlerinin ABC süper ailesinin ekspresyonu da sisplatin direnci ile ilişkilendirilmiştir (Mirzaei vd., 2017; Young vd., 2001).

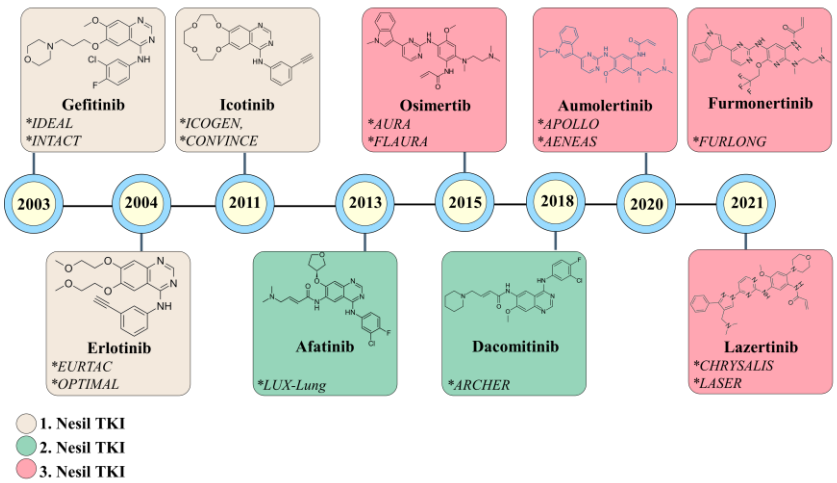
2.5.2. Hedefe Yönelik Tedaviler

Akciğer kanseri, çoklu onkogenlerin mutasyonu tarafından yönlendirilir, klinikteki hedeflenebilir değişiklikler, hedefe yönelik tedavi için olasılık sağlar (A. C. Tan & Tan, 2022). Akciğer kanseri hastalarında hedefe yönelik tedavi uygulamak için, tümördeki moleküler mutasyonların tanı testleri ile doğrulanması gerekir (Cheng vd., 2021). Yeni nesil dizileme teknolojisinin geliştirilmesi akciğer kanseri hastalarında ortaya çıkan

mutasyonları test etmek için ve klinikte hassas, kişiselleştirilmiş tedavi almalarına yardımcı olabilecek bir yöntemler sağlamaktadır (Garcia-Robledo vd., 2022). Bu noktada EGFR, ALK, ROS, KRAS ve VEGF gibi genler ve mutant suşları tedavi hedefi olarak kullanılmakta ve bu alanda güncel tedavi yaklaşımları takip edilmektedir.

2.5.2.1. EGFR Tirozin Kinaz İnhibitörleri (EGFR-TKİ)

EGFR, HER/ErbB ailesine aittir; hücre yüzeyinde bulunur. Ligand bağlanması üzerine tirozin kalıntılarında dimer oluşumuna ve oto-fosforilasyona uğrar. Bu durum sinyal yolağının alt akışında bulunan MAPK ve PI3K yolları kanser hücresi proliferasyonuna, farklılaşmasına ve göçüne yol açar (da Cunha Santos vd., 2011). EGFR KHDAK'da en sık görülen sürücü genlerden biridir. Kadın hastalar erkek hastalara göre daha yüksek mutasyon oranlarına sahiptir. Adenokarsinomlar ve sigara içmemek de EGFR mutasyonları ile ilişkilidir (Rosell vd., 2009). KHDAK hastalarının yaklaşık %20'si EGFR'de aktive edici mutasyonlar taşımaktadır. Ekson 19'daki (Ex19del) delesyonlar ve ekzon 21 içindeki L858R nokta mutasyonu EGFR aktive edici mutasyonların ~%90'ını oluşturur (Roskoski, 2019). EGFR'nin aktive edici mutasyonları EGFR-TKI'lerin hedefleridir. Mevcut tedavi kılavuzları, EGFR aktive edici mutasyonları olan ilerlemiş KHDAK'lı hastalar için 1. basamak tedavi olarak EGFR-TKİ'leri önermektedir (Inoue vd., 2013; Mitsudomi vd., 2010) (Şekil 6).



Şekil 6. Klinik kullanıma sahip TKİ'ler ve FDA onay tarihlerinin şematik gösterimi. **Çalışmaların yapıldığı ilk klinik çalışma isimlerini belirtmektedir.*

Afatinib ve dakomitinib gibi 2. nesil EGFR-TKİ'ler orijinal olarak 1. nesil EGFR-TKİ'lere karşı gelişen direncin üstesinden gelmek için tasarlanmıştır (Şekil 6). Afatinib, EGFR ve HER2'ye kovalent olarak bağlanmak üzere tasarlanmış geri dönüşümsüz çift özgüllüğe sahip bir EGFR ve HER2 inhibitörüdür. Dakomitinib ise geri dönüşümsüz bir pan-HER inhibitörüdür. Geniş aktivite spektrumu, 1. nesil EGFR-TKİ'lere kıyasla EGFR'ye bağlı tümör büyümesinin inhibisyonunu geliştirmelerini sağlar. LUX-Lung ve ARCHER klinik çalışmalarında, afatinib ve dakomitinib KHDAK'inde ve EGFR aktive edici mutasyonları olan hastaların 1. basamak tedavisinde gefitinib ile karşılaştırıldığında ilerlemesiz sağkalım (Progression-Free Survival-PFS) ve genel sağkalım (Overall Survival-OS) sürelerini önemli ölçüde uzatmıştır (Park vd., 2016; Y.-L. Wu vd., 2017). Çoğu hasta, 1. ve 2. nesil EGFR-TKİ'lerle 9-13 aylık tedaviden sonra çeşitli mekanizmalar yoluyla kaçınılmaz olarak kazanılmış direnç geliştirir. KHDAK hastalarında meydana gelen EGFR ekson 20'deki T790M mutasyonu toplam hastaların %50-60'ında meydana gelmekte ve dirençte baskın rol oynamaktadır (Mok vd., 2017; Westover vd., 2018). Kapı bekçisi olarak adlandırılan (Gatekeeper) T790M mutasyonu hem sterik engelleme hem de mutant EGFR reseptörüne artan ATP afinitesi üzerinde etki göstererek ATP ile geri dönüşümlü olarak EGFR-TKİ'ler arasındaki rekabeti artırır. Böylece 1. ve 2. nesil EGFR-TKİ'lerin etkinliğini azaltır (Westover vd., 2018). Bu noktada 3. nesil TKİ'ler devreye girmektedir. Osimertinib tarafından temsil edilen 3. nesil EGFR-TKİ'ler T790M mutasyonunun aracılık ettiği 1. ve 2. nesil EGFR-TKİ'lere karşı kazanılmış direncin üstesinden gelmede oldukça başarılı sonuçlar sergilemiştir. Osimertinib seçici olarak EGFR T790M mutasyonunu hedefleyerek mutant EGFR'nin ATP-bağlanma bölgesinde C797 kalıntısı ile kovalent bağlar oluşturur. Bağlanmaları geri döndürülemez olduğundan T790M mutasyonu tarafından sağlanan gelişmiş ATP afinitesinin üstesinden gelir (Cross vd., 2014). Ayrıca osimertinib EGFR mutasyonları olan tedavi edilmemiş KHDAK'da gefitinib veya erlotinibden daha iyi etkinlik göstermiştir. Osimertinib alan hastalar 1. veya 2. nesil EGFR-TKİ'ler ile tedavi edilenlere göre daha düşük ciddi advers olay insidansına sahiptir (Mok vd., 2017). Fakat iyi bir klinik etkinliğe rağmen 1. basamak tedavi olarak osimertinib uygulanan EGFR-aktive edici mutasyonlara sahip hastalarda yaklaşık 19 ay sonra kaçınılmaz olarak direnç geliştiği de tespit edilmiştir (Soria vd., 2018).

2.5.2.2. KRAS İnhibitörleri

KRAS'ın hücre büyümesindeki merkezi rolü on yıllardır kapsamlı ilaç geliştirme çabalarına konu olmuştur. Ancak KRAS, GTP'ye olan yüksek afinitesi, sınırlı sayıda aktif bağlanma bölgesi ve aşağı akış yollarının karmaşıklığı nedeniyle uzun süredir "ilaçlanamaz-*undruggable*" olarak kabul edilmekteydi (Bar-Sagi vd., 2020; P. Liu vd., 2019). Günümüzdeki hesaplamalı modelleme ve kristalografi tekniklerindeki ilerlemelere kadar mutant KRAS protein yapıları tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle proteininin tam yapısını gösterene kadar başarısız araştırma girişimleri gerçekleşmiştir. Fakat tüm başarısız girişimler en sonunda mutant KRAS G12C'nin efektör bölgesi yakınında bulunan switch-II allosterik bağlanma bölgesine bağlanabilen küçük bir inhibitör molekülün (ARS-1620) keşfine yol açmıştır (Ostrem vd., 2013). Ayrıca ilerleyen zamanlarda KRAS G12C transversiyonunda bulunan sistein amino asidine seçici ve geri dönüşümsüz olarak bağlanarak mutasyona uğramış proteini inaktif KRAS-GDP durumunda bloke eden gelişmiş potensli birkaç küçük inhibitör molekül keşfedilmiştir. İlerleyen çalışmalar sonucu klinik ortamda etkinlik gösteren ilk KRAS G12C inhibitörleri sotorasib (AMG-510) ve adagrasib (MRTX-849) olmuştur (Fell vd., 2020; Lanman vd., 2020; Pantsar, 2020).

Sotorasib, KRAS G12C mutasyonuna sahip önceden tedavi edilmiş KHDAK hastalarında sürekli klinik fayda gösteren ilk oral KRAS G12C inhibitörüdür. İlk faz I ve faz-II klinik araştırma sonuçlarının gelmesiyle FDA sotorasib'i 28 Mayıs 2021'de KRAS G12C mutasyonlu KHDAK'li ve önceden en az bir sistemik tedavi almış hastalar için etkin tedavi olarak onayladı (Hong vd., 2020; Skoulidis vd., 2021). Ayrıca başka bir klinik çalışma KRAS G12C mutasyonu taşıyan ön tedavili KHDAK hastalarında dosetaksele karşı sotorasib'i araştıran faz III çalışma halen devam etmektedir (Klinik Araştırma No: NCT04303780) (Reck vd., 2020). Sotorasib etkisinin ilgi çekiciliği EGFR, MEK, src homoloji bölgesi 2 domain fosfataz (SHP2) ve mTOR inhibitörlerinin yanı sıra immünoterapi ile birlikte değerlendirilmesine yol açmıştır (Hong vd., 2021).

Klinik denemelere giren bir diğer KRAS G12C inhibitörü ise Adagrasib'dir. Sotorasib ile ortak bir etki mekanizmasına sahip olmakla birlikte, oral biyoyararlanım, uzun yarılanma ömrü (yaklaşık 24 saat) ve geniş doku dağılımı gibi farmakokinetik özellikleri bakımından farklılık göstermektedir. 24 Haziran 2022'de Adagrasib, daha önce en az bir

sistemik tedavi almış olan KRAS G12C mutasyonu pozitif KHDAK hastalarının potansiyel tedavisi için FDA onayı almıştır (Hallin vd., 2020). KRAS G12C mutasyonu taşıyan ilerlemiş KHDAK hastalarında immünoterapi ve kemoterapi ile tedaviden sonra yapılan faz I/II çalışmasında 79 hastaya günde iki kez 600 mg Adagrasib verilmiştir (Klinik Araştırma No: NCT03785249). 51 hastanın %45'inde objektif yanıt ve %96'sında hastalık kontrolü sağlandığı bildirilmiştir (Jänne vd., 2020). KRAS mutasyonu taşıyan KHDAK hastalarında umut olabilecek bu çalışmalar güncel tedavi yaklaşımlarında yerini alarak ileri araştırmalara konu olmaya devam etmektedir.

2.6. Kanser ve İmmunoterapi

Bağışıklık modülasyonu, hastalığa karşı savaşta potansiyel bir terapötik hedef olarak uzun süredir çalışılmaktadır. 18. yüzyılın başında İstanbul'dan Avrupa'ya gelen seyyahlar ile 1798'de Edward Jenner, Avrupa'da çiçek hastalığını önlemek için sığır çiçeği ile aşılama kavramını popülerleştirip yayarak "aşılama" terimini icat etmiştir(Barquet, 1997; McCarthy, 2006; Riedel, 2005). Neredeyse yüz yıl sonra William Coley Atlantik boyunca "*Coley toksinleri*" olarak bilinen bakteriyel ürünleri sarkomlu hastalara enjekte etmeye başlamıştır (Willis, 1997). Bu belki de modern tıbbın immüno-onkolojiye ilk girişiydi.
1909 yılında Paul Ehrlich, hücrelerin anormal dönüşümünün doğal ve yaygın bir süreç olduğunu, ancak konakçı savunma mekanizmalarının bunların kansere dönüşmesini engellediği hipotezini öne sürmüştür. Paul Ehrlich'in hipotezi 1950'lerde ve 1960'larda Lewis Thomas ve Frank Burnet tarafından geliştirilerek bağışıklık sisteminin tümör hücrelerine karşı verdiği antijenik yanıtın kanser immünosürveyans hipotezinin temelini oluşturduğunu varsayılmışlardır (Mittal vd., 2014). Yüzyılın başlarında bu hipotez daha da şekillenerek eliminasyon, denge ve kaçış olarak "3E" ile bilinen kanser immünoedit hipotezine dönüşmüştür. Tümör kitlesi çevredeki normal dokular üzerinde anormal fizyolojik ve metabolik baskı oluşturmaya başladığında bağışıklık sistemi tümörün varlığı konusunda uyarılır. İlk olarak doğuştan gelen sistem aktive olur ve tümör bölgesindeki faaliyetler belirli miktarda tümör hücresi ölümüne neden olur. Hatta T ve B hücrelerini çekmek için enflamatuar bir ortam başlatılır. Sonuç olarak ise temel kanser immünosürveyans hipotezinin ana ilkesi olan tümör eliminasyonu gerçekleşmiş olur (Dunn vd., 2002, 2004a). Bu durumların bir alt kümesinde, bağışıklık sistemi kötü huylu bir grup hücreyi tamamen ortadan kaldıramayacak ve bu hücreler denge halinde var

olacaktır. Son olarak, bu hücrelerin bazıları immün kaçışa uğrayarak nihayetinde klinik olarak önemli kanserlere dönüşecektir (Mittal vd., 2014). Dr. James Allison ve Tasuku Honjo sitotoksik T-lenfosit ilişkili antijen 4 (CTLA-4) ve PD-1 yollarını kontrol noktaları olarak tanımlama ve ayrıca bu kontrol noktalarının inhibisyonunun T hücresi aracılı anti-tümör etkilerini iyileştirdiğini gösterdiği çalışmalarından dolayı 2018 Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü verilmiştir (Wolchok, 2018). İmmün kontrol noktalarının keşfi ve ardından nobel ödüllü immun noktası inhibitörlerinin (ICI) geliştirilmesiyle akciğer kanserinin özellikle de KHDAK'ın terapötik yaklaşımında radikal bir devrim yaratmıştır(Pardoll, 2012). Tümörün konak bağışıklık sisteminden kaçmak için kullandığı bilinen birkaç bağışıklık kontrol noktasından en iyi bilineni ve klinik uygulamada en ileride olanı programlanmış hücre ölümü proteini-1 (PD-1), programlanmış hücre ölümü ligand-1 (PD-L1) ve sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA-4) yolaklarıdır (Mamdani vd., 2022).

2.6.1. Kanser-Bağışıklık Döngüsü

Bağışıklık sistemi yabancı antijenlere ve kendi antijenlerine karşı savunmasını bağışıklık yanıtının aktivasyonu ve inhibisyonu arasındaki uygun bir denge yoluyla sürdürür. Özünde bu süreç antijenler tarafından aktive edilen T hücreleri ile bağışıklık sistemi içindeki çeşitli hücreler arasında reseptör-ligand bağlanmasını içermekte ve bağışıklık yanıtının anti-tümör bağışıklığında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Naidoo vd., 2014). Bağışıklık yanıtı, kendine yönelik tehditlere yanıt veren organizma içi savunma mekanizmasıdır. Bu savunma tepkisi üç aşamada gerçekleşir: tanıma "*recognition*", işleme "*processing*" ve tepki "*reaction*". Organizmanın kendinden olmayan unsurları bağışıklık tepkisinde yer alan hücreler veya aktif moleküller tarafından yabancı maddeler olarak tanınır (Amarante-Mendes vd., 2018; Pulendran vd., 1997). Bu noktada doğuştan gelen bağışıklıkta yer alan hücreler veya aktif moleküller, kendinden olmayan unsurlara ait antijenlerin moleküler modellerini tanır. Bu mekanizmada doğal bağışıklık elemanları olan doğal öldürücü (NK) hücreler, makrofajlar, dendritik hücreler (DC) ve nötrofiller gibi hücrelerin yanı sıra serumdaki kompleman sistemi gibi aktif moleküller bulunmaktadır (Amarante-Mendes vd., 2018). Adaptif bağışıklıkta görev alan lenfositler ve antikorlar ise kendinden olmayan antijenlerin yapısını veya amino asit dizilerini yüksek doğrulukla ayrıntılı olarak tanıma yeteneğine sahiptir. Bulaşıcı hastalıklar veya

kanserle mücadele edebilecek etkili bir bağışıklık tepkisi oluşturmak için, doğuştan gelen bağışıklık sistemi ve adaptif bağışıklık sistemindeki hücreler veya aktif moleküller koordineli bir şekilde etkileşime girmelidir. Her iki sistemden hücreler kanserin erken evresinde uygun şekilde yanıt verdiğinde kanser hücreleri ortadan kaldırılabilir ve doku normal durumuna geri dönebilir (Medzhitov & Janeway, 2002; Pulendran vd., 1997).

2.6.2. İmmun Kontrol Noktası İnhibitörleri

Son yıllarda yeni bir kanser tedavisi paradigması olarak spesifik sitokinlerin, bağışıklık kontrol noktalarına karşı antikorların, CAR-T ve CAR-NK gibi hücre terapilerinin uygulanması dahil olmak üzere çeşitli bağışıklık temelli tedavilerde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu ilerlemeler temel olarak adaptif hücre iletimi ve monoklonal antikorlar kullanılarak T hücrelerinin düzenlenmesi yoluyla immün hücre aktivitesini modüle etme girişimleri olarak özetlenebilir (Hosseinkhani vd., 2020; Marofi vd., 2021). Daha önceki çalışmalar immünoterapötik ilaçların akciğer kanserine yüksek etki göstermemesi nedeniyle akciğer kanserinin bağışıklık sistemimize bağlı olmadığı düşünülmekteydi (Holt vd., 2011). Ancak son araştırmalar, akciğer kanserinin inhibitör sitokinlerin salınması, T hücrelerinin uyarılmasını kısıtlayan kimyasalların azaltılması ve majör histokompatibilite kompleksi (MHC) antijen ekspresyonunun bozulması gibi çeşitli yollarla bağışıklık sisteminden kaçabileceğini göstermektedir (Aktar vd., 2022). Günümüzde ise PD-1/PD-L1, CTLA-4, T hücresi immünoglobulin ve müsin alanı içeren protein-3 (TIM-3), ITIM alanlarına sahip T-hücresi immünoreseptörü (TIGIT) ve lenfosit aktivasyon geni-3 (LAG-3) yolağı bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin temel hedefleri olarak yer almaktadır (Vansteenkiste vd., 2013).

2.6.2.1. CTLA-4

CTLA-4, T hücrelerinin aktivasyonunu düzenleyen ve T hücreleri üzerinde eksprese edilen bir membran reseptörüdür. Yapı olarak B7 ile bağlanır ve CD28 homoloğu olmasına rağmen CD28'den daha yüksek bir bağlanma afinitesine sahiptir (Fallarino vd., 1998). Bununla birlikte B7 ile bağlanması uyarıcı sinyaller üretmez. Aksine inhibitör sinyaller üretir. Oldukça çeşitli mekanizmalarla T-hücre aktivasyonu üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir (Krummel & Allison, 1995; Walunas vd., 1994). Örneğin; karsinogenezin erken aşamalarında tümöre karşı immün yanıtı azaltmak için inhibitör

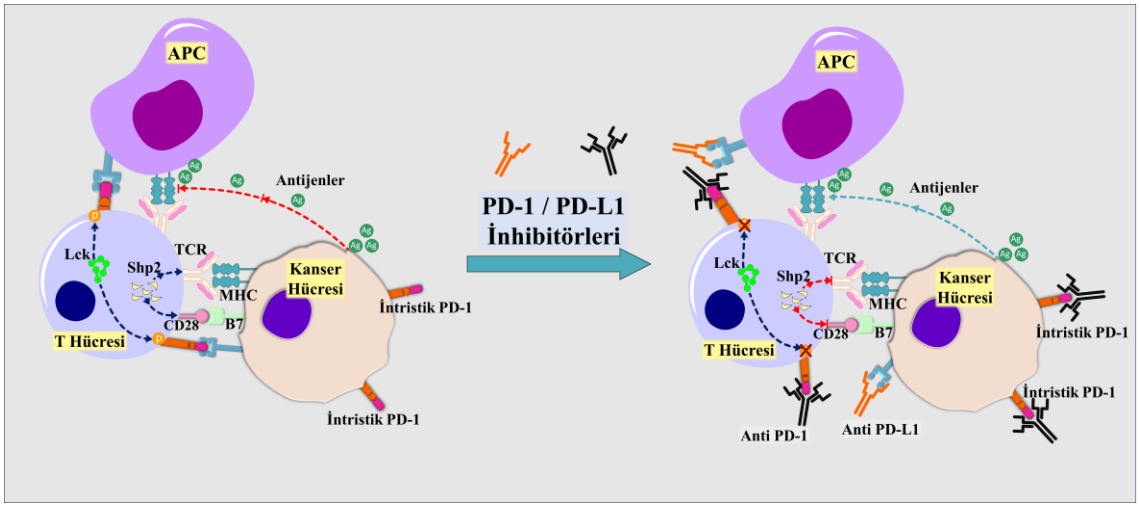
sinyaller üreterek T-hücre aktivasyonunu azaltabilir. Ayrıca CTLA-4, amino asit triptofanı katabolize eden ve sonuç olarak T hücrelerinin çoğalmasını engelleyen indolamin-2, 3-dioksijenazı (IDO) indüklemek için B7'yi aktive edebilir (Boasso vd., 2005; Grohmann vd., 2002). Son araştırmalarda ise CTLA-4 ayrıca PI3K/Akt yolaklarını, siklin D3'ü, sikline bağımlı kinazları (cdk4/cdk6) ve nükleer transkripsiyon faktörlerini (NF-KB) inhibe ederek T hücre aktivasyonuna müdahale edebilmektedir (Parry vd., 2005).

Ipilimumab; CTLA-4 üzerine olan ilgi CTLA-4'ün en tanınmış inhibitörü olan Ipilimumab keşfine giden yolu açmıştır. Ipilimumab, kanser tedavisi için onaylanmış ilk kontrol noktası inhibitörüdür. CTLA-4'ün ligandıyla etkileşimini bloke eden ve böylece CTLA-4'ün T-hücresi düzenlemesi üzerindeki olumsuz etkisini engelleyen yapı itibariyle tamamen insanlaştırılmış bir immünoglobulin monoklonal antikordur (Weber, 2007). Bu mekanizma sayesinde ipilimumab, bağışıklık sistemi ve tümör hücreleri arasındaki bariyeri kırarak tümöre karşı immünojenik yanıtı tetikler. Klinik kullanım açısından KHDAK monoterapisinde başarılı değildir. Bu nedenle paklitaksel + karboplatin gibi antikanser ilaçlarla veya ipilimumab + diğer bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri ile kombine edilmektedir (Cameron vd., 2011; Tomasini vd., 2012). Fakat yan etkileri noktasında çalışmalar hala devam etmektedir. Son araştırmalar anti-CTLA-4 antikorlarının şiddetli ve yaygın bir inflamatuar bağırsak hastalığına neden olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle anti-CTLA-4 tedavisi alan hastaların nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar (NSAID'ler) kullanmaktan kaçınmalarını önerilmektedir (Tarhini, 2013).

2.6.2.2. PD-1/PD-L1

PD-1, bir immünosupresif kontrol noktasıdır ve kronik antijene maruz kalma koşulları altında esas olarak makrofajlar, B lenfositleri, dendritik hücreler (DC'ler), monositler, tümöre özgü aktive T hücreleri, miyeloid hücreler ve doğal öldürücü (NK) hücreler gibi geniş bir yelpazede immün sistem unsurları tarafından eksprese edilir (Daud vd., 2016; Jalili-Nik vd., 2021). PD-L1 ise PD-1'in ligandlarından biridir. PD-L1 ekspresyonunun prognoz ve PD-1/PD-L1 inhibitörlerinin duyarlılığının öngörülmesi için değerli bir biyobelirteç olduğu bilinmektedir. PD-L1 ekspresyonu ise PD-1'den farklı olarak birçok

kanserde esas olarak tümör hücrelerinde, tümör infiltre eden hücrelerde ve antijen sunan hücrelerde (APC'ler) ifade edilmektedir (Nakamura vd., 2021; Zuo & Wan, 2022). Günümüzde, anti-PD-1/PD-L1 antikorunun immünoterapi mekanizmaları nispeten açıklığa kavuşmuştur. Mekanizma içerisinde T hücrelerinin aktivasyonu temel olarak 2 sinyale dayanır (O'Neill & Cao, 2019). ***İlk sinyal***, MHC sunan antijenin T hücre reseptörüne (TCR) bağlanmasından oluşur. ***İkinci sinyal*** ise ko-stimülatör ve ko-inhibitör sinyaller tarafından oluşturulur. T hücreleri üzerindeki PD-1 ile tümör hücreleri veya APC'ler üzerindeki PD-L1 arasındaki etkileşim, T hücresi aktivasyonunu etkili bir şekilde inhibe edebilir ve hatta T hücrelerde apoptotik indüksiyona, sitokin üretiminin azalmasına, T hücresi lizisine ve antijene karşı toleransın indüklenmesine neden olarak tümörün immün gözetimden kaçmasını sağlayabilir. PD-1/PD-L1 inhibitörleri, PD-1 ve PD-L1 arasındaki etkileşimi önlemek için sırasıyla PD-1 veya PD-L1'e bağlanarak immün hücrelerin tanıma ve öldürme etkisi geri yüklenir ve tümör hücrelerinin immün kaçışı önlenir (Schütz vd., 2017). PD-1 aktivasyonu TCR sinyalizasyonunu, CD28 ortak uyarıcı sinyalizasyonunu ve indüklenebilir T hücre ortak uyarıcı sinyalizasyonunu neredeyse tamamen inhibe etmektedir (Okazaki vd., 2001). Son çalışmalar PD-L1 tarafından uyarılan PD-1'in sitoplazmik kuyruğunda bulunan iki tirozin içeren motif Src kinazlar tarafından fosforile edilir. İmmün reseptör tirozin bazlı inhibitör motif (ITIM) ve immün reseptör tirozin bazlı anahtar motifi (ITSM) olarak adlandırılan iki motif daha sonra yakındaki efektör proteinlerden fosfat gruplarını uzaklaştıran SHP2'yi alır ve aktive eder. Sonuç olarak hem sitokin üretiminin hem de T hücresi proliferasyonunun azalması gözlenir ki bu durum T hücresi aracılı immün tepkinin baskılanmasıyla sonuçlanır (Hui vd., 2017; Okazaki vd., 2001) (Şekil 7). Tümör hücreleri, sitotoksik T hücreleri ve APC'ler tarafından tanınmaktan kaçınmak için tümör antijenlerini sunma yeteneklerini kaybedecek şekilde evrimleşmektedir (Leko & Rosenberg, 2020). Son çalışmalar, majör histo-uyumluluk kompleksi sınıf-I ve -II'nin (MHC-I ve MHC-II) tümör antijeni sunumu ve immünosürveyans için gerekli olduğunu göstermiştir. Hatta birçok malignitede, MHC-I/II'nin aşağı regülasyonu anti-PD-1/PD-L1 tedavi yanıtını öngörmekte, immünosupresyon, metastatik progresyon ve kötü prognoz ile ilişkilidir (Burr vd., 2019; Dersh vd., 2021).



Şekil 7. Anti-PD1/PD-L1 immünoterapiye yanıtın temel mekanizmaları. PD-1 esas olarak T hücrelerinde eksprese edilir, bazı tümör hücreleri de intrinsik PD-1 eksprese eder. İmmün kaçış PD-1 ve PD-L1'in etkileşiminden sonra gerçekleşir. PD-1, LCK tarafından tirozin fosfataz Shp2 fosforile edilebilir. Ve sonuç olarak CD28 ve T hücre reseptörü (TCR) işlevini ve sinyal yolunu inaktive eder. Böylece T hücrelerinin aktivasyon sinyalini zayıflatır ve immün kaçışa neden olur. PD-1/Shp2 aracılı inhibitör sinyali sürdürmek için Lck kinaz aktivitesi gereklidir. PD-1/PD-L1 immünokontrol noktası inhibitörlerinin müdahalesi PD-L1 ve PD-1 arasındaki etkileşimi etkili bir şekilde bloke ederek SHP-2'nin aktivasyonunu engeller ve T hücrelerinin bağışıklık fonksiyon sinyali yeniden etkinleştirilir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

-Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit, Sigma/ABD
-Fetal sığır serumu (FBS), Gibco/ABD
-Penisilin-Streptomisin (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco/ABD
-L-glutamin 100X, Gibco/ABD
-Fosfat tuz tamponu (PBS), Thermo Scientific/ABD
-Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640), Gibco/ABD
-0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco/ABD
-Dimetil sülfoksit (DMSO), Gibco/ABD
-Tripan mavisi (%0,5), Gibco/ABD
-Triton X-100, Sigma/ABD
-Alexa Fluor 488 florokrom, Cell Signaling Technology/ABD
-DAPI, Thermo Scientific/ABD
-PD-L1, Cell Signaling Technology/ABD
-Tris Base, Sigma/ABD
-%37 Formaldehit, Sigma/ABD
-Glutamax 100X, Thermo Scientific/ABD
-Hepes, Thermo Scientific/ABD
-Advanced DMEM-F12, Thermo Scientific/ABD
-DMEM-F12, Thermo Scientific/ABD
-Kollojenaz Tip II, Sigma/ABD
-Dispaz Tip II, Sigma/ABD
-Y-27632, Cell Signaling Technology/ABD
-Ficoll-Paque (1.077 g/mL) , Sigma/ABD
-Geltrex, Thermo Scientific/ABD
-Nicotinamide, Sigma/ABD
-N-Acetylcysteine, Sigma/ABD
-B27 supplement, Thermo Scientific/ABD
-bFGF, Thermo Scientific/ABD

-Fitohemaglutinin (PHA), Sigma/ABD

-Atezolizumab-anti-PD-L1, SellectChem/ABD

-HLA-ABC Monoclonal Antibody, Thermo Scientific/ABD

- FITC anti-human CD3 Antibody, Biolegend, ABD

- Alexa Fluor® 700 anti-human CD4 Antibody, Biolegend, ABD

- Anti-human CD8 Antibody, Biolegend, ABD

-CFSE, Thermo Scientific/ABD

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

-25cm2 ve 75cm2'lik flask, Thermo Scientific/ABD

-6 kuyulu plate, Thermo Scientific/ABD

-96 kuyulu flat plate, Thermo Scientific/ABD

-5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Genject

-10µl'lik pipet uçları, Corning/ABD

-100µl'lik pipet uçları, Corning/ABD

-1000µl'lik pipet uçları, Corning/ABD

-Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Millipore/ABD

-Steril santrifüj tüpleri (15ml), Thermo Scientific/ABD

-Steril santrifüj tüpleri (50ml), Thermo Scientific/ABD

-Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham/USA

-Kriyovial, Thermo Scientific/ABD

-2 ml'lik cam pastör pipetler, Isolab/Almanya

-Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab/Almanya

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

-Mikro plaka spektrofotometre, Biotek/ABD

-CO_2 inkübatörü, Panasonic/ABD

-Mikroplate inkübatör ve çalkalayıcı, Heidolph/Almanya

-Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve/Türkiye

-Class II Laminar Flow, Haier/Çin

-Multipipet sistemi, Hamburg/Almanya

-İnvert floresan mikroskop, Olympus/Japonya

-Soğutuculu Santrifüj, Beckman Culture/ABD
-10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Axygen/ABD

3.1.4. Kullanılan Kitler

-ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit
-SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe
-Human IFN-gamma ELISA, Raybiotech
-Caspase-Glo 3/7 Assay System

3.2. Yöntem

3.2.1. Biyoinformatik Analizler

3.2.1.1. Anti PD-L1 Direncinden Sorumlu Yolak ve Genlerin Belirlenmesi

Anti-PD-L1 direnciyle ilişkili genler ve yolaklar için; Mart 2023 tarihine kadar PubMed, Web of Science, Wiley, Taylor and Francis Online ve Elsevier'dan oluşan çevrimiçi veri tabanlarından tarama yapıldı. Makaleler şu anahtar kelimeler kullanılarak arandı: "immune checkpoint resistance", "anti-PD-L1 therapy resistance", "NSCLC immune checkpoint resistance", "NSCLC PD-L1 therapy resistance", "PD-L1 inhibitor", "Atezolizumab", "Avelumab", "Durvalumab". Ayrıca belirlenen veritabanlarda hakemli dergilerde ingilizce olarak yayınlanan makaleler dikkate alınmıştır.

Belirlenen genler ait yolaklar "R" yazılımında 'topGO' ve 'clusterProfiler' paketleriyle gen zenginleştirme ve yolak analizleri kullanılarak belirlendi (G. Yu vd., 2012). Yolak analizleri için "KEEG" ve "GO" veri tabanları kullanılmıştır (Carbon vd., 2019; Kanehisa vd., 2017; Kanehisa & Goto, 2000).

3.2.1.2. TCGA Veritabanından Hasta Gruplarının Seçilmesi

Tez çalışması kapsamında TCGA-LUAD projesine ait KHDAK adenokarsinoma vakaları kullanıldı. Örnek gruplaması yapılırken RNA sekans verisi bulunmayan, ALK, ROS1 yeniden düzenlemeleri ve EGFR mutasyonu taşıyan örnekler çalışmaya dahil edilmedi. ALK ve ROS1 yeniden düzenlemeleri içeren hastalar Kanser Genom Atlası çalışmasının güncel verilerinden belirlendi (Collisson vd., 2014).

EGFR, KRAS ve p53 mutasyon durumları ise KHDAK'i adenokarsinoma vakalarının VarScan2 dosyalarının R'da "maftools" aracı kullanılmasıyla belirlendi (Mayakonda vd., 2018). Analiz sonucunda EGFR mutasyonu taşıyan hasta örnekleri seçilerek çalışmadan çıkarıldı. Ayrıca maftools aracı ile KRAS mutasyon konumları ve hangi hastanın KRAS mutasyonu taşıdığı belirlendi. Son olarak kalan örnekler ise gösterildiği gibi KRAS ekzon 12 ve p53 mutasyon durumlarına göre "Edwards-Venn" (Hamburger, 2005)yöntemi kullanılarak gruplandırıldı. Bu sayede her iki mutasyonuda taşıyan gruplar belirlendi.

3.2.1.3. Diferansiyel Gen Ekspresyonu (DGE)

TCGA veritabanından mutasyon durumlarına göre belirlenen vakaların RNA sekans ham verileri DGE analizinde kullanıldı. Gruplar arasında farklı eksprese edilmiş genler "R" yazılımı altında ve "DESeq2" paketi kullanılarak analiz edildi (Love vd., 2014). Analiz sonucunda istatistiksel anlamlılık <0.05 FDR q değeri kullanılarak tanımlandı. DGE analizi; tüm mutant grupların kendi içerisinde KRASWT p53WT grupla karşılaştırılmasıyla yapılmış ve anti-PD-L1 direnciyle ilişkili belirlenen gen setimiz taranmıştır. Analiz sonucu gruplar içerisindeki ortak genler venn şeması kullanılarak görselleştirildi. Bu sayede KRAS ve p53 ko-mutasyonuna bağlı gelişen genler görülebilmektedir.

3.2.2. Hasta Örneklerinin Temini ve Karakterizasyonu

3.2.2.1. KHDAK Hastalarının Tanısı ve Biyopsi/Kan Örneklerinin Temini

Tez çalışması kapsamında yapılan tüm çalışmalar Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 2011-KAEK-26/603 sayılı ve 2021-14/22 nolu kararı gereğince yapılmaktadır. Tez çalışması kapsamında doku örneklerinin kullanılacağı hastaların dahil edilme ve edilmeme kriterleri aşağıda belirtilmiştir.

Gönüllülerin çalışmaya dahil edilme kriterleri;

- Akciğer kanseri tanısı almış olması
- 30 yaşın üzerinde olması
- Neoadjuvan tedavi almamış olması
- Radyoterapi almamış olması
- Operasyon geçirmemiş olması

- Yapılması planlanan çalışmalar ile ilgili açıklamaları içeren gönüllü olur formu ile bilgilendirilerek onayı alınmış olması

Gönüllülerin çalışmaya dahil edilmeme kriterleri;

- Benign akciğer tümörüne sahip olması
- 30 yaşın üzerinde olmaması
- Neoadjuvan tedavi almış olması
-Radyoterapi almış olması
- Operasyon geçirmiş olması
- Sigara/alkol kullanıyor olması

Dokuların temini Girişimsel Radyoloji Birimi'ndeki Bilgisayarlı Tomografi (BT) cihazı eşliğinde perkütan transtorasik kesici iğne (tru-cut) biyopsi işlemi ile alınmıştır. Hastalara ilk tanı Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Bölümü tarafından konularak kitleler biyopsi işlemi öncesinde parankiminde görüntüleme yöntemleri ile tespit edilmiştir. Tüm işlem hasta refahı açısından daha az travmatik ve daha güvenli olan 20 gauge (G), kitlenin parankimdeki derinliğine göre 10cm-15cm ya da 20cm uzunluğundaki ko-aksiyel yarı otomatik biyopsi iğneleri ile lokal anestezi altında gerçekleşmiştir. Ayrıca sonrasında aynı taraf akciğerin sağlam olan farklı bir lobundan ya da segmentinden aynı yöntemlerle normal akciğer parankim biyopsi işlemi gerçekleştirildi. Bu sayede her hastadan sağlıklı biyopsi doku örnekleri de alınmıştır. Alınan doku örnekleri 50 µg/ml Primosin içeren 1xPBS içerisinde ileri analizlerin yapılacağı BUMKAL'a (Bursa Uludağ Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvarı) gönderildi. Ayrıca her hastadan kan örnekleri de alınmıştır. Yapılan uygulamalar tüm adenokarsinoma hastalarının teşhis ve tedavi protokollerindeki rutin uygulamalardır (SUT karşılığı mevcuttur). Bu tez çalışması için hastalara ayrı bir uygulama veya girişim yapılmamıştır. Çalışma rutinde alınacak biyopsi örneklerinin bir kısmıyla gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.2. Histopatolojik ve Mutasyon Durumuna Göre Sınıflandırma

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarlarında akciğer kanseri ön tanısı/tanısı konulan vakaların histopatolojik sınıflandırmaları rutin olarak yapılmaktadır. Ayrıca Tıbbi Genetik Laboratuvarlarında akciğer kanseri ön tanısı/tanısı konulan vakaların EGFR, KRAS ve p53 mutasyon durumlarına rutin olarak bakılmakta

ve raporlanmaktadır. Alınan örnekler bölüm 3.3'de açıklandığı gibi ex-vivo kültür işlemine tabi tutuldu. Kültürün 7-10. gününde biyopsi örneklerinin alındığı hastalara ait raporlar taranarak histopatolojik ve mutasyon durumlarına göre sınıflandırma yapıldı.

3.2.2.3. Ekstraselüler PD-L1 İmmünfloresan Boyama

PD-L1 tespiti için kullanılan antikorlar PD-L1 sitoplazmik bölgesini veya hücre dışı bölgesine bağlanarak tanılama yapmaktadır. Tez çalışması kapsamında kullanılan antikor ise epitopik olarak PD-L1'ın hücre dışı alanını hedeflemektedir. Bu sayede membran PD-L1 düzeylerinin tespiti için uygun olmaktadır (Tameishi vd., 2021; C. Tanaka vd., 2021). Bölüm 3.3'de açıklanan enzimatik parçalama aşamasından sonra hücreler %4 formaldehit solüsyonu ile pozitif şarzlı lamlar üzerine sabitlendi. Her lam için $20x10^3$ hücre kullanıldı. %4 formaldehit ile 15 dakikalık inkübasyon sonrasında lamlar 3x5 dakika olacak şekilde 1X PBS ile yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında lamlar %100 saf metanol içeren cam şalelere yerleştirilerek karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında lamlar 3x5 dakika olacak şekilde 1X PBS ile yıkandı. Lamlar %5 keçi serumu, %0,3 Triton X-100 içeren bloklama tamponu ile 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Bloklama tamponu ortamdan uzaklaştırılarak 1:200 oranında %1 BSA ve %0.3 Triton X-100 içeren 1X PBS içerisinde hazırlanan PD-L1 birincil antikoru ile lamlar gece boyunca 4°C'de inkübasyona bırakıldı. Birincil antikor inkübasyonu sonrasında lamlar 3x5 dakika olacak şekilde 1X PBS ile yıkandı ve Alexa Fluor 488 florokrom bağlı ikincil antikorun 2 saat boyunca oda sıcaklığında bağlanması sağlandı. 1X PBS ile yıkama sonrasında DAPI içeren bağlayıcı tampon solüsyonundan lamlar üzerine 10 µl eklenerek lameller ile kapatıldı. PD-L1 birincil antikoru floresan mikroskobun 359nm (excitation)-461nm (emission) ve DAPI ise 499nm (excitation)-520nm (emission) dalga boyu aralığındaki filtre ile görüntülendi. Ayrıca Image-J yazılımı kullanılarak yeşil (PD-L1) floresan ışıma yoğunluğu ölçülerek kantitatif değerlendirme yapılmıştır.

3.2.2.4. ALK, ROS1 Yeniden Düzenlemelerinin FİSH Yöntemiyle Analizi

ALK ve ROS1 translokasyonları için FISH analizleri rutin hasta takibi için yapılmaktadır. Bu nedenle hasta raporları takip edilerek listelendi. Sadece 10 hastanın rutin hasta takibinde ROS1 FISH analizleri yapılmamıştır. İlk olarak Örnek hazırlama ön işlem basamakları için "ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit" kullanıldı. Analizlerle

hazır hale getirilen örnekler ise "SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe (ZYTOVİSİON)" kiti kullanılarak ROS1 FISH analizleri gerçekleştirildi. FISH analizleri öncesinde ilk olarak çizelge 1'de belirtilen solüsyonlar hazırlandı.

Çizelge 1. FISH analizleri için kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışları

Kullanılan Solüsyonlar	**Solüsyonların hazırlanması**
TBS Yıkama Tamponu	200 mM Tris Baz ve 1500 mM NaCl, pH 7,6 olacak şekilde distile su içerisinde hazırlandı.
%1 Formaldehit	2.7 ml %37 Formaldehit solüsyonu 1X Ca^{+}-Mg^{+} içeren 1X PBS ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

-Proteoliz / Fiksasyon

Bölüm 3.3'de açıklanan enzimatik parçalama aşamasından sonra $5x10^4$ hücre lamlar üzerine 20µl olacak şekilde eklendi ve aşağıdaki işlem basamakları takip edildi.

- 40 µl Cytology Pepsin Solution eklenerek 37°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Lamlar 1x TBS yıkama solüsyonu içerisinde 5 dakika inkübe edildi.
- Yıkama aşaması sonrasında %1 Formaldehit solüsyonu içinde 5 dakika inkübe edildi.
- 1 dakika aralıklarla %70, %90 ve %100 etanol ile yıkanan lamlar kurutuldu.

-Denatürasyon ve Hibridizasyon

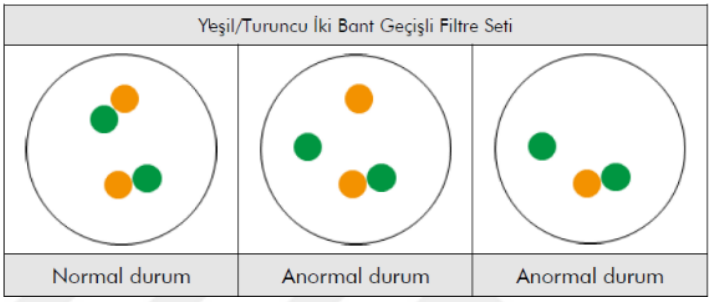
- Ön işlemi yapılmış her bir örneğin üzerine 10 µl prob pipetlendi.
- 22 mm x 22 mm boyutlarında bir lamel ile kapatılarak Fixogum ile yalıtım sağlandı.
- Hazırlanan preparatlar 72°C'de 5 dakika denatüre edildi.
- Örnekler son olarak etüvde 37°C'de gece boyu inkübe edilerek hibridizasyon sağlandı.

-Görüntüleme Öncesi

- Dikkatlice açılan lameller 70°C'ye ısıtılan "Cytology Stringency Wash Buffer" içinde 2 dakika yıkandı.
- Lamlar Sitoloji yıkama solüsyonu ile ayrıca 1 dakika yıkandı.
- Lamlara pipetle 25 µl DAPI/DuraTect-Solüsyonu eklenerek 24 mm x 60 mm lamel ile kapatıldı.

-Sonuçların Değerlendirilmesi

- Normal hücrelerin veya ROS1 gen bölgesini içeren bir translokasyonu olmayan hücrelerin interfazlarında iki yeşil/turuncu birleşik sinyal görülür. Bir translokasyondan etkilenmiş bir ROS1 gen bölgesi ayrı bir yeşil sinyal ve ayrı bir turuncu sinyal ile belli olur. İzole yeşil sinyaller ROS1 kırılma noktası bölgesinin distalindeki delesyonların sonucudur ya da bu kromozom bölgesini etkileyen dengesiz translokasyonlardan meydana gelir (Şekil 8).



Şekil 8. ROS1 FİSH Sonuçlarının Değerlendirilmesi

3.3. Ex-Vivo Organoid Ko-Kültür

3.3.1. Biyopsi Örneklerinde Enzimatik Parçalama

Alınan biyopsi örnekleri içerisinde 2 ml besiyeri bulunan (1X Glutamax, 10mM Hepes, 100 U/mL Penisilin-Streptomisin içeren Advanced DMEM/F12) steril petri üzerine alınarak 22 nolu bistüri yardımıyla 1-2 mm3 boyutunda parçalara ayrıldı. Örnekler 15ml' lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Ayrıca petri içeriği besiyeri ile yıkanarak aynı santrifüj tüpüne aktarıldı. Oda sıcaklığında 200xg hızda 5 dakika santrifüj sonrası süpernatant atılarak pellet üzerine doku parçalama solüsyonu (çizelge 2) eklenerek ısıtıcılı orbital çalkalayıcıda 100rpm hızda ve 37°C'de 30-60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Tip II Kollojenaz, Tip II Dispaz, olası kontaminasyonu önlemek için Penisilin-Streptomisin ve Rock inhibitörü (Y-27632) çizelge 2'de belirtiği şekilde hazırlanarak alikotlandı ve -20°C'de saklandı. Her doku örneği için belirtilen hacimler 8.5ml 1x PBS içerisine eklenerek doku parçalama solüsyonu hazırlandı. Enzim aktivitelerinin zamanla azalmasını engellemek amacıyla -20°C'de saklanan alikotlar kullanılarak her doku örneği için taze doku parçalama solüsyonu hazırlanmıştır.

Çizelge 2. Doku parçalama solüsyonunun hazırlanması

1ml Kollojenaz Tip II	%0,2 (w/v) BSA (bovine serum albümin) içeren 1x PBS içerisinde 15mg/ml konsantrasyonunda çözüldü ve PES (0,22 µm) filtre ile filtre edilerek alikotlandı.	Tüm bileşenlere 8,5 ml 1x PBS eklenerek enzim çözeltisi hazır duruma getirildi.
500 µl Dispaz Tip II	ddH2O (Nuclease-Free) içerisinde 10 mg/mL konsantrasyonunda çözüldü ve PES (0,22 µm) filtre ile filtre edilerek alikotlandı.	
Penisilin-Streptomisin	100 U/mL olacak şekilde eklendi.	
10 µl Y-27632	50mg/ml konsantrasyonda ticari olarak satın alındı. DMSO içerisinde 10mM konsantrasyonunda çözülerek hazırlandı.	

Doku süspansiyonun parçalandığının gözlendiği anda enzim inkübasyonu sonlandırıldı. İnkübasyon süresi sonunda tripan mavisi ile boyanarak hemositometre ile mikroskop altında tek hücre süspansiyon durumu kontrol edilerek doğrulandı. Tek hücre süspansiyonunun elde edildiği doğrulandıktan sonra enzim aktivasyonu durdurmak amacıyla enzim çözeltisine 2 ml ısı ile inaktive edilmiş FBS (“heat inactivation of FBS”) eklendi. Hücre popülasyonunda bulanan kan hücreleri ileri analizlerin sonuçlarında hassasiyeti etkileme potansiyeli bulunmaktadır. Bu nedenle enzimatik parçalama işlemi sonrasında tümör hücreleri “Ficoll-Paque (1.077 g/mL)” kullanılarak yoğunluk gradyanına bağlı olarak kan hücrelerinden ayrıştırıldı. Bu amaçla 15 ml hacimli santrifüj tüpüne önce 3ml Ficoll solüsyonu ve üzerine çizelge 3’de açıklanan besiyeriyle sulandırılan 4 ml hücre süspansiyonu eklendi. Ficoll ve hücre süspansiyonunu birbirleriyle karıştırmadan oda sıcaklığında 400xg hızda 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası yoğunluk farkına göre kan hücreleri, Ficoll, ve hücre süspansiyonu ayrıldığı için santrifüj tüpünün en altında bulunan hücre pelleti dikkatlice alınarak ileri analizler için kullanıldı. Tek hücre süspansiyonları %0,4 Tripan mavisi ile boyanarak hemositometrede sayıldı ve canlı hücre oranları analiz edildi. (Boyayı almayan hücre sayısı / Toplam sayılan hücre sayısı) * 100 formülü kullanılarak canlı hücre oranı belirlendi.

3.3.2. Periferal Kandan Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu (PBMC)

Sağlıklı bireylerden alınan (EDTA'lı mor kapaklı tüp içerisinde) periferik kanlar 1:1 oranında RPMI 1640 ile seyreltildi. 15ml'lik falkonun dibine 3mL ficoll (1.077 g/ml) konulduktan sonra seyreltilmiş olan periferik kan yavaş bir biçimde ficoll üzerine yayıldı. Yayılan kan 2500 rpm'de 25 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda ficoll ile plazma arasında kalan periferik kan mononükleer hücreler eritrositlerin alınmamasına dikkat edilerek pastör pipeti yardımı ile toplandı. Toplanan hücreler 15ml'lik falkonda toplandı ve üzerine falkon tam dolacak şekilde 1X PBS eklenerek 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı. Süpernatant atıldı ve PBMC hücreleri 1mL RPMI 1640 içinde süspanse hale getirildi. Son olarak PBMC'ler %0.4 Tripan mavisi ile hemositometrede sayılarak hücre canlılıkları ve sayıları kontrol edildi.

3.3.3. Organoid Ex-Vivo Kültür

Organoid ex-vivo kültür Geltrex (ThermoFisher, Kat. No: A1413202) kullanılarak hanging-drop yöntemiyle 3 boyutlu olarak gerçekleştirildi. Geltrex ticari olarak satın alındı ve 100 µl'lik alikotlar halinde -20ºC'de saklandı. Enzimatik parçalama öncesinde alikotlar organoid kültür aşamasına kadar 4ºC'ye alınarak sıcaklık dengesine ulaşması sağlandı. Enzimatik parçalama sonrasında hücreler tripan mavisi kullanılarak neubauer hemositometrede sayıldı. 1 µl'de 1.5×10^2 hücre olacak şekilde 100 µl hücre süspansüyonu (2x organoid besiyeri içerisinde) 100 µl Geltrex ile dikkatlice köpük oluşturulmadan karıştırıldı. 6 kuyucuklu hücre kültür kabına ~20 µl olacak şekilde geltrex-hücre karşımı damlacık şeklinde eklendi. Kültür kabı baş aşağı şekilde 30 dakika boyunca 37 °C' de inkübatörde inkübasyona bırakılarak Geltrex'in katılaşması sağlandı. İnkübasyon süresi sonunda 6 kuyucuklu hücre kültür kabı normal konuma getirilir ve 1 ml organoid besiyeri (1x) eklendi (Çizelge 3).

Çizelge 3. KHDAK adenokarsinom hücreleri büyüme besiyeri bileşenleri (Cattaneo vd., 2020; Dijkstra vd., 2018)

Besiyeri Bileşenleri	**Stokların Hazırlanması**	**Son Konsantrasyonları**
Advanced DMEM/F12	-	-
Piromisin	50 mg/ml konsantrasyonda ticari olarak temin edildi	50 µg/ml
Hepes	1mM konsantrasyonda ticari olarak temin edildi	10 mM
GlutaMax	100x konsantrasyonda ticari olarak temin edildi	1x
Nicotinamide	1X PBS içerisinde 1M konsantrasyonda hazırlandı.	5 mM
N-Acetylcysteine	1X PBS içerisinde 1M konsantrasyonda hazırlandı.	1,25 mM
B27 supplement	50x konsantrasyonda ticari olarak temin edildi	1x
Y-27632	DMSO içerisinde 10mM konsantrasyonda hazırlandı.	5 µM
bFGF	1X PBS ile 100 µg/mL konsantrasyonda hazırlandı.	10 ng/ml
Noggin	-	100 ng/ml
R-Spondin-1	-	500 ng/ml

Besiyeri değişimi 3 günde bir olacak şekilde yapıldı. Mikroskop altında yapılan incelemede hücre koloni yapıları 300 µm boyutuna ulaşana kadar kültür devam ettirildi. Akciğer kanseri dokuları stromal elementler açısından zengindir ve fibroblast kirliliğinin ortadan kaldırılması başarılı akciğer kanseri hücre kültivasyonunun anahtarıdır (Z. Li vd., 2020). Serum içeren besiyerleri fibroblastların büyümesini desteklediği için kültivasyonun ileri aşamalarında gerekli hücre popülasyonunun saflığı değişmektedir (Seo vd., 2013). Tüm hücre kültürü aşamalarında kullanılan besiyeri serum içermediğinden uzun süreli kültür işleminden sonra fibroblastların eliminasyonu sağlanabilmiştir. Bu nedenle geltrex içerisinde tümöroid yapıları 300 µm boyutuna

ulaşınca (yaklaşık 12-15 günlük kültür işlemi sonunda) pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Tümöroid yapıları pasajlanarak geltrex ile 3d kültür basamağı tekrar edildi. Hücre pasajlama sonrasında tümöroid yapıları 300 µm boyutuna ulaşınca ileri analizlerde kullanıldı. Toplam yaklaşık 25-30 günlük 3d kültür işlemi sonunda kanser hücreleri dışında ortamda bulunan fibroblastların eliminasyonu sağlandı.

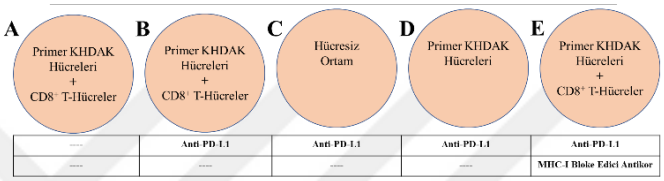
3.3.4. Organoid Primer KHDAK'i Hücrelerinin Ko-Kültür İçin Hazırlanması

İlk pasaj sonrası oluşan Geltrex matriks yapıları çözülerek tümöroid yapılarından tek hücre süspansiyonları elde edildi. Fakat hücreler ko-kültür aşamalarında kullanılmadan önce 2 boyutlu ortamda büyütülerek proliferasyon durumları incelendi. Bu sayede 3d kültür sonrasında hücrelerin proliferasyon yetenekleri test edilerek ko-kültür aşamasında hücre proliferasyonundan kaynaklı yanlış değerlendirmelerin önüne geçilmiştir. Bu amaçla tek hücre süspansiyonları 96 kuyucuklu hücre kültür kabına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 9 grup ve her grup 6 tekrarlı olacak şekilde ekildikten sonra 37 °C %5 CO2 içeren şartlandırılmış atmosfer ortamında inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İlk grup kontrol olarak kullanıldı ve hücre ekiminden 3 saat sonra (Hücrelerin kültür kabının zeminine yapışması için fırsat tanındı) hücre canlılık ölçümü yapıldı. 2. grup kültür işleminin 12. saatinin sonunda, 3. grup 24. saatin sonunda olacak şekilde her grubun 12 saat arayla hücre canlılık analizi yapıldı. Hücre canlılık analizleri bir önceki iş paketinde açıklandığı gibi ATP hücre canlılık testiyle luminometrik olarak gerçekleştirildi. (Kontrol RLU – Kör RLU) / (Farklı zaman aralıklarında ölçülen RLU Değerleri – Kör RLU) formülü kullanılarak kontrole kıyasla proliferasyon indeksi hesaplandı.

3.3.5. Primer KHDAK'i Hücreleri ve T Hücre Ko-Kültürü

$1x10^7$ PBMC hücresi, 5 mL FBS içermeyen RPMI 1640 içinde süspanse edildi. Üzerine 0.5 µl CFSE (1µM) eklendi ve hafifçe vortekslendi. 15 dk 37^{o}C sıcaklıkta inkübe edildi. Üzerine 7 mL soğuk tam RPMI 1640 eklendi ve 5 dk buz içerisine gömülerek bekletildi. +4^{o}C ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj sonrasında RPMI 1640 ile hücrelere bağlanan CFSE'nin inaktivasyonu gerçekleştirildi. Hücreler 100 µl'de $1x10^5$ hücre olacak şekilde RPMI 1640 ile süspanse edildi. T hücre uyarımı 100 µl'de 1 µl olacak şekilde Fitohemaglutinin (PHA) ile gerçekleştirildi. PHA stimülasyonu yaygın bir T hücresi

mitojenidir ve hücre aktivasyonunu ve hücre bölünmesini teşvik etmek için T hücre zarındaki glikosile moleküller gibi çeşitli mitojen reseptörlerine bağlanabilen ekzojen bir lektindir (O'flynn vd., 1986). Ko-kültür çalışmalarından 24 saat önce U tabanlı 96'lı hücre kültür kabına ekilmiş olan KHDAK hücreleri üzerine 0,0625:1 (1=1x10^5 hücre) oranında PBMC'ler ekildi. Tüm işlemler karanlık ortamda gerçekleştirildi. İlaç uygulaması ise anti-PD-L1'ın (SelleckChem, Atezolizumab-anti-PD-L1, A2004) 20 µg/ml konsantrasyonu (Deng vd., 2016; Zheng vd., 2017) uygulanarak gerçekleştirildi. 96 saat süreyle 37°C'de %5 CO_2 içeren şartlandırılmış ortamda inkübasyon sonunda şekil 9'da açıklanan gruplar için ileri analizler gerçekleştirildi.



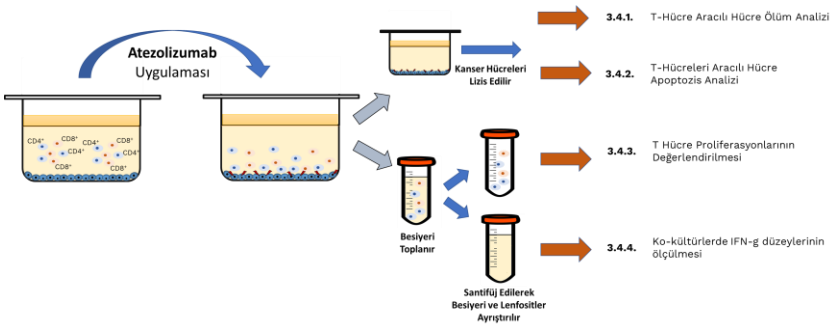
Şekil 9. Ko-kültür grupları. (**A**) Kontrol, (**B**) Tedavi Grubu, (**C**) Kör (Blank), (**D**) anti-PD-L1 uygulamasının hücreler üzerindeki toksik etkisinin olmadığını göstermek için, (**E**) Spesifik olmayan tümör hücresi ölümünün gözlenmesi için 150 µg/ml HLA-ABC uygulaması

Ayrıca ko-kültür ortamındaki artan hücre oranlarının olduğu koşullarda besin maddeleri için rekabet nedeniyle spesifik olmayan tümör hücresi ölümü olabilmesi olasılık dahilindedir. Bu etkiyi farklı hücre oranları ile ko-kültür deney planını yaparak alınan sonuçlara göre analiz edebileceğimiz gibi, MHC sınıf-I bloke edici antikorların (HLA-ABC Monoclonal Antibody, ThermoFisher) varlığında ve yokluğunda olmak üzere ek bir kontrol grubu da yapılmıştır. Bu sayede T hücre kaynaklı hücre ölümünün hesaplanmasında HLA-ABC varlığında ve yokluğunda olacak şekilde karşılaştırmalı olarak analiz sonuçları değerlendirilmiştir. Ve bu sayede deneysel verilerin doğruluk oranları arttırılmaya çalışıldı (Cattaneo vd., 2020).

3.4. Hücresel Analizler

Hücresel analizler için deney grupları arasındaki varyasyonları minimuma indirmek amacıyla tüm analiz süreçleri 12 tekrarlı tek bir süreç içerisinde gerçekleştirilmiştir. Örneğin ex-vivo ko-kültür öncesi 3 boyutlu olarak büyütülen ve çoğaltılan primer kanser hücreleri U tabanlı 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 12 tekrarlı olacak şekilde ekildi.

Ko-kültür ortamına atezolizumab uygulaması sonucu her kuyuda bulunan besiyeri toplanarak şekil 10'da açıklandığı üzere ileri analizlerde kullanıldı. Adherent olan kanser hücreleri ise lizis edildi ve hücre lizatı bölüm 3.4.1 ve 3.4.2'de kullanıldı.



Şekil 10. Hücresel analizlerin iş akış algoritması

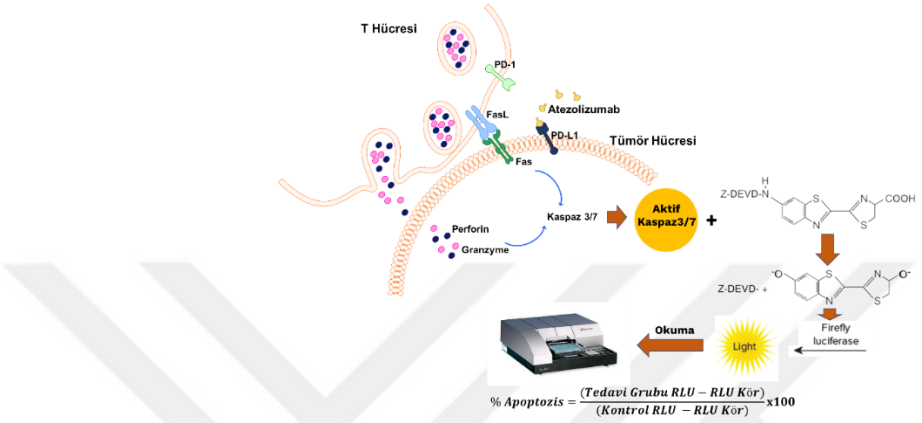
3.4.1. T-Hücre Aracılı Hücre Ölüm Analizi

Ko-kültür işlemi 12 tekrarlı olacak şekilde uygulandı. Kanser hücreleri adherent ve T hücreleri süspanse (non-adherent) hücreler oldukları için ko-kültür işlemi sonrasında U tabanlı 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarının her kuyusundan besiyerleri toplandı. 50 µl 1x DPBS ile kuyular dikkatlice yıkanarak besiyerlerinin toplandığı tüplere alındı. Toplanan besiyerleri aynı gün içerisinde bölüm 3.4.3 ve 3.4.4'de açıklanan analizlerde kullanıldı. Besiyerleri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra tüm kuyulara 100 µl hücre lizis tamponu eklenerek hücreler lizis edildi. 50 µl hücre lizatı ATP hücre canlılık analizi için, kalan 50 µl hücre lizatı ise 3.4.2'de açıklanan "Apoptozis Analizi" için kullanıldı. ATP hücre canlılık analizleri için hücre lizatları 50 µl/kuyu başına olacak şekilde luminometrik okumalara uygun beyaz 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına pipetlendi. Kit içerisinde bulunan lusiferin-lusiferaz kompeksinden tüm kuyulara 50 µl pipetlendi ve "Biotek MultiMod Microplate Reader" cihazının luminometre özelliği kullanılarak okumalar yapıldı. Okumalar sonrası elde edilen RLU (relative luminescence units) değerleriyle; %Hücre Canlılığı= [(RLU Örnek – RLU Kör)/(RLU Kontrol – RLU Kör)]*100 formülü kullanılarak hücre canlılığı hesaplandı.

3.4.2. T-Hücre Aracılı Apoptozis Analizi

Bölüm 3.4.1'de lizis edilen hücre lizatı kullanılarak "Caspase-Glo 3/7 Assay System" kiti ile luminometrik temelli kaspaz-3/7 aktivitesi analiz edildi. Kit içerisinde proluminesan

bir kaspaz-3/7 DEVD-aminolusiferin substratı içermektedir. Hücre lizatı üzerinde eklenen substrast solüsyonu ortamda bulunan kaspaz-3/7 aktivitesine bağlı olarak DEVD fragmanlarından kesilir ve ürün olarak serbest amino lusiferin oluşur. Solüsyon içerisinde bulunan lüsiferaz enzimi ise serbest amino lüsiferin ile kaspaz-3/7 aktivitesi ile orantılı bir lüminesan sinyal üretir (Şekil 11).



Şekil 11. Kaspaz-3/7 aktivitesinin luminometrik olarak ölçülmesi

Kaspaz-3/7 aktivasyon analizleri için hücre lizatları 50 µl/kuyu başına olacak şekilde luminometrik okumalara uygun beyaz 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına pipetlendi. Kit içerisinde bulunan caspase-3/7 DEVD-aminolusiferin substratından tüm kuyulara 50 µl pipetlendi ve "Biotek MultiMod Microplate Reader" cihazının luminometre özelliği kullanılarak okumalar yapıldı. Okumalar sonrası elde edilen RLU ("relative luminescence units") değerleriyle; %Apoptotik Aktivite= [(RLU Örnek – RLU Kör)/(RLU Kontrol – RLU Kör)]*100 formülü kullanılarak hücre canlılığı hesaplandı.

3.4.3. T Hücre Proliferasyonlarının Değerlendirilmesi

Atezolizumab uygulaması sonrası ko-kültür ortamından toplanan besiyeri ile T- hücre proliferasyonlarının değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Toplanan süspanse faz (besiyeri) 1800 rpm 5 dk santrifüj sonrası pellet 1x PBS ile tekrar süspanse edildi. Akım sitometri sisteminde ilk olarak CFSE boyanması gerçekleştirilen PBMC'lerde total proliferasyon değerlendirilmiştir. CD3, CD4 ve CD8 antikor uygulamaları (10ug/mL) sonrası ise T hücre proliferasyonları değerlendirilmiştir. Alınan sonuçlar sağlıklı kontrol gruplarına göre normalize edilerek yüzde değişimler hesaplanmıştır. Ayrıca antikorların

farklı dalga boyu konjugatları kullanılarak saçılım spektrumlarının (emission ve excitation) çakışmamasına dikkat edildi.

3.4.4. Ko-kültürlerde IFN-γ düzeylerinin ölçülmesi

Bölüm 3.4'de açıklandığı gibi tedavi süresi sonunda besiyeri toplanarak santrifüj edildi. Süpernatant IFN-γ ELISA testi (Human IFN-gamma ELISA, Raybiotech) için kullanıldı. 50 µl örnekler, standartlar ve kontroller ilgili kuyulara eklendi. Standartlar 15000, 5000, 1666.70, 555.60, 185.20, 61.70, 20.60 pg/ml olacak şekilde pipetlenerek standart eğri grafiği oluşturuldu. Tüm örneklere 50 µL biyotin konjugat çözeltisi (hIFN-g) eklendi ve 90 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kuyular aspire edildi ve 4 kez 1x yıkama tamponu ile yıkandı. Yıkama sonrası kuyular kurutularak her kuyuya 100 µL 1x Streptavidin-HRP çözeltisi eklendi ve 45 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. HRP inkübasyonu sonrası kuyular tekrar 4 kez yıkandı ve sonrasında 100 µL stabilize kromojen solüsyonu eklendi. 30 dakika inkübasyon sonrası maviden sarıya renk değişimi gözlendikten sonra 100 µL durdurma solüsyonu eklenip 450 nm dalga boyunda mikroplaka spektrofotometrede okumalar yapıldı. Okuma sonrası standart eğri grafiğine göre IFN-γ seviyeleri belirlendi.

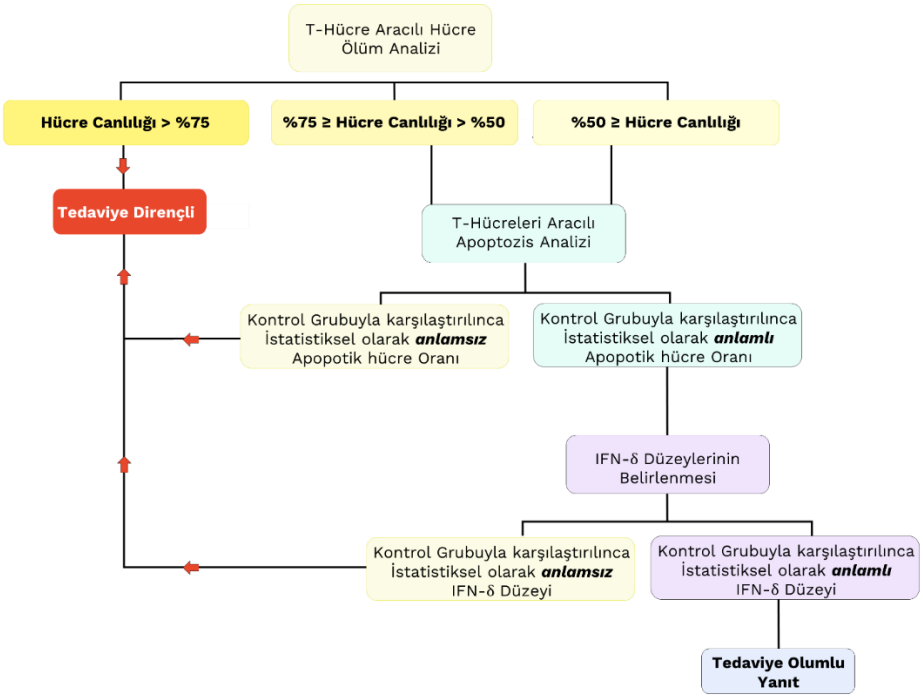
3.5. Tedavi Yanıtına Göre Sınıflandırma

Sitotoksisite analizleri, Kaspaz-3/7 aktivasyonları ve IFN-γ seviyelerindeki değişimlerin arasındaki korelasyonlar test edildi ve şekil 12'de belirtilen algoritma kullanılarak tedaviye dirençli veya hassas olan gruplar belirlenmeye çalışıldı. Hücre canlılık sonuçları ilk basamağı oluşturmaktadır. %75'in üzerinde hücre canlılığının gözlenmesi o grubun tedaviye dirençli olabileceğini düşündürmektedir. Devam eden basamaklarda ise kaspaz-3/7 aktivasyonu ve IFN-γ seviyeleri kriter olarak alınmıştır. Ko-kültür ve ko-kültür + Atezolizumab deney grupları arasında istatistiksel olarak (Tek Yönlü Anova) anlamlı değişimlerin gözlenmesi tedaviye yanıt olarak değerlendirilerek tedavi yanıtına göre sınıflandırma yapılmıştır. Sitotoksik T hücreleri patojenle enfekte olmuş veya konak içerisindeki yabancı hemen hemen her hücreye saldırması ve onu yok etmesiyle karakterize bir davranışları bulunur. Sitotoksik T lenfositleri, litik proteinlerin (perforin, granzimler) ekzositozu ve Fas/APO moleküllerinin reseptör-ligand bağlanması dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla hedef hücrelerin parçalanmasına aracılık eder. Her

iki mekanizmada hedef hücre içerisinde apoptototik hücre ölümünü indükeleyerek gerçekleşmekte ve ölüm yolağı temelde efektör kaspazların aktivasyonlarında kesişmektedir. Ayrıca aktive edilmiş $CD8^+$ T hücreleri tarafından hücre dışı ortama büyük miktarlarda IFN-γ salınımı gerçekleşir (Arany vd., 1998; Villegas-Mendez vd., 2011). IFN-γ hedef hücrelerde T hücre aracılı ölümü düzenleyerek T hücresi aracılı sitotoksisiteyi belirgin şekilde artırarak doğrudan ölümü teşvik etmektedir.

Sonuç olarak bakıldığında T hücre kaynaklı sitotoksisite beraberinde kaspaz-3/7 aktivasyonunu ve artan düzeyde IFN-γ'yı beraberinde getirmektedir. Bu nedenle farklı hücresel analiz sonuçları arasında pearson korelasyon analizleri yapılarak algoritmanın doğruluğu arttırılmıştır. Hücresel analiz sonuçlarından "SummarizedExperiment" paketi kullanılarak "R" yazılım platformu altında veri matrisleri oluşturuldu. Oluşturulan veri matrisleri aşağıda açıklanan gruplar arasında "GGally" paketi kullanılarak pearson korelasyon analizleri gerçekleştirildi.

-Hücre canlılığı (%) - Kaspaz-3/7 aktivasyonu
-Hücre canlılığı (%) - IFN-γ Düzeyleri
-Kaspaz-3/7 aktivasyonu - IFN-γ Düzeyleri



Şekil 12. Hücresel analizler sonucu elde edilen verilen işlenme algoritması

4. BULGULAR

4.1. Biyoinformatik Analizler

4.1.1. Anti PD-L1 Direncinden Sorumlu Yolak ve Genler

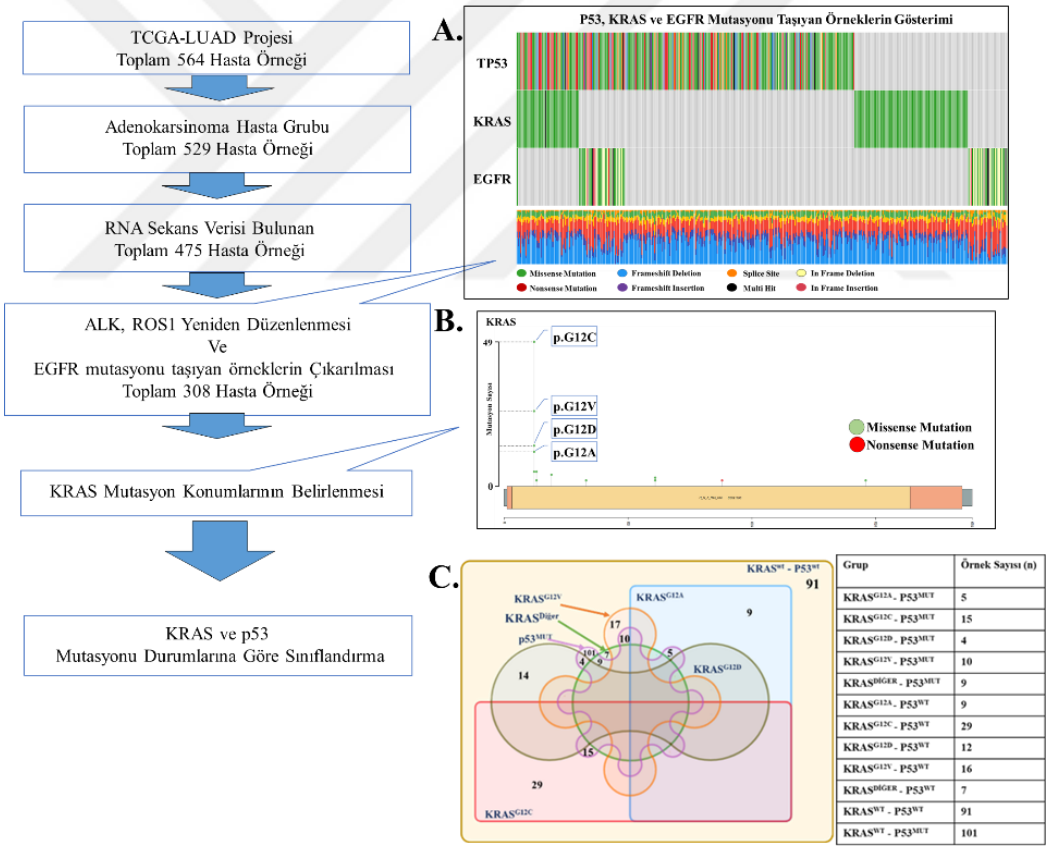
Yolak analizleri, yolakların kendi içerisindeki etkin genleri/proteinleri ve birbirleri arasındaki kavşak noktalarının bağlantısını kurarak etkileşimlerini de analiz etmektedir. Bu nedenle analizler sonucu anti-PD-L1 direnciyle ilişkili 14 moleküler yolak ve yolakların kendi aralarındaki etkileşimlerini oluşturan kavşak geçişlerindeki genlerle beraber toplamda 2778 adet hedef gen seti belirlendi. Yolak analizi sonucu belirlenen hedef yolaklar çizelge 4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4. Literatür taraması sonucu belirlenen hedef genler ve ilişkili yolakları

Moleküler Yolaklar	Kaynak Kodu	Kaynak
Wnt/B-Catenin Yolağı	hsa04310	(Castagnoli vd., 2019; Yaguchi vd., 2012)
MAPK Sinyal Yolağı	hsa04010	(L. Liu vd., 2015; Loi vd., 2016)
PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı	hsa04151	(Lastwika vd., 2016; Parsa vd., 2007)
IFNy ve İnterferon Reseptör Sinyal Yolları	hsa04066	(Garcia-Diaz vd., 2017; Mojic vd., 2018; Zaretsky vd., 2016)
Ras-Raf-MEK-ERK Yolakları	hsa04014	(Patsoukis vd., 2012)
VEGF Sinyal Yolağı	hsa04370	(Meder vd., 2018; Yi vd., 2019)
MHC-I (Major histocompatibility complex class-I)	Biocarta M22023	(Leal vd., 2018; Perea vd., 2018)
DNA Mismatch Repair	ko03430	(Lee vd., 2016; Viale vd., 2017)
Hıf1-alfa Sinyal Yolağı	nt06225	(B. Chen vd., 2020; Noman vd., 2014)
TGF-Beta Sinyal Yolağı	hsa04350	(Lind vd., 2020; Sow vd., 2019; Y. Zhang vd., 2019)
Kemokin Sinyal Yolağı	nt06124	(Letourneur vd., 2020; Vilgelm & Richmond, 2019)
JAK-STAT Sinyal Yolağı	hsa04630	(Mimura vd., 2018; Song vd., 2018)
NF-kB Sinyal Yolağı	hsa04064	(Asgarova vd., 2018; Betzler vd., 2020; D. Xu vd., 2019)
TNF Sinyal Yolağı	hsa04668	(Guo vd., 2017; X. Wang vd., 2017)

4.1.2. TCGA Veritabanından Hasta Gruplarının Seçilmesi

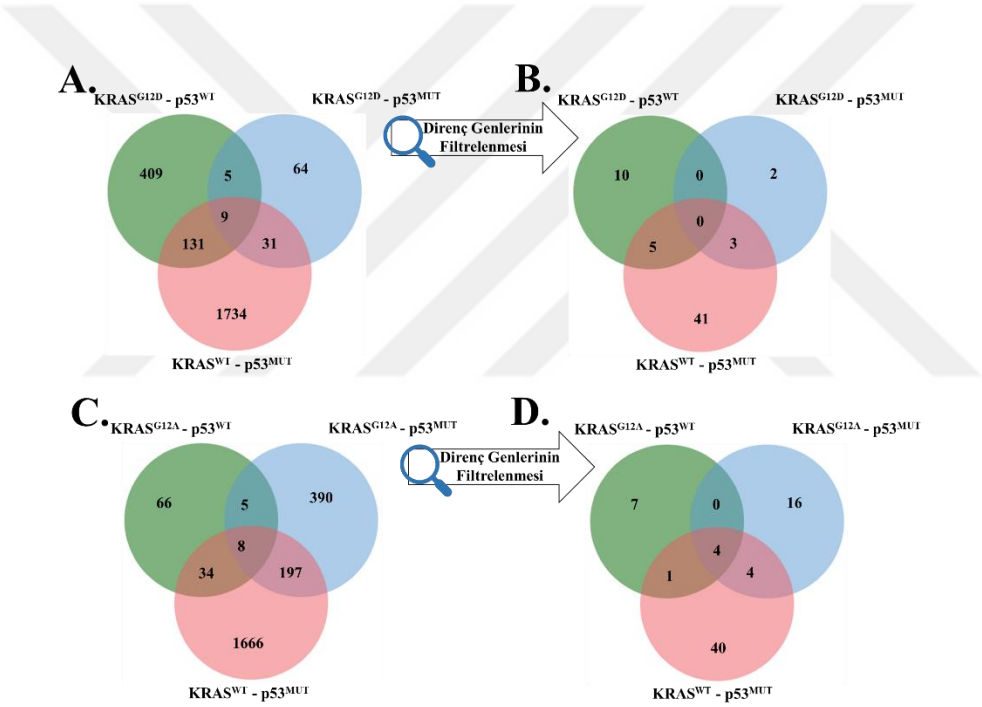
Biyoinformatik analizler öncesinde hasta grubu mutasyon alt tiplerine göre filtrelendi. EGFR mutasyonları, ALK ve ROS1 yeniden düzenlemeleri immun kontrol noktası inhibitörlerine karşı doğal direnç sergilediği için bu özellikleri taşıyan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir (Akbay et al., 2013; Azuma et al., 2014; Gainor et al., 2016; Z. Liu et al., 2020). 564 vakaya sahip TCGA-LUAD hasta kohortundan ilk olarak adenokarsinoma alt tipine sahip hastalar seçildi (n=529). KHDAK adenokarsinoma grubunda ise RNA sekans verisi bulunan hastalar seçilmiştir (n=475). Hasta grubundaki son eliminasyon ise EGFR mutasyonları, ALK ve ROS1 yeniden düzenlemeleri içeren hastaları kapsamaktadır. Sonuç olarak 475 hasta çalışmaya dahil edilerek KRAS ve p53 mutasyonu taşıma durumlarına göre gruplandırılmıştır (Şekil 13).



Şekil 13. TCGA veritabanından KHDAK adenokarsinoma vakalarının seçilim algoritması. A; TP53, KRAS, EGFR mutasyonu taşıyan hasta örneklerinin gösterimi, B; KRAS mutasyon konumları ve frekansları, C; "Edwards-Venn" yöntemiyle KRAS ve p53 mutasyonu durumlarına göre ayrılması

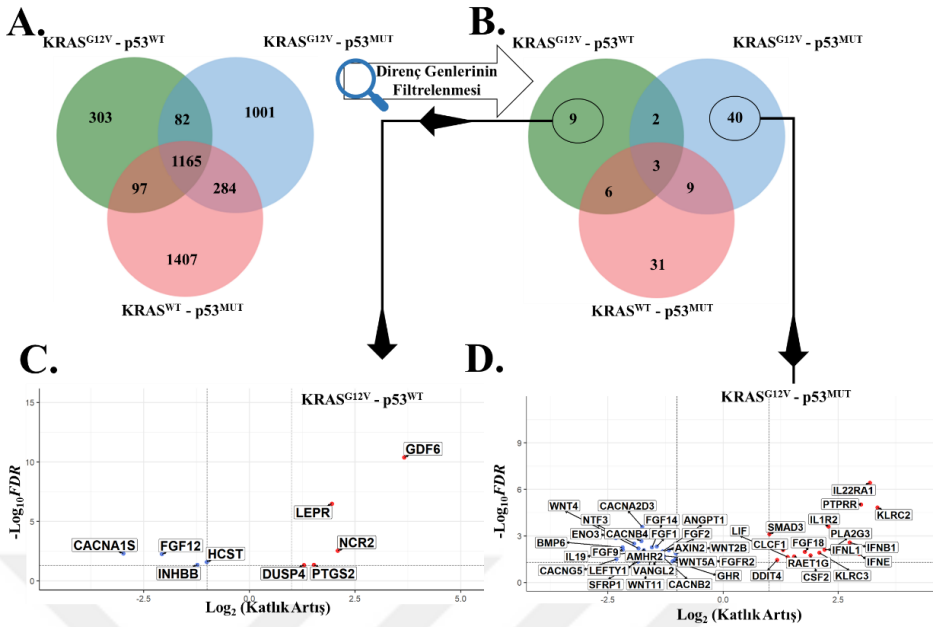
4.1.3. Diferansiyel Gen Ekspresyonu (DGE)

DGE analizleri sonucunda istatistiksel anlamlılık <0.05 FDR *-q-* değeri kullanılarak tanımlanmıştır. DGE analizi; tüm mutant grupların kendi içerisinde $KRAS^{WT}$ $p53^{WT}$ grupla karşılaştırılmasıyla yapılarak anti-PD-L1 direnciyle ilişkili belirlenen gen seti taranmıştır. Analiz sonucu gruplar içerisindeki ortak genler venn şeması kullanılarak görselleştirildi. Bu sayede KRAS ve p53 ko-mutasyonuna bağlı gelişen genler görülebilmektedir. $KRAS^{G12D}$ $p53^{MUT}$ ve $KRAS^{G12A}$ $p53^{MUT}$ ko-mutasyonu taşıyan hasta örneklerinde anti-PD-L1 direnciyle ilişkili genlerin yolak analizine imkan verecek sayıda olmadığı gözlenmiştir. Sadece $KRAS^{G12D}$ $p53^{MUT}$ örnek grubunda 2 gen, sadece $KRAS^{G12A}$ $p53^{MUT}$ örnek grubunda ise 16 adet gen tespit edilmiştir (Şekil 14).



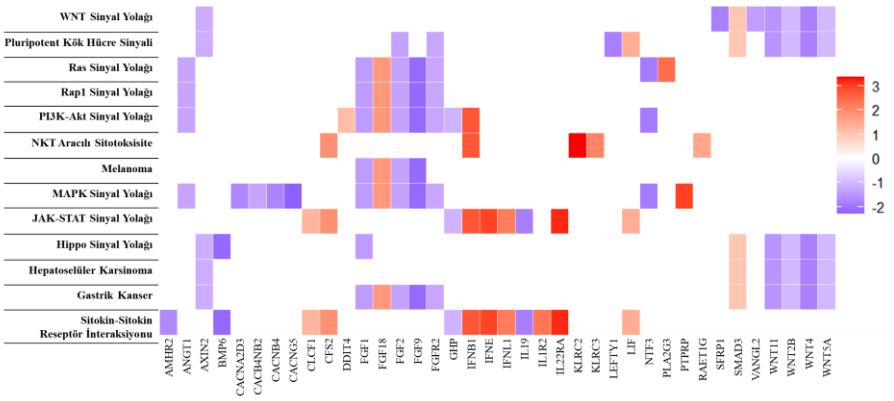
Şekil 14. $KRAS^{G12D}$ $p53^{MUT}$ ve $KRAS^{G12A}$ $p53^{MUT}$ ko-mutasyon taşıyan grupda DGE analizi sonuçları. (A); $KRAS^{G12D}$ $p53^{MUT}$, (B); $KRAS^{G12D}$ $p53^{MUT}$ Diferansiyel eksprese olan genlerin venn grafiğinde gösterimi. (C); $KRAS^{G12D}$ $p53^{MUT}$, (D); $KRAS^{G12D}$ $p53^{MUT}$ Diferansiyel eksprese olan gen kümelerinden anti-PD-L1 direnciyle ilişkili gen kümelerinin filtre edilerek venn grafiğinde gösterimi.

$KRAS^{G12V}$ $p53^{MUT}$ hasta grubunda ise anti-PD-L1 direncinden sorumlu olabilecek 40 adet gen belirlenmiştir. Belirlenen gen kümesinde (n=40) 16 genin artmış ve 24 genin ise azalmış ekspresyonu gözlenmiştir (Şekil 15B).



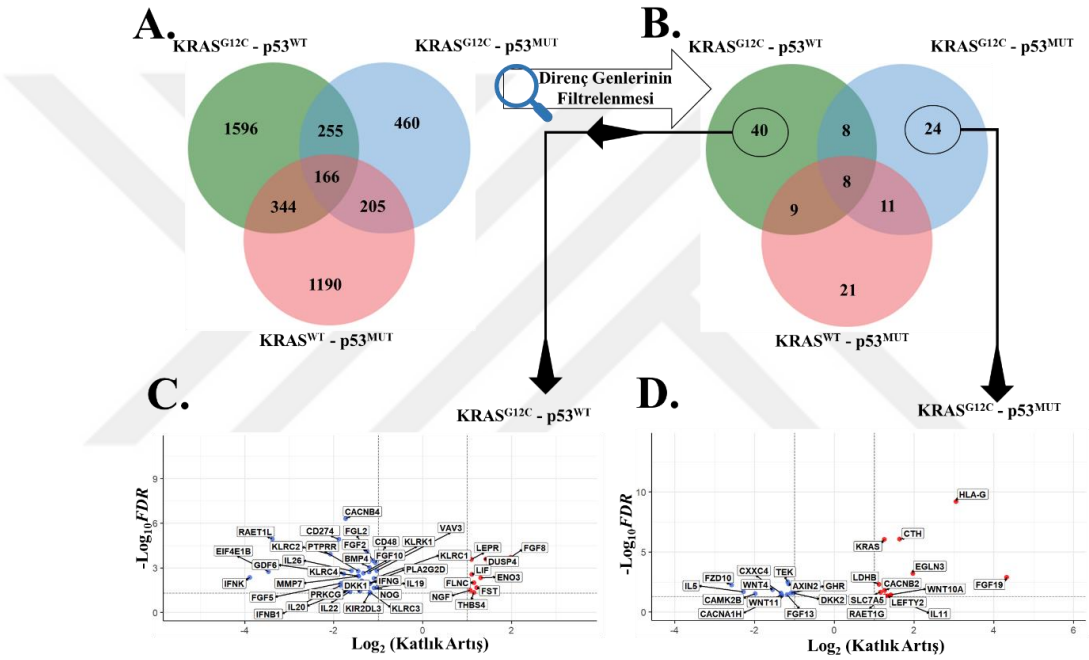
Şekil 15. KRAS^{G12V} p53^{MUT} ko-mutasyon taşıyan grupta DGE analizi sonuçları. (A); KRAS^{G12V} p53^{MUT} hasta grubunda diferansiyel eksprese olan genlerin venn grafiğinde gösterimi. (B); anti-PD-L1 direnciyle ilişkili gen kümelerinin filtre edilerek venn grafiğinde gösterimi. (C) ve (D) Sadece KRAS^{G12V} p53^{WT} ve KRAS^{G12V} p53^{MUT} ko-mutasyon taşıyan gruplardaki anti-PD-L1 direnciyle ilişkili genlerin volcano plot gösterimi.

Dirençten sorumlu olabilecek 40 adet gene ait yolak analizlerinde ise Jak-Stat ve sitokin-sitokin interaksiyon yolağı dışında kalan yolaklarda görevli genler azalmış ekspresyon profili sergilemektedir (Şekil 16).



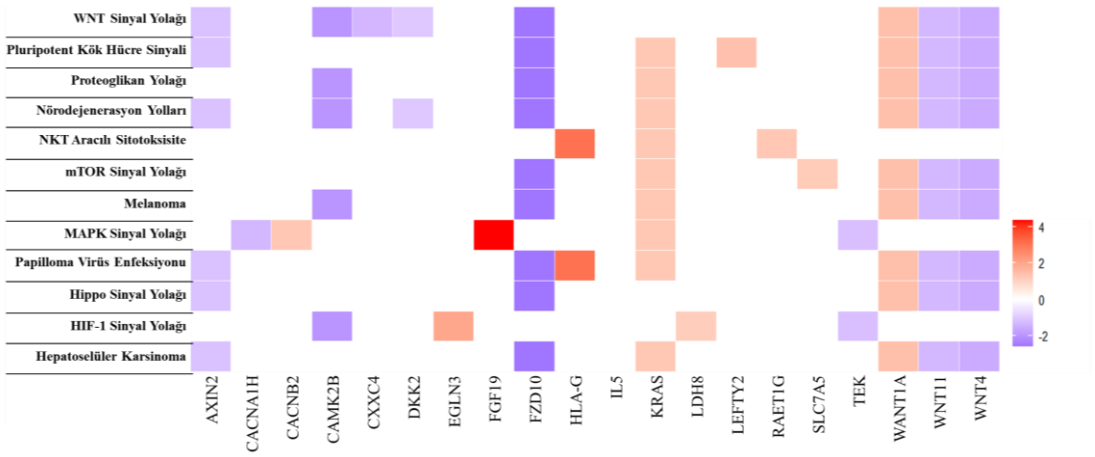
Şekil 16. KRAS^{G12V} p53^{MUT} hasta grubunda diferansiyel eksprese olan anti-PD-L1 direnciyle ilişkili genler ve ilişkili yolaklar. *Barplot gen ekspresyon seviyelerini göstermektedir.*

$KRAS^{G12C}$ $p53^{WT}$ grubunda anti PD-L1 direnciyle ilişkili 40 adet gen ve ko-mutant hasta grubunda ise 24 adet gen tespit edilmiştir. $KRAS^{G12C}$ mutasyonu taşıyan hasta örnekleri incelendiğinde ise özellikle PD-L1 (CD274) ekspresyon seviyesi dikkat çekmektedir. Ko-mutant ve p53 mutasyonu taşıyan gruplara oranla azalmış PD-L1 ekspresyon seviyeleri $KRAS^{G12C}$ $p53^{WT}$ örneklerde anti PD-L1 tedavi yanıtıyla ilişkilendirilebilir. P53 ko-mutant örneklerde ise ilginç bir şekilde KRAS gen ifade seviyesinde artış gözlenmiştir. Bu durum $KRAS^{G12C}$ mutasyonuna p53 mutasyonunun eşlik etmesi gen ifade seviyesini etkilediğini düşündürmüştür (Şekil 17).



Şekil 17. $KRAS^{G12C}$ $p53^{MUT}$ ko-mutasyon taşıyan grupda DGE analizi sonuçları. (A); $KRAS^{G12C}$ $p53^{MUT}$ hasta grubunda diferansiyel eksprese olan genlerin venn grafiğinde gösterimi. (B); Anti PD-L1 direnciyle ilişkili gen kümelerinin filtre edilerek venn grafiğinde gösterimi. (C) ve (D) Sadece $KRAS^{G12C}$ $p53^{WT}$ ve $KRAS^{G12C}$ $p53^{MUT}$ ko-mutasyon taşıyan gruplardaki anti-PD-L1 direnciyle ilişkili genlerin volcano plot gösterimi.

Yapılan yolak analizlerinde ise $KRAS^{G12C}$ $p53^{MUT}$ ko-mutasyon taşıyan grupta Wnt, MAPK, mTOR gibi anti PD-L1 direncinden sorumlu olabilecek sinyal yolaklarına ait genlerin heterojen ifade seviyeleri görülmektedir. Örneğin Wnt sinyal yolağının pozitif düzenleyiceleri olan WNT4 ve WNT11 ekspresyonlarında azalma gözlenirken güçlü aktivatörlerden olan WNT1A'nın artmış ifade seviyesi gözlenmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. KRAS^{G12C} p53^{MUT} hasta grubunda diferansiyel eksprese olan anti-PD-L1 direnciyle ilişkili genler ve ilişkili yolaklar. *Barplot gen ekspresyon seviyelerini göstermektedir.*

4.2. Hasta Örneklerinin Temini ve Karakterizasyonu

4.2.1. KHDAK Hastalarının Tanısı ve Biyopsi/Kan Örneklerinin Temini

Tez çalışması kapsamında toplam 78 hasta örneği toplanmış fakat bir sonraki bölümlerde açıklandığı gibi (örn. EGFR mutasyonu pozitif olan hastalar) 33 hasta örneği çalışmaya dahil edilmemiştir.

4.2.2. Histopatolojik ve Mutasyon Durumuna Göre Sınıflandırma

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarlarında akciğer kanseri ön tanısı/tanısı konulan vakaların histopatolojik sınıflandırmaları rutin olarak yapılmaktadır. Ayrıca Tıbbi Genetik Laboratuvarlarında akciğer kanseri ön tanısı/tanısı konulan vakaların EGFR, KRAS ve p53 mutasyon durumlarına rutin olarak bakılmakta ve raporlanmaktadır. Tez çalışması kapsamında temin edilen tümör örneklerinden 58'i adenokarsinoma, 14 örnek ise skuamöz hücreli karsinomdur. Skuamöz hücreli karsinom örnekleri ileri analizlerde kullanılmamıştır. Adenokarsinoma örneklerinden 45 örnek EGFR mutasyonu negatif, 10 örnek ise pozitif olduğu görülmektedir (Çizelge 5).

Çizelge 5. Alınan örneklerin histopatolojik ve mutasyon durumları. ADC; Adenokarsinoma

	Hasta No	**Patoloji**		**Mutasyon Durumu**		
		Histopatoloji	Alt Tip	EGFR	KRAS	p53
Çalışmaya Dahil Edilen Örnekler	1	KHDAK	ADC	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Pozitif
	2	KHDAK	ADC	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Pozitif
	3	KHDAK	ADC	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Pozitif
	4	KHDAK	ADC	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Pozitif
	5	KHDAK	ADC	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Pozitif
	6	KHDAK	ADC	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Pozitif
	7	KHDAK	ADC	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Pozitif
	8	KHDAK	ADC	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Pozitif
	9	KHDAK	ADC	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Pozitif
	10	KHDAK	ADC	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Negatif
	11	KHDAK	ADC	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Negatif
	12	KHDAK	ADC	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Negatif
	13	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>T, **G12V**	Pozitif
	14	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>T, **G12V**	Pozitif
	15	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>T, **G12V**	Pozitif
	16	KHDAK	ADC	Negatif	Negatif	Pozitif
	17	KHDAK	ADC	Negatif	Negatif	Pozitif
	18	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>T, **G12V**	Negatif
	19	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>T, **G12V**	Negatif
	20	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>C, **G12A**	Pozitif
	21	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>C, **G12A**	Pozitif
	22	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>T, **G12V**	Pozitif
	23	KHDAK	ADC	Negatif	Negatif	Negatif
	24	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>C, **G12A**	Pozitif
	25	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>C, **G12A**	Pozitif
	26	KHDAK	ADC	Negatif	Negatif	Negatif
	27	KHDAK	ADC	Negatif	Negatif	Pozitif
	28	KHDAK	ADC	Negatif	Negatif	Pozitif
	29	KHDAK	ADC	Negatif	c.37G>T, **G13S**	Negatif
	30	KHDAK	ADC	Negatif	c.37G>T, **G13S**	Negatif
	31	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>A, **G12D**	Pozitif
	32	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>A, **G12D**	Pozitif
	33	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>A, **G12D**	Pozitif
	34	KHDAK	ADC	Negatif	c.38G>A, **G13D**	Pozitif
	35	KHDAK	ADC	Negatif	c.182A>T, **Q61L**	Pozitif
	36	KHDAK	ADC	Negatif	c.38G>A, **G13D**	Pozitif

Çizelge 5. Alınan örneklerin histopatolojik ve mutasyon durumları. ADC; Adenokarsinoma (Devam)

	Hasta No	**Patoloji**		**Mutasyon Durumu**		
		Histopatoloji	Alt Tip	EGFR	KRAS	p53
Çalışmaya Dahil Edilen Örnekler	37	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>C, **G12A**	Negatif
	38	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>C, **G12A**	Negatif
	39	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>C, **G12A**	Negatif
	40	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>A, **G12D**	Negatif
	41	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>A, **G12D**	Negatif
	42	KHDAK	ADC	Negatif	c.35G>A, **G12D**	Negatif
	43	KHDAK	ADC	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Negatif
	44	KHDAK	ADC	Negatif	Negatif	Negatif
	45	KHDAK	ADC	Negatif	Negatif	Negatif
Çalışmaya Dahil Edilmeyen Örnekler	46	KHDAK	ADC	Pozitif	c.35G>A, **G12D**	Negatif
	47	KHDAK	ADC	Pozitif	c.34G>T, **G12C**	Negatif
	48	KHDAK	ADC	Pozitif	c.34G>T, **G12C**	Negatif
	49	KHDAK	ADC	Pozitif	c.34G>T, **G12C**	Negatif
	50	KHDAK	ADC	Pozitif	Negatif	Negatif
	51	KHDAK	ADC	Pozitif	Negatif	Negatif
	52	KHDAK	ADC	Pozitif	Negatif	Negatif
	53	KHDAK	ADC	Pozitif	Negatif	Pozitif
	54	KHDAK	ADC	Pozitif	Negatif	Pozitif
	55	KHDAK	Skuamöz	Pozitif	Negatif	Pozitif
	56	KHDAK	Skuamöz	Pozitif	Negatif	Pozitif
	57	KHDAK	Skuamöz	Pozitif	Negatif	Pozitif
	58	KHDAK	Skuamöz	Pozitif	Negatif	Pozitif
	59	KHDAK	Skuamöz	Negatif	c.34G>A, **G12S**	Pozitif
	60	KHDAK	Skuamöz	Negatif	Negatif	Pozitif
	61	KHDAK	ADC	Pozitif	Negatif	Negatif
	62	KHDAK	ADC	Pozitif	c.34G>T, **G12C**	Negatif
	63	KHDAK	Skuamöz	Pozitif	Negatif	Negatif
	64	KHDAK	Skuamöz	Pozitif	c.34G>T, **G12C**	Negatif
	65	KHDAK	Skuamöz	Pozitif	Negatif	Pozitif
	66	KHDAK	Skuamöz	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Pozitif
	67	KHDAK	Skuamöz	Negatif	Negatif	Pozitif
	68	KHDAK	Skuamöz	Negatif	c.34G>T, **G12C**	Pozitif
	69	KHDAK	Skuamöz	Pozitif	Negatif	Pozitif
	70	KHDAK	Skuamöz	Pozitif	c.34G>A, **G12S**	Pozitif
	71	KHDAK	ADC	Pozitif	Negatif	Negatif
	72	KHDAK	ADC	Pozitif	Negatif	Negatif

Çizelge 5. Alınan örneklerin histopatolojik ve mutasyon durumları. ADC; Adenokarsinoma (Devam)

	Hasta No	**Patoloji**		**Mutasyon Durumu**		
		Histopatoloji	Alt Tip	EGFR	KRAS	p53
Çalışmaya Dahil Edilmeyen Örnekler	73	Malignite Yok				
	74	Malignite Yok				
	75	Malignite Yok				
	76	Malignite Yok				
	77	Malignite Yok				
	78	Malignite Yok				

Demografik özellikler açısından incelendiğinde 59 örneğin erkek hastalara, 19 örneğin ise kadın hastalara ait olduğu görülmektedir. Ayrıca 60-69 yaş aralığı 28 hasta örneği ile en frekansı en yüksek yaş grubunu oluşturmaktadır. Ko-morbidite durumlarını ise yüksek frekansa göre hiper Tansiyon, apendektomi ve glokom izlemektedir (Çizelge 6).

Çizelge 6. Tez çalışması kapsamında toplanan örneklere ait demografik ve klinik özellikler

		Hasta Sayısı (n)	**Yüzde (%)**
Demografik Parametreler			
Cinsiyet	Erkek	59	75,64
	Kadın	19	24,36
Yaş	30-39	3	5,13
	40-49	13	19,23
	50-59	15	20,51
	60-69	28	35,90
	70-79	13	19,23
Klinik Parametreler			
Histoloji	Adenokarsinoma	58	74.36
	Skuamöz	14	17.95
	Kanser Değil		7.69
EGFR	Pozitif	19	24.36
	Negatif	53	67.95
	Tanımlı Değil	6	7.69
p53	Pozitif	41	52.56
	Negatif	31	39.74
	Tanımlı Değil	6	7.69
Kras	Pozitif	47	60.26
	Negatif	25	32.05
	Tanımlı Değil	6	7.69
Ko-Morbidite	Hiper Tansiyon	20	15.6
	Apendektomi	12	9.36

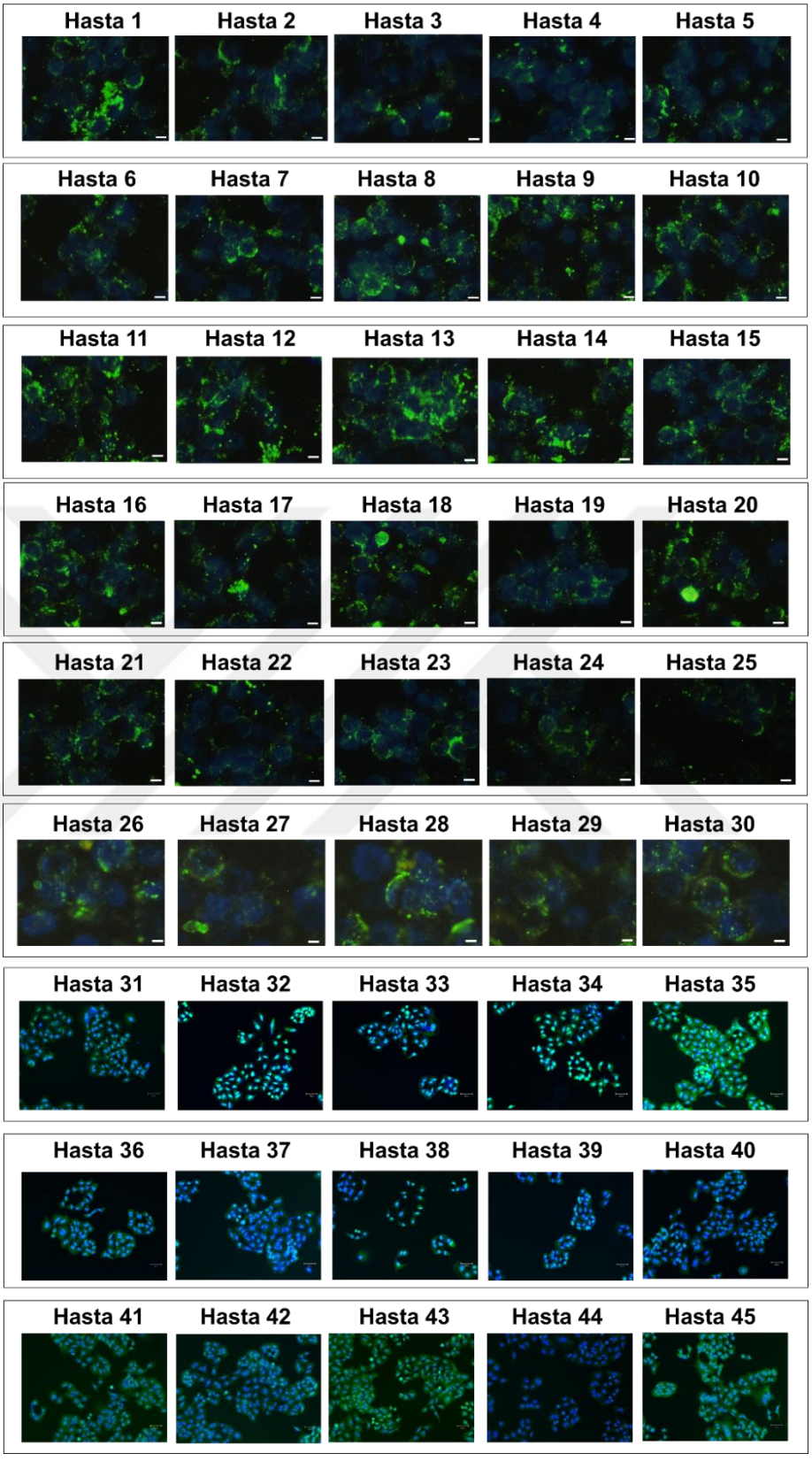
Sonuç olarak bakıldığında 45 hasta örneği EGFR mutasyonu negatif ve adenokarsinoma olması nedeniyle çalışmalara alındı. Ayrıca KRAS ve p53 mutasyonu taşıma durumlarına göre Çizelge 7'de açıklanan hasta grupları oluşturularak çalışmalara devam edilmiştir.

Çizelge 7. Hasta grupları

Mutasyon Durumu	***Açıklama***	***Örnek Sayısı***
$KRAS^{G12A}$ $p53^{MUT}$	Kras G12A ve p53 ko-mutasyonu	4
$KRAS^{G12C}$ $p53^{MUT}$	Kras G12C ve p53 ko-mutasyonu	9
$KRAS^{G12D}$ $p53^{MUT}$	Kras G12D ve p53 ko-mutasyonu	3
$KRAS^{G12V}$ $p53^{MUT}$	Kras G12V ve p53 ko-mutasyonu	4
**$KRAS^{DİĞER}$ $p53^{MUT}$	Kras DİĞER ve p53 ko-mutasyonu	3
$KRAS^{G12A}$ $p53^{WT}$	Kras G12A pozitif, p53 mutasyonu negatif	3
$KRAS^{G12C}$ $p53^{WT}$	Kras G12C pozitif, p53 mutasyonu negatif	4
$KRAS^{G12D}$ $p53^{WT}$	Kras G12D pozitif, p53 mutasyonu negatif	3
$KRAS^{G12V}$ $p53^{WT}$	Kras G12V pozitif, p53 mutasyonu negatif	2
**$KRAS^{DİĞER}$ $p53^{WT}$	Kras DİĞER pozitif, p53 mutasyonu negatif	2
$KRAS^{WT}$ $p53^{MUT}$	Kras Negatif, p53 mutasyonu Pozitif	4
$KRAS^{WT}$ $p53^{WT}$	Kras ve p53 Mutasyonu Negatif	4
Sağlıklı Örnek	Biyopsi örneği alınan her hastadan alınan sağlıklı doku örnekleri	45
	Toplam	45 Biyopsi + 45 Sağlıklı Doku

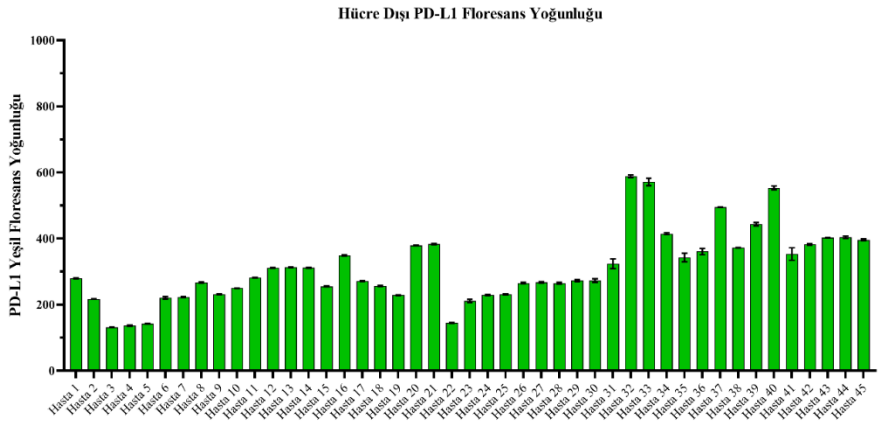
4.2.3. Ekstraselüler PD-L1 İmmünfloresan Boyama

EGFR mutasyonu açısından negatif olan 45 adenokarsinoma örneği hücre dışı PD-L1 seviyeleri açısından immunfloresan boyama ile analiz edilmiştir. 45 hasta örneğinde başarılı DAPI boyaması gerçekleşmiştir. Örneklerin hepsinde PD-L1 boyamasının pozitif olduğu görülmektedir (Şekil 19).



Şekil 19. Hücre dışı PD-L1 immunfloresan boyama görüntüleri. ***Mavi****: DAPI,* ***Yeşil****, PD-L1. Scale Bar 50 µm*

Atezolizumab klinik uygulama protokollerine göre PD-L1 SP142 antikoru ile yapılan boyamalarda PD-L1 TPS skoru ≥50 olan hastalar tedavi için uygun bulunmaktaydı. Fakat Atezolizumab 15 Ekim 2021 güncel FDA onayına göre PD-L1 TPS skoru ≥ %1 olan KHDAK hastaları için onay almıştır. İmmunfloresan boyama görüntüleri Image-J yazılımı kullanılarak yeşil floresan ışıma kantitatif olarak hesaplanmıştır. Yeşil floresan yoğunlukları immunfloresan boyama görüntüler iile uyumlu olduğu gözlenmektedir. En yüksek PD-L1 seviyeleri 32, 33, 40 ve 37. hasta örneklerinde gözlenmiştir (Şekil 20). Genel olarak bakıldığında ise ortalama 311,04 (± 62.02) yeşil floresan yoğunluk bulunmaktadır.



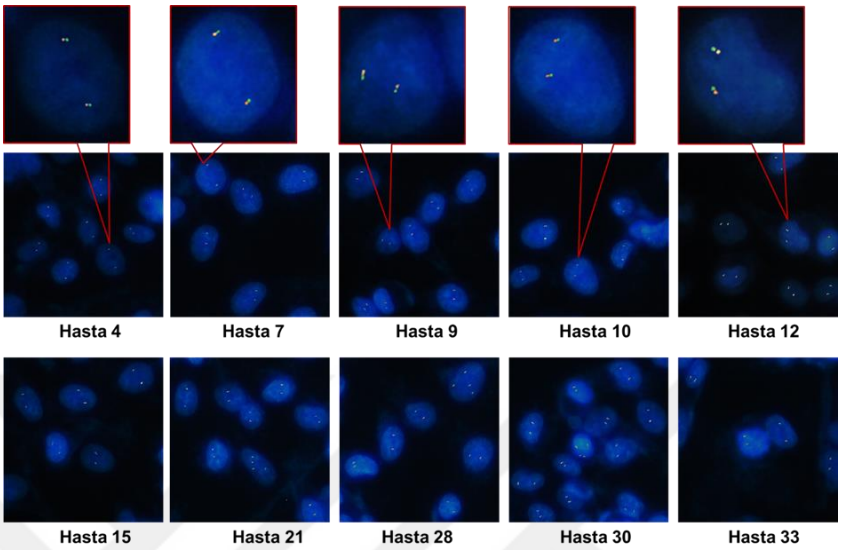
Şekil 20. PD-L1 immunositokimya analizleri sonucu yeşil sinyal yoğunluğu. Her grafik 4 eş alana bölünerek analiz edilmiştir. Her bir sütun analiz edilen 4 alanın ortalamasını vermektedir ±SD (n=4).

Sonuç olarak EGFR negatif 45 adenokarsinoma örneğinde yüzey PD-L1 ekspresyonu pozitif olduğu gözlenmekte ve örnekler bir sonraki aşama olan FISH analizleri için test edilmiştir.

4.2.4. ALK, ROS1 Yeniden Düzenlemelerinin (“rearrangements”) FİSH Yöntemiyle Analizi

EGFR negatif 45 adenokarsinoma örneğinin ait olduğu hastaların raporları tarandığında ALK yeniden düzenlemesi içermedikleri gözlenmiştir. Sadece 10 hasta örneğinin ROS1 FISH analizleri bulunmadığı için FISH analizleri bu hasta örneklerinde yapılmıştır. ROS1 gen bölgesinde translokasyon olmayan hücrelerin interfazlarında iki yeşil/turuncu birleşik sinyal görülür. Yeşil sinyal probu ROS1 kırılma noktası bölgesinin proksimalindeki dizileri hedef alırken, turuncu sinyal probu ROS1 kırılma noktası

bölgesinin distalindeki dizileri hedef almaktadır. Şekil 21 incelendiğinde 10 hasta örneğinde de birleşik sinyaller net bir şekilde görülmektedir. Bu durum 10 hasta örneğinin herhangi bir translokasyon taşımadığını göstermektedir.

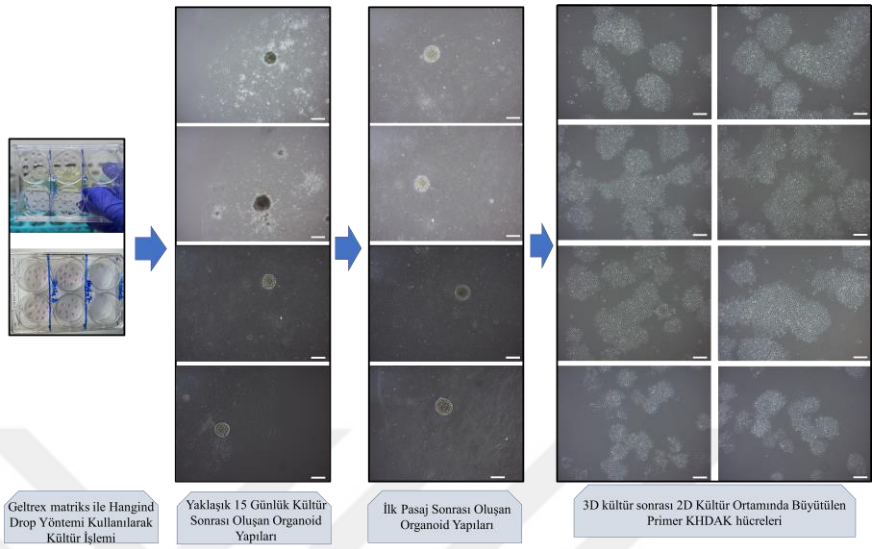


Şekil 21. ROS1 yeniden düzenlemelerin analizi için yapılan FISH boyamaları. Yeşil sinyal ROS1 kırılma noktası bölgesinin proksimalini Yeşil sinyal, distalindeki dizileri ise Turuncu sinyal temsil etmektedir.

4.3. Ex-Vivo Organoid ve T-Hücre Ko-Kültürü

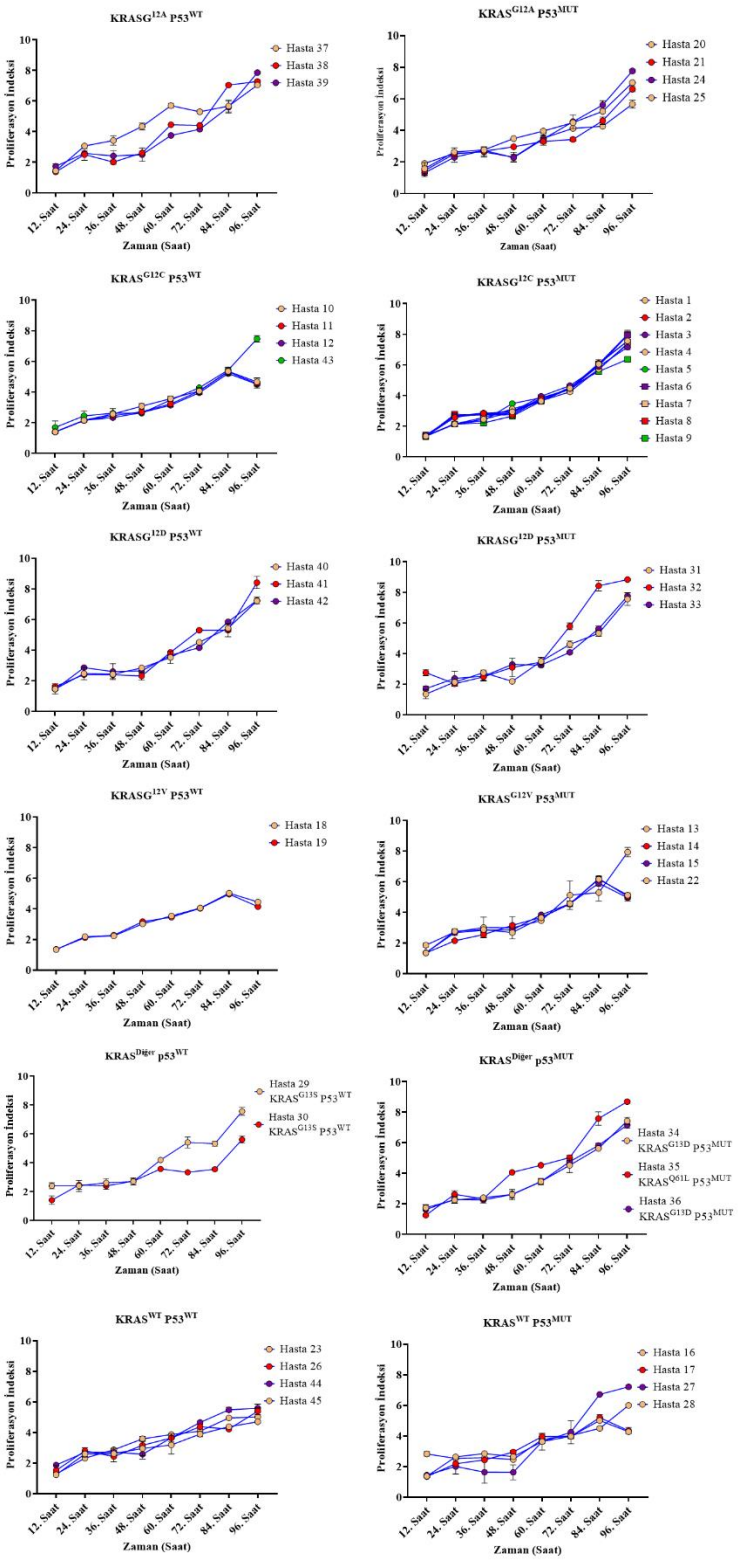
3 boyutlu kültür ortamlarında hücre kümeleri (sferoid veya organoid yapıları) merkezlerinden dış kabuk bölgeye doğru nekrotik, durağan ve proliferasyon bölgesi olarak tanımlanan 3 eşmerkezli bölge sergilerler. 3 boyutlu yapının en dış kısmında bulunan proliferasyon bölgesi besin ve hava trafiğinin en yoğun gerçekleştiği ve hücrelerin proliferasyonlarının en yüksek seviyede izlendiği bölgedir. Durağan bölge hücre proliferasyonunun yavaşladığı ve hatta durma noktasına geldiği ve 3 boyutlu yapının fiziksel ana iskelesini oluşturan hücrelerden oluşmaktadır. Merkezde ise besin ve oksijen yoksunluğu, metabolik atık birikimi ile birlikte hücrelerin nekrotik ölümünü tetiklendiği nekrotik bölge bulunmaktadır. Bu hücre katmanları 3 boyutlu organoidlerin dışından merkezine sınırlı difüzyonun bir sonucu olarak oluşturulan besinler ve oksijen gradyanları nedeniyle bu şekilde tanımlanmaktadır. Bu 3 bölgenin kültür koşullarında denge halinde bulunması 3 boyutlu yapının boyutuna (çapına) bağlıdır. Bu nedenle ex-vivo kültür koşullarında her organoid çapının ortalama 300µm çapa ulaşması büyüme üst

sınırı olarak belirlendi (Şekil 22). Ve organoid yapıları bu aşamadan sonra pasajlanarak ko-kültür basamaklarında kullanıldı.



Şekil 22. 3 Boyutlu Ex-Vivo kültür basamakları ve primer KHDAK hücrelerinin hazırlanması. *Scale Bar 300µm'yi temsil etmektedir.*

İlk pasaj sonrası elde edilen organoid yapıları tek hücre süspansiyonu haline getirilerek 2 boyutşu kültür koşullarında kültüre edildi. Ko-kültür aşamalarında kullanılmadan önce 2 boyutlu ortamda büyütülerek proliferasyon durumları incelenerek ko-kültür şartlarında hücre ölümüne bağlı yanlış pozitif veya negatif değerlendirmelerin önüne geçilmiştir. Yapılan analizler sonucu hücrelerin 96 saat sonunda 2 boyutlu kültür aşamasında ortalama 6,5 katlık (±1,3) bir proliferasyon indeksi ölçüldü. $Kras^{G12A}$ $p53^{WT}$ örneklerde proliferasyon indeksi 7,1 (±0,3) iken p53 mutasyonunun eşlik ettiği $Kras^{G12A}$ $p53^{Mut}$ grupta 6,92 (±0,8) olduğu gözlenmiştir. $Kras^{G12D}$ $p53^{WT}$ hasta örneklerinde 7,62 (±0,6) ve p53 ko mutasyon taşıyan grupta ise 8,01 (±0,6) olarak belirlenmiştir. p53 mutasyonu taşıyan ve taşımayan gruplar arasında en büyük fark $Kras^{G12C}$ hasta örneklerinde gözlenmiştir. $Kras^{G12C}$ $p53^{WT}$ 10, 11, 12 ve 43. hasta örneklerinde 96. saatin sonunda ortalama 5,1 (±1,3) proliferasyon indeksi gözlenirken p53 ko-mutasyonu taşıyan (Hasta 1-9. örnekler) grupta ise proliferasyon indeksi 7.6 (±0,5) olarak analiz edilmiştir. Ayrıca Kras ve p53 mutasyonu taşımayan örneklerde proliferasyon indeksi 5,1 iken, p53 mutasyonun eşlik etmesiyle 5,2 olarak izlenmiştir (Şekil 23).



Şekil 23. Ko-kültür öncesi hücrelerin proliferasyon kapasitelerinin incelenmesi. *Veriler ortalama ±SD (n=3) olarak sunulmuştur.*

4.4. Hücresel Analizler

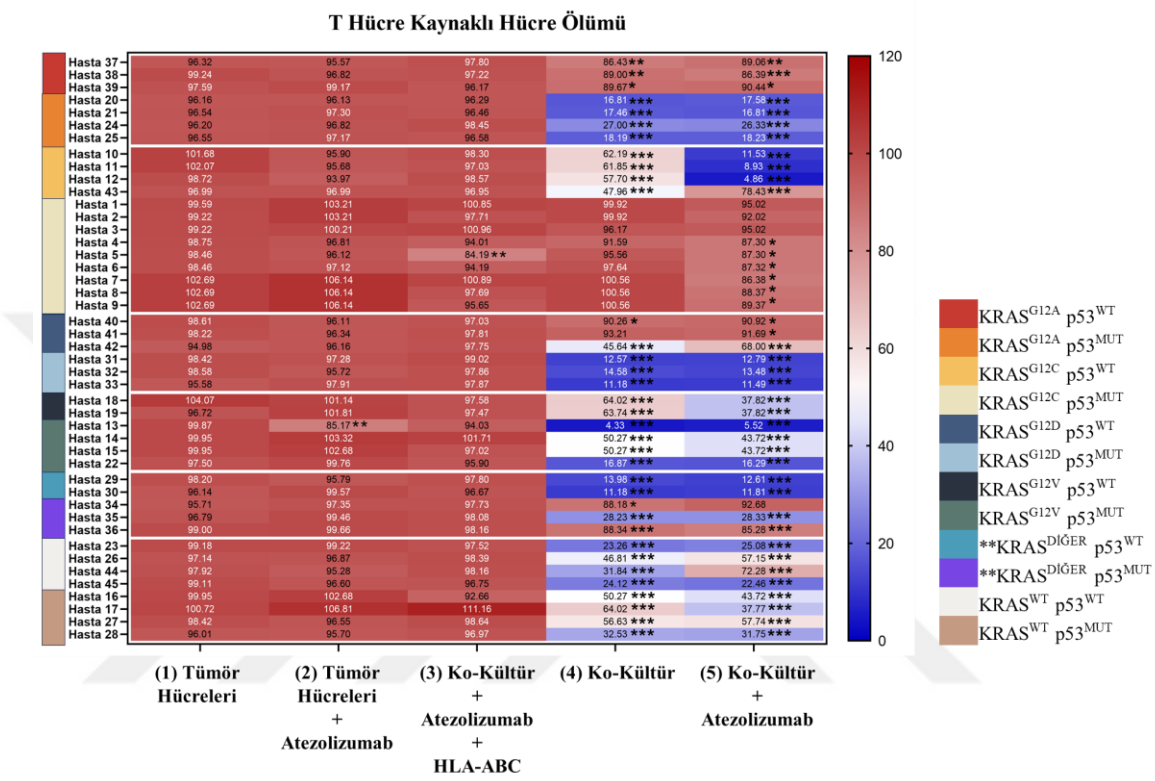
4.4.1. T-Hücre Aracılı Hücre Ölüm Analizi

Hücre canlılık analizleri sonucu alınan veriler görsel karmaşaya neden olmaması açısından her bir mutasyon alt tipi farklı gruplar içerisine alınarak ısı haritasında (heatmap) görselleştirilmiştir. Deney grupları şekil 9'da görüldüğü üzere 5 farklı kategoride gerçekleştirilmiştir. Ayrıca her bir deney grubu metin içerisinde kolay anlaşılması açısından sayısal etiketler ile sınıflandırılmıştır. Atezolizumab etki mekanizması itibariyle immun sistem kaynaklı sitotoksiteden sorumlu olduğu için 4 ve 5. deney gruplarında sitotoksik etkinin gözlenmesi beklenmektedir.

$Kras^{G12A}$, $Kras^{G12C}$ ve $Kras^{G12D}$ mutasyonu taşıyan örnekler ile bunlara eşlik eden p53 mutasyonu taşıyanlar arasında Atezolizumab kaynaklı sitotoksik etkide dramatik farklar gözlenmiştir. $Kras^{G12A}$ $p53^{WT}$ hasta örneklerinde ko-kültür ortamına Atezolizumab eklenmesiyle 4 ve 5. deney gruplarında ortalama %85'in üzerinde hücre canlılığı görülmektedir. $Kras^{G12A}$ $p53^{MUT}$ ko-mutant örneklerde ise Atezolizumab kaynaklı sitotoksisite ortalama %18 hücre canlılığı ile net bir şekilde görülmektedir. Fakat ko-kültür grubunda da benzer sitotoksik etkilerin gözlenmesiyle sitotoksisitenin atezolizumab kaynaklı olmadığını söyleyebiliriz. Benzer etki profili $Kras^{G12D}$ mutasyonu taşıyan örneklerde de gözlenmektedir. Sadece $Kras^{G12D}$ $p53^{WT}$ olan 42 numaralı hasta örneğinde aynı mutasyonu taşıyan 40 ve 41. hasta örneklerinden farklı olarak ko-kültür grubunda %45,64 hücre canlılığı gözlenmiştir. Hatta atezolizumab eklenmesiyle hücre canlılığının %68 olduğu görülmüştür. Bu durum atezolizumaba bağlı olmadan doğal bir bağışıklık tepkisini göstermekte fakat hücre canlılığının yüksek olması kısmi bir dirençten kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (Şekil 24).

Fakat $KRAS^{G12C}$ gruplarında oldukça farklı bir sitotoksisite profili izlenmektedir. $KRAS^{G12C}$ mutasyonu atezolizumab tedavisine yanıt verirken, p53 ko mutasyonunun eşlik etmesiyle hücre canlılığında (4 ve 5. deney gruplarında) dramatik artışlar bulunmaktadır. 18, 19, 13, 14, 15 ve 22 numaraları hasta örneklerinde ise $KRAS^{G12V}$ ve p53 mutasyonundan bağımsız genel olarak atezolizumab uygulamasına yanıt verdikleri gözlenmiştir. P53 mutasyonu taşıyıp taşımama durumu incelendiğinde ise atezolizumab uygulamasında ve ko-kültür deney gruplarında (4. ve 5. deney grupları) benzer hücre

canlılık profili izlenmiştir. Sadece 44. hasta örneğinde ko-kültür grubunda hücre canlılığı %31,84 iken ko-kültür ortamına eklenen atezolizumab ile hücre canlılığı %72,28'e yükselmiştir. Bu durum atezolizumab'a karşı bir ilaç direnci olabileceğini düşündürmektedir.

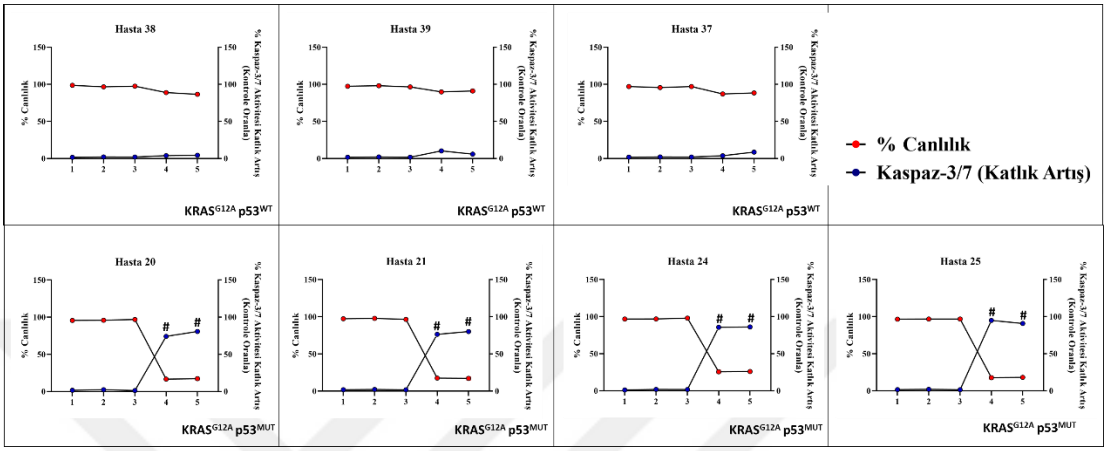


Şekil 24. ATP hücre canlılık analiz sonuçlarının ısı haritası gösterimi. Atezolizumab 20µg/ml, HLA-ABC monoklonal antikoru ise 150 µg/ml konsantrasyonunda uygulanmıştır. Scale Bar hücre canlılığını ifade etmektedir. Her bir deney grubu kolay açıklanması açısından sayılar ile kısaltılmıştır. *Sadece Tümör Hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistik olarak önemli farklılıkları belirtir: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) ve *** ($p < 0.001$). Veriler ortalama ±SD (n=6) olarak sunulmuştur.

4.4.2. T-Hücre Aracılı Apoptozis Analizi

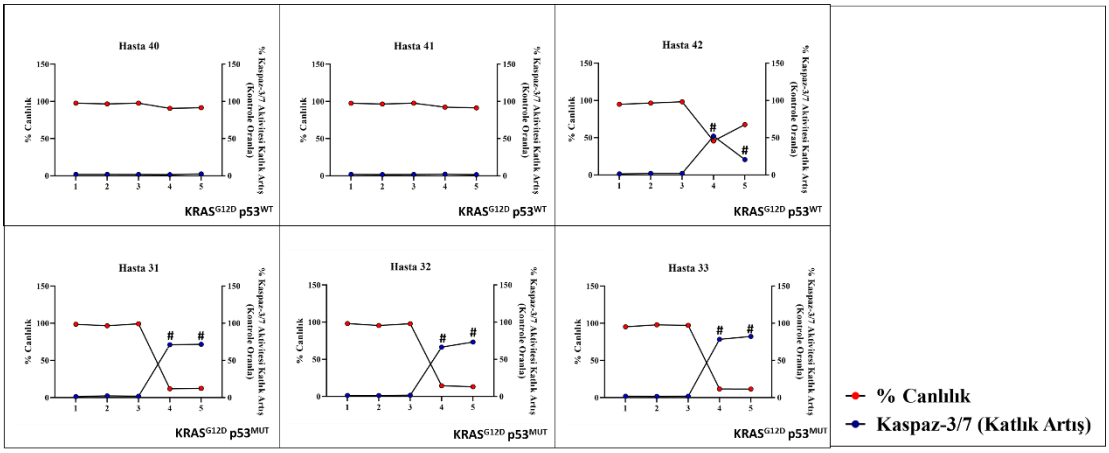
T hücreleri FAS reseptörü veya salgıladıkları çeşitli sinyal molekülleriyle (perforinler ve granzimler) kanser hücrelerinde kaspaz aktivasyonuna ve sonuç olarak apoptotik hücre ölümünün indüklenmesine neden olurlar. Kaspaz-3/7 aktivasyonu ve hücre canlılık analizi verileri tek bir çizgi grafiğinde birleştirilerek karşılaştırmalı analizlerine imkan sağlanmıştır. Genel olarak bakıldığında hücre canlılığındaki azalmaya paralel olarak kaspaz-3/7 aktivasyonunda artışlar gözlenmiştir. KRASG12A grubunda atezolizumab

eklenmesi hücre canlılığına paralel olarak kaspaz-3/7 aktivasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar göstermemiştir. Fakat p53 mutasyonunun eşlik etmesiyle ko-kültür ve ko-kültür+atezolizumab gruplarında azalan hücre canlılığına paralel artan kazpaz aktivasyonu ($p < 0.001$) izlenmiştir (Şekil 25).



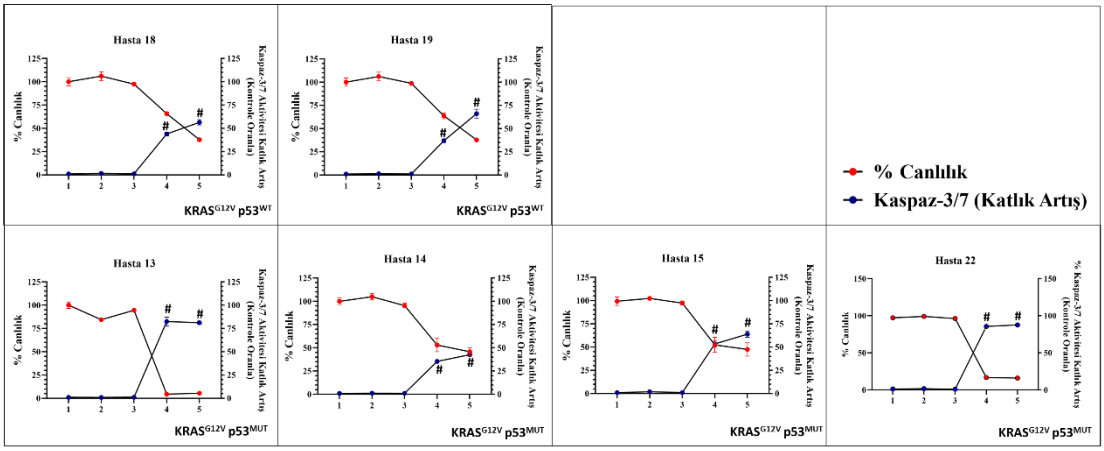
Şekil 25. $KRAS^{G12A}$ grubunun kaspaz aktivasyonu ve hücre canlılık analizlerinin çizgi grafikleri. X ekseni; 1. Tümör Hücreleri, 2. Tümör Hücreleri 20 µg/ml Atezolizumab, 3. Ko-Kültür 20 µg/ml Atezolizumab + 150 µg/mL HLA-ABC, 4. Ko-Kültür, 5. Ko-Kültür 20 µg/ml Atezolizumab. Sol Y Ekseni Yüzde Canlılığı temsil etmektedir. Sağ Y ekseni Kaspaz-3/7 aktivitesindeki katlık artışı temsil etmektedir. #Sadece Tümör Hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistik olarak önemli farklılıkları belirtir: # ($p < 0.001$). Veriler ortalama ±SD (n=6) olarak sunulmuştur.

$KRAS^{G12D}$ hasta grubunda ise 42 numaralı hasta örneği 40 ve 41. hasta örneklerine göre T hücre kaynaklı sitotoksiteye karşı kısmi bir direnç sergilemektedir. Aynı paterni kaspaz aktivasyonunda izlemekteyiz. Hatta 5. deney grubu olan ko-kültür ortamına atezolizumab eklenmesi hücre canlılığını arttırmış ve bu durum karşımıza azalmış kaspaz-3/7 aktivasyonu olarak çıkmıştır (Şekil 26).



Şekil 26. KRAS^{G12D} grubunun kaspaz aktivasyonu ve hücre canlılık analizlerinin çizgi grafikleri. X ekseni; 1. Tümör Hücreleri, 2. Tümör Hücreleri 20 µg/ml Atezolizumab, 3. Ko-Kültür 20 µg/ml Atezolizumab + 150 µg/mL HLA-ABC, 4. Ko-Kültür, 5. Ko-Kültür 20 µg/ml Atezolizumab. Sol Y Ekseni Yüzde Canlılığı temsil etmektedir. Sağ Y ekseni Kaspaz-3/7 aktivitesindeki katlık artışı temsil etmektedir. #Sadece Tümör Hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistik olarak önemli farklılıkları belirtir: # ($p < 0.001$). Veriler ortalama ±SD (n=6) olarak sunulmuştur.

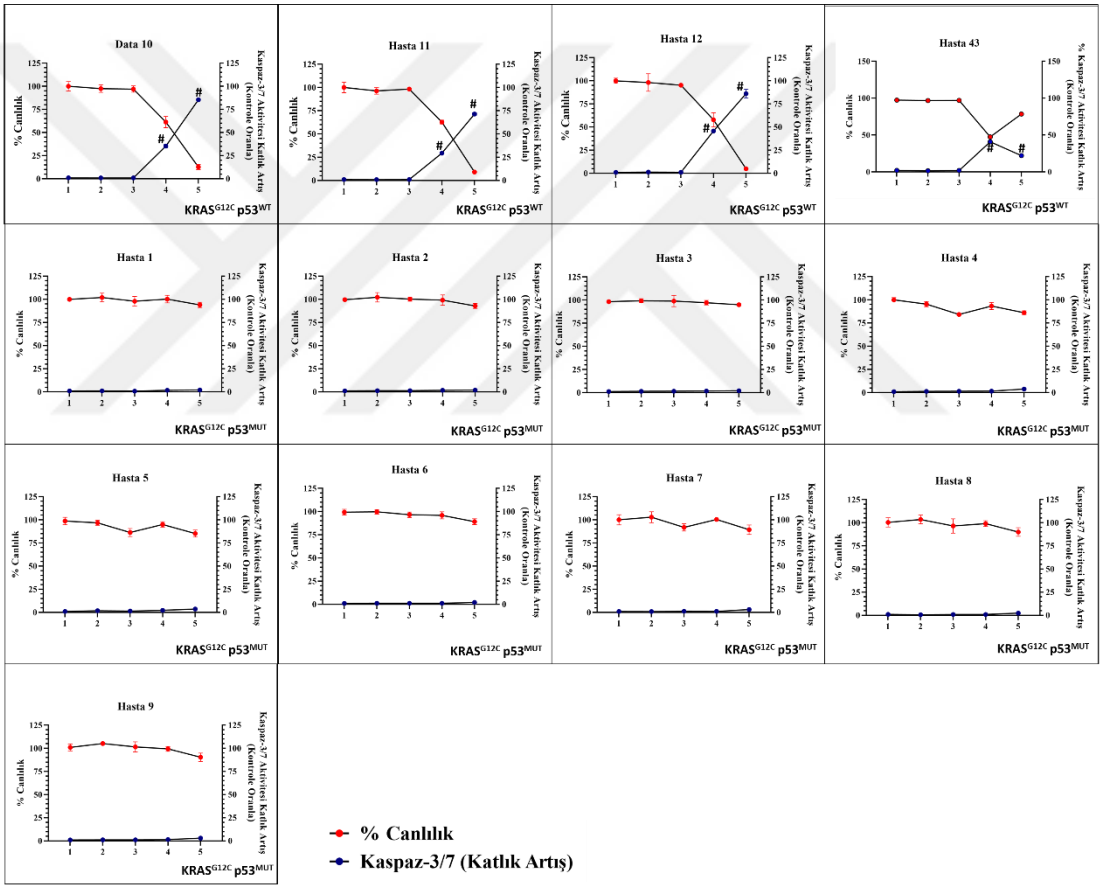
KRAS^{G12V} mutasyonunda ise p53 ko-mutasyonundan bağımsız ko-kültür ve ko-kültür+atezolizumab deney gruplarında azalan hücre canlılığına paralel kaspaz-3/7 aktivasyon artışı görülmektedir. Tekli ve ko-mutant örneklerdeki T hücre kaynaklı sitotoksisite profiline bağlı olarak KRAS ve p53 mutasyonundan bağımsız bir etkinin gerçekleştiğini söyleyebiliriz (Şekil 27).



Şekil 27. KRAS^{G12V} grubunun kaspaz aktivasyonu ve hücre canlılık analizlerinin çizgi grafikleri. X ekseni; 1. Tümör Hücreleri, 2. Tümör Hücreleri 20 µg/ml Atezolizumab, 3. Ko-Kültür 20 µg/ml Atezolizumab + 150 µg/mL HLA-ABC, 4. Ko-Kültür, 5. Ko-Kültür 20 µg/ml Atezolizumab. Sol Y Ekseni Yüzde Canlılığı temsil etmektedir. Sağ Y ekseni Kaspaz-3/7 aktivitesindeki katlık artışı temsil etmektedir. #Sadece Tümör Hücreleri ile

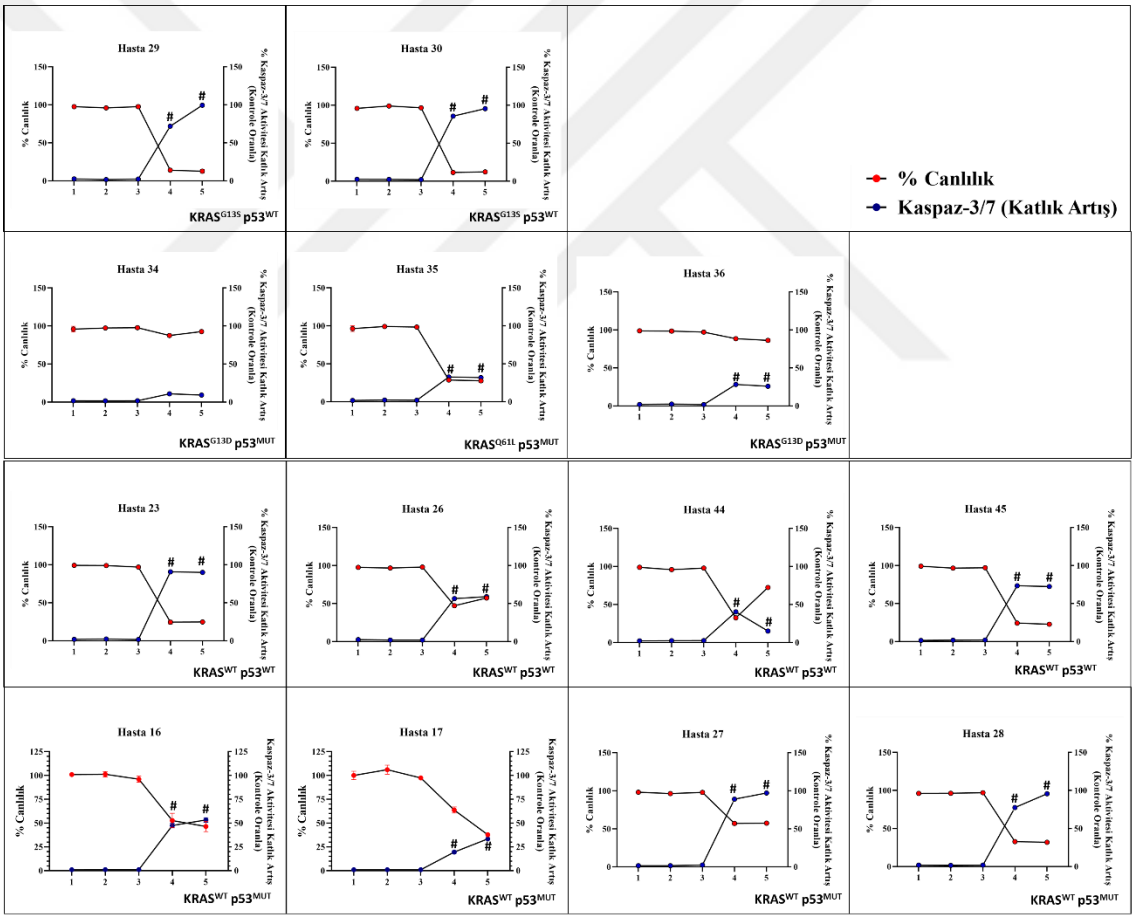
karşılaştırıldığında istatistik olarak önemli farklılıkları belirtir: # (p <0.001). Veriler ortalama ±SD (n=6) olarak sunulmuştur.

$KRAS^{G12C}$ grubunda ise farklı olarak p53 mutasyonun eşlik etmesi tedavi direncine neden olmaktadır. 10, 11, 12 numaralı $KRAS^{G12C}$ $p53^{WT}$ örneklerde ko-kültür koşullarında azalan hücre canlılığına paralel kaspaz-3/7 aktivitesinde artışlar gözlenmiş ve aynı hasta grubunda Atezolizumab eklenmesiyle kaspaz-3/7 aktivasyonunda dramatik artışlar (p <0.001) görülmektedir. Fakat aynı mutasyon profilini taşıyan 43 numaralı hasta örneğinde Atezolizumab uygulamasıyla hücre canlılığında artış ve buna bağlı olarak kaspaz-3/7 aktivasyonlarında azalma tespit edilmiştir (Şekil 28).



Şekil 28. $KRAS^{G12C}$ grubunun kaspaz aktivasyonu ve hücre canlılık analizlerinin çizgi grafikleri. X ekseni; 1. Tümör Hücreleri, 2. Tümör Hücreleri 20 µg/ml Atezolizumab, 3. Ko-Kültür 20 µg/ml Atezolizumab + 150 µg/mL HLA-ABC, 4. Ko-Kültür, 5. Ko-Kültür 20 µg/ml Atezolizumab. Sol Y Ekseni Yüzde Canlılığı temsil etmektedir. Sağ Y ekseni Kaspaz-3/7 aktivitesindeki katlık artışı temsil etmektedir. #Sadece Tümör Hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistik olarak önemli farklılıkları belirtir: # (p <0.001). Veriler ortalama ±SD (n=6) olarak sunulmuştur.

KRAS kodon 12 mutasyonlar dışında kalanlar $KRAS^{Diğer}$ olarak gruplandırıldı. Ko-kültür ortamına ateolizumab eklenmesiyle yapılan analizlerde 34. hasta örneği dışında p53 mutasyonundan bağımsız kaspaz-3/7 aktivasyonları gözlenmiştir. 34. hasta örneğinde ise atezolizumab sitotoksik etki ve kaspaz-3/7 aktivasyonunda anlamlı değişimler oluşturmamıştır (Şekil 29). $KRAS^{WT}$ örneklerde ise ko-kültür deney grubunda sitotoksik etkiler gözlenmiş ($p < 0.001$) ve kaspaz-3/7 aktivasyonları ($p < 0.001$) tespit edilmiştir. Ayrıca ortama atezolizumab eklenmesinin benzer etkilere yol açmıştır. Sadece $KRAS^{WT}$ $p53^{MUT}$ 17. hasta örneğinde atezolizumab uygulanması hücre canlılığını %50'nin altına düşürmüş ve aynı oranda kaspaz-3/7 aktivasyonuna neden olmuştur. Ayrıca 44. hasta örneğinde atezolizumab kaynaklı bir direnç gözlenmektedir.



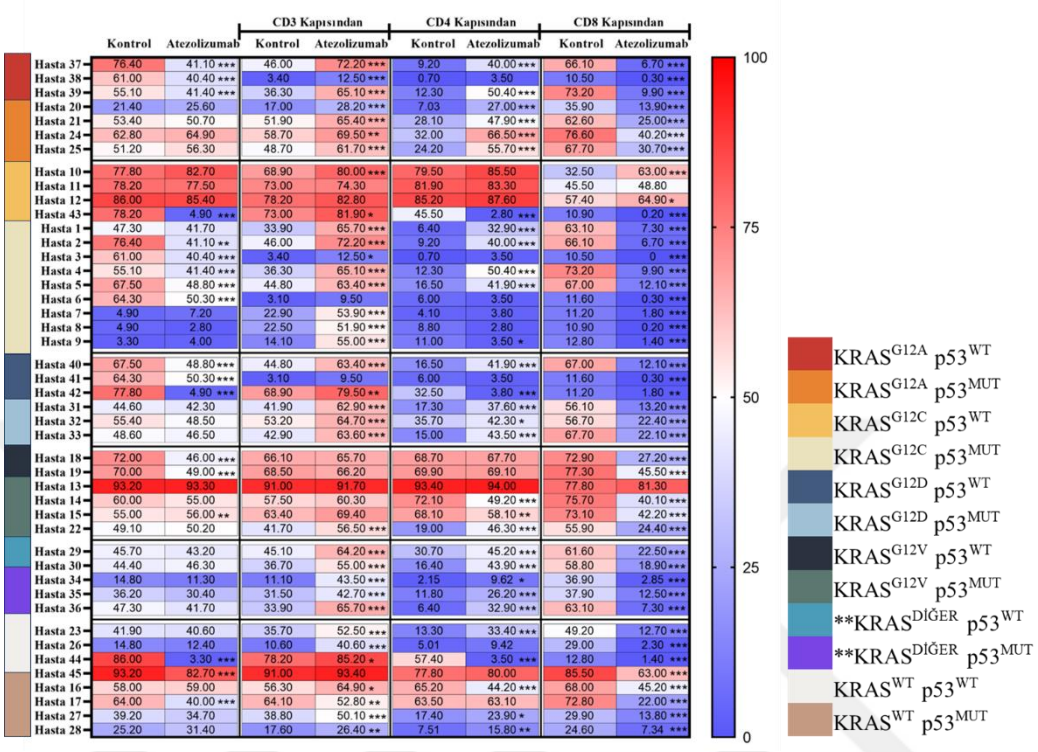
Şekil 29. $KRAS^{Diğer}$ ve p53 mutasyonuna bağlı kaspaz aktivasyonu ve hücre canlılık analizlerinin çizgi grafikleri. X ekseni; 1. Tümör Hücreleri, 2. Tümör Hücreleri 20 µg/ml Atezolizumab, 3. Ko-Kültür 20 µg/ml Atezolizumab + 150 µg/mL HLA-ABC, 4. Ko-Kültür, 5. Ko-Kültür 20 µg/ml Atezolizumab. Sol Y Ekseni Yüzde Canlılığı temsil etmektedir. Sağ Y ekseni Kaspaz-3/7 aktivitesindeki katlık artışı temsil etmektedir.

[#]Sadece Tümör Hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistik olarak önemli farklılıkları belirtir: # ($p < 0.001$). Veriler ortalama ±SD (n=6) olarak sunulmuştur.

4.4.3. T Hücre Proliferasyonlarının Değerlendirilmesi

T hücre proliferasyonları kontrol grubu (Ko-kültür grubu) ve tedavi grubu (Atezolizumab uygulanmış grup) olarak 2 farklı grup altında incelenmiştir. CFSE boyası kullanılarak total proliferasyon analiz edilirken CD3, CD4 ve CD8 antikorları ile T hücre proliferasyonları değerlendirilmiştir. Agresif kanser fenotipi, yüzey PD-L1 ifadesi gibi etmenler T hücre proliferasyonunu etkileyen temel etmenlerdir. Şuana kadar alınan deneysel çıktılar $KRAS^{G12C}$ $p53^{MUT}$ ko-mutant hasta örneklerinde atezolizumab uygulanmasına bir direnç geliştiği görülmektedir. İmmun kontrol noktası inhibitörlerine gelişen direncin T hücre aktivasyonu ve proliferasyonu üzerinde olan etkileri düşünüldüğünde tedavi direncinin gözlendiği örneklerde T hücre proliferasyonunda baskılanma beklenmektedir. $KRAS^{G12A}$ $p53^{WT}$ örneklerde atezolizumab uygulanması sonrasında toplam proliferasyonda yaklaşık %10'luk bir azalma gözlenmiştir. Toplam T hücre proliferasyonunda artış gözlenmesine rağmen $CD8^+$ T hücre proliferasyonlarında dramatik azalmalar bulunmaktadır. Atezolizumab uygulanması sonrası ko-mutant örneklerde ise $CD8^+$ T hücre proliferasyonu ortalama %30 azalmıştır. Ayrıca her iki grupta tedavi sonrası $CD4^+$ T hücre proliferasyonlarında artışlar bulunmaktadır. Ko-mutant örneklerde atezolizumab uygulaması sonrası hücre canlılığındaki azalma ve artan kaspaz aktivasyon sonuçları düşünüldüğünde ortalama %35'lik bir $CD8^+$ T hücre aktivasyonunun tedavi yanıtını pozitif yönde şekillendirdiği görülmektedir (Şekil 30). $KRAS^{G12C}$ ve ko-mutant örneklerde sitotoksisite ve kaspaz aktivasyonu analizleriyle paralel sonuçlar görülmüştür. $KRAS^{G12C}$ $p53^{WT}$ grubunda ko-kültür (kontrol) ve atezolizumab uygulaması arasında $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre proliferasyonlarında artışlar gözlenmiştir. Hatta 10 ve 12. hasta örneklerinde $CD8^+$ T hücre proliferasyonlarındaki artış artmış sitotoksisite ve kaspaz-3/7 aktivasyonlarıyla uyumlu görünmektedir. Sadece 43. numaralı hasta örneğinde atezolizumab uygulanması sonucu $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre proliferasyonı gözlenmemiştir (ortalama %2). Aynı hasta örneği için atezolizumab uygulanması sonucu %78 hücre canlılığının gözlenmesi tedaviye direncini düşündürmüş ve T hücre proliferasyonları da bu durumu onaylar niteliktedir. $KRAS^{G12C}$ $p53^{MUT}$ hasta örneklerinde ise atezolizumab uygulanması sonucu ortalama %4 $CD8^+$ T hücre proliferasyonları gözlenmiştir. Ayrıca atezolizumab uygulaması sonrasında ortalama

%87 hücre canlılığının gözlenmesi, $KRAS^{G12C}$ mutasyonuna eşlik eden p53 ko-mutasyonunun tedavi direnciyle ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

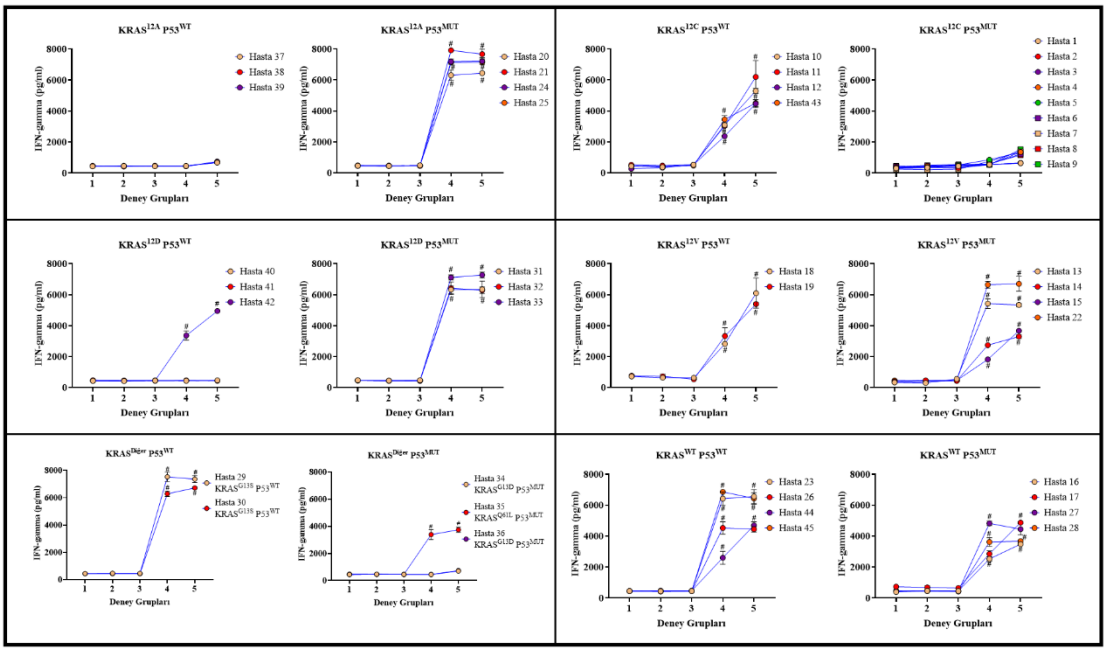


Şekil 30. T hücre proliferasyon sonuçları. **Sadece Tümör Hücreleri ile karşılaştırıldığında istatistik olarak önemli farklılıkları belirtir: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) ve *** ($p < 0.001$). Veriler ortalama ±SD (n=3) olarak sunulmuştur.*

4.4.4. Ko-Kültürlerde IFN-γ Düzeyleri

Apoptozu indükleyen veya hücrelerin apoptoza duyarlı hale gelmesini sağlayan faktörler olarak bir dizi sitokin önerilmiştir. Bu sitokinler içerisinde olan IFN-γ tümör mikroçevresinde çok sayıda bağışıklık hücresi tarafından üretilir. Doğal öldürücü hücreler (Natural Killer, NK Cells) ve $CD8^+$ T lenfositler tümör mikro çevresindeki iki ana IFN-γ'nın üreticisidir. Ayrıca $CD4^+$ T lenfositlerde tümör bölgelerine doğal ve adaptif bağışıklıkta görevli lenfositlerin aktivasyonunu destekleyen IFN-γ salgılarlar. Bu nedenle T hücre kaynaklı sitotoksisiteye paralel artmış IFN-γ seviyelerinin gözlenmesi beklenmektedir. $KRAS^{G12A}$ ve $KRAS^{G12D}$ mutasyonu taşıyan hasta örneklerinde p53 mutasyonunun eşlik etmesiyle atezolizumab ilaç yanıtının yüksek olduğu görülmüştür. Buna paralel p53 ko-mutant hasta örneklerinde yüksek IFN-γ seviyeleri izlenmektedir. $KRAS^{12V}$ mutasyonu taşıyan grupta ise p53 mutasyonundan bağımsız (pozitif veya

negatif) sitotoksik aktivite gözlenmekte ve bu durumun IFN-γ seviyeleriyle de uyumlu olduğu gözlenmiştir. T hücre kaynaklı sitotoksisite ve apoptotik aktivitenin en belirgin farkı $KRAS^{G12C}$ mutant örneklerde gözlenmiştir. Bu durum IFN-γ seviyelerinde de net bir şekilde görülmektedir. Ayrıca diğer mutant hasta gruplarına oranla $KRAS^{G12C}$ grubunda IFN-γ seviyeleri p53 mutasyonuna bağlı değişebilmektedir (Şekil 31).



Şekil 31. IFN-γ ELISA Sonuçları. X ekseni; 1. Tümör Hücreleri, 2. Tümör Hücreleri 20 µg/ml Atezolizumab, 3. Ko-Kültür 20 µg/ml Atezolizumab + 150 µg/mL HLA-ABC, 4. Ko-Kültür, 5. Ko-Kültür 20 µg/ml Atezolizumab. # ($p < 0.001$). Veriler ortalama ±SD (n=6) olarak sunulmuştur. Veriler ortalama ±SD (n=6) olarak sunulmuştur.

4.4.5. Tedavi Yanıtlarına Göre Sınıflandırma

Sitotoksisite analizleri, kaspaz-3/7 aktivasyonları ve IFN-γ seviyelerindeki değişimler kriter olarak alınarak mutasyon alt tiplerine göre tedavi yanıtları değerlendirildi. Genel olarak bakıldığında yapılan analizler sonucu 18 hasta örneğinin anti PD-L1 tedavisine dirençli olduğu belirlenmiştir. 27 hasta örneği ise tedaviye yanıt veren olarak sınıflandırıldı (Şekil 32). $KRAS^{G12C}$ $P53^{MUT}$ ko-mutant grupta %75'in üzerinde hücre canlılığının gözlenmesi, kaspaz-3/7 aktivitesi ve IFN-γ seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişimlerin gözlenmemesi nedeniyle tedaviye dirençli olarak kategorize edilmiştir. Ayrıca T hücre proliferasyonlarının atezolizumab uygulaması sonucu ortalama %4 olarak ölçülmesi ko-kültür ortamında T hücre reaktivitesinin baskılandığını

göstermektedir. 37, 38, 39 numaralı $KRAS^{G12A}$ $P53^{WT}$ mutasyonu taşıyan örnekler ve 40, 41 numaralı $KRAS^{G12D}$ $P53^{WT}$ mutasyonu taşıyan örnekler tedaviye dirençli olarak kategorize edilmiştir. KRAS ve p53 mutasyonu negatif olan gruptan sadece 44. hasta örneğinin tedaviye direnç gösterdiği belirlenmiştir.

No	Mutasyon Durumu		% Hücre Canlılığı ve Kaspaz-3/7 Korelasyonu	% Hücre Canlılığı ve IFN-γ Korelasyonu	Kaspaz-3/7 ve IFN-γ Korelasyonu	Değerlendirme
	KRAS	p53				
Hasta 37	c.35G>C, **G12A**	Negatif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 38	c.35G>C, **G12A**	Negatif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 39	c.35G>C, **G12A**	Negatif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 20	c.35G>C, **G12A**	Pozitif	R^2: 0.9815, p <0.001	R^2: 0.9056, p <0.002	R^2: 0.8411, p <0.001	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 21	c.35G>C, **G12A**	Pozitif	R^2: 0.9041, p <0.001	R^2: 0.9125, p <0.001	R^2: 0.9236, p <0.001	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 24	c.35G>C, **G12A**	Pozitif	R^2: 0.9369, p <0.002	R^2: 0.8137, p <0.002	R^2: 0.8997, p <0.002	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 25	c.35G>C, **G12A**	Pozitif	R^2: 0.8325, p <0.003	R^2: 0.8374, p <0.003	R^2: 0.9879, p <0.003	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 43	c.34G>T, **G12C**	Negatif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 10	c.34G>T, **G12C**	Negatif	R^2: 0.9984, p <0.001	R^2: 0.9864, p <0.001	R^2: 0.9813, p <0.001	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 11	c.34G>T, **G12C**	Negatif	R^2: 0.9988, p <0.001	R^2: 0.9862, p <0.001	R^2: 0.9821, p <0.001	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 12	c.34G>T, **G12C**	Negatif	R^2: 0.9888, p <0.001	R^2: 0.9866, p <0.001	R^2: 0.9933, p <0.001	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 1	c.34G>T, **G12C**	Pozitif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 2	c.34G>T, **G12C**	Pozitif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 3	c.34G>T, **G12C**	Pozitif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 4	c.34G>T, **G12C**	Pozitif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 5	c.34G>T, **G12C**	Pozitif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 6	c.34G>T, **G12C**	Pozitif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 7	c.34G>T, **G12C**	Pozitif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 8	c.34G>T, **G12C**	Pozitif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 9	c.34G>T, **G12C**	Pozitif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 40	c.35G>A, **G12D**	Negatif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 41	c.35G>A, **G12D**	Negatif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 42	c.35G>A, **G12D**	Negatif	R^2: 0.9369, p <0.004	R^2: 0.9882, p <0.004	R^2: 0.9554, p <0.004	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 31	c.35G>A, **G12D**	Pozitif	R^2: 0.9885, p <0.004	R^2: 0.9625, p <0.004	R^2: 0.9335, p <0.004	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 32	c.35G>A, **G12D**	Pozitif	R^2: 0.9748, p <0.004	R^2: 0.9788, p <0.004	R^2: 0.9887 p <0.004	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 33	c.35G>A, **G12D**	Pozitif	R^2: 0.9769, p <0.004	R^2: 0.8987, p <0.004	R^2: 0.9147, p <0.004	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 18	c.35G>T, **G12V**	Negatif	R^2: 0.9922, p <0.001	R^2: 0.9872, p <0.001	R^2: 0.9855, p <0.001	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 19	c.35G>T, **G12V**	Negatif	R^2: 0.9889, p <0.001	R^2: 0.9992, p <0.001	R^2: 0.9962, p <0.001	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 22	c.35G>T, **G12V**	Pozitif	R^2: 0.8222, p <0.001	R^2: 0.8367, p <0.001	R^2: 0.9005, p <0.001	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 13	c.35G>T, **G12V**	Pozitif	R^2: 0.9864, p <0.001	R^2: 0.9831, p <0.001	R^2: 0.9944, p <0.001	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 14	c.35G>T, **G12V**	Pozitif	R^2: 0.9841, p <0.001	R^2: 0.9817, p <0.001	R^2: 0.9894, p <0.001	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 15	c.35G>T, **G12V**	Pozitif	R^2: 0.9915, p <0.001	R^2: 0.9194, p <0.002	R^2: 0.9594, p <0.001	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 29	c.37G>T, **G13S**	Negatif	R^2: 0.9613, p <0.004	R^2: 0.9227, p <0.004	R^2: 0.9777, p <0.004	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 30	c.37G>T, **G13S**	Negatif	R^2: 0.9114, p <0.004	R^2: 0.9633, p <0.004	R^2: 0.9158, p <0.004	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 34	c.38G>A, **G13D**	Pozitif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 35	c.182A>T, **Q61L**	Pozitif	R^2: 0.9487, p <0.004	R^2: 0.9001, p <0.004	R^2: 0.9007, p <0.004	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 36	c.38G>A, **G13D**	Pozitif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 44	Negatif	Negatif	p >0.001	p >0.001	p >0.001	% Hücre Canlılığı %75'in üzerinde olduğu için tedaviye dirençli
Hasta 45	Negatif	Negatif	R^2: 0.9222, p <0.004	R^2: 0.8787, p <0.004	R^2: 0.8997, p <0.004	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 23	Negatif	Negatif	R^2: 0.9147, p <0.001	R^2: 0.8972, p <0.001	R^2: 0.9017, p <0.001	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 26	Negatif	Negatif	R^2: 0.8697, p <0.004	R^2: 0.8788, p <0.004	R^2: 0.9398, p <0.004	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 27	Negatif	Pozitif	R^2: 0.9597, p <0.004	R^2: 0.8562, p <0.004	R^2: 0.9147, p <0.004	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 28	Negatif	Pozitif	R^2: 0.9365, p <0.004	R^2: 0.8367, p <0.004	R^2: 0.9667, p <0.004	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 16	Negatif	Pozitif	R^2: 0.9944, p <0.001	R^2: 0.9708, p <0.001	R^2: 0.9694, p <0.001	Tedaviye Yanıt Veren
Hasta 17	Negatif	Pozitif	R^2: 0.9840, p <0.001	R^2: 0.9611, p <0.001	R^2: 0.9899, p <0.001	Tedaviye Yanıt Veren

Şekil 32. Analizler sonucu elde verilerin korelasyon verileri ve hasta örneklerinin sınıflandırılması.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İleri düzey KHDAK hastalarını tedavi etmek için geleneksel terapötikler (cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve/veya radyoterapi gibi) kullanılmaktadır. Tirozin kinaz inhibitörleri ve ALK inhibitörleri gibi hedefli tedavilerin uygulanmasıyla terapötik etkinlik önemli ölçüde geliştirilmiştir. Bununla birlikte, bu hedefe yönelik tedaviler KHDAK hastalarının ömrünü uzatmak için sadece mükemmel başlangıç sağlayan klinik tepkiler gösterirken direnç gelişimi bu ajanların terapötik etkinliğini sınırlamaktadır (Han vd., 2015; Tsui vd., 2018). Bu nedenle KHDAK hastalarında sağkalım oranını iyileştirmek için yeni tedavi stratejileri veya ajanlarının arayışı başarılı ve heyecan verici klinik faydalar gösteren bağışıklık kontrol noktası blokajı tedavisiyle umut verici bir noktaya gelmiştir (J. Yang vd., 2016). PD-1'e karşı iki antikor (nivolumab ve pembrolizumab) ve PD-L1'e karşı iki antikor (atezolizumab ve durvalumab), FDA ve/veya Avrupa İlaç Ajansı tarafından KHDAK tedavisi için onaylanmıştır (Dang vd., 2016; Garon vd., 2015; Lim vd., 2016; Sul vd., 2016). Tümör ortamında, PD-1 ve PD-L1'in bağlanması, PD-1-pozitif T hücrelerinin aktive T hücresi proliferasyonunu, sitokin salınımını ve sitolitik aktivitesini baskılamakta ve tümör hücresinin konakçı bağışıklık saldırısından kaçabilmelerini sağlamaktadır (Keir vd., 2006). Bu nedenle immünsüpresyondaki önemli rolü göz önüne alındığında bağışıklık kontrol noktası sinyali, antitümör ajanların geliştirilmesi için yeni hedefler olarak kullanılmaktadırlar. Fakat KRAS ve p53 gibi KHDAK'da en sık rastlanan mutasyonlar anti PD-L1 tedavi yanıtları üzerinde etkili olabilmektedir.

Bu tez çalışmasında da KHDAK adenokarsinoma vakalarında en sık rastlanan mutasyonlardan olan KRAS ekzon-12 ve p53 ko-mutasyonu varlığında anti-PD-L1 direncinden sorumlu KRAS mutasyon alt tiplerinin tanımlanması ve immünoterapi öncesi tedavi direncini gösterebilecek moleküler mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla yeni tanı almış ve tedavi geçmişi olmayan 78 hasta örneği temin edilerek ilk olarak EGFR mutasyonu ve ALK, ROS1 yeniden düzenlemeleri açısından değerlendirilmiştir. Çünkü ALK, ROS1 yeniden düzenlemeleri ve EGFR mutasyonlarının PD-L1 ekspresyonu üzerindeki etkilerinden dolayı bu gen değişikliklerini taşıyan KHDAK vakalarında immünoterapi yapılan tedavinin sınırlı veya etkisiz olduğu bilinmektedir (Akbay vd., 2013; Azuma vd., 2014; Gainor vd., 2016; Z.

Liu vd., 2020). KHDAK'da EGFR mutasyon frekansının %30-%40 arasında olduğu (da Cunha Santos vd., 2011; Y.-L. Zhang vd., 2016) bilinmektedir. Benzer şekilde tez çalışmasında oluşturulan hasta kohortunda (n=78) %42 oranında (n=33) EGFR mutasyon frekansına rastlanmıştır.

EGFR mutasyonu ve ALK, ROS1 yeniden düzenlemeleri taşıyan vakalarda bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerine karşı yanıt genel olarak karakterize bir durumdur. Fakat KHDAK'da en sık rastlanan mutasyonlardan olan KRAS nokta kazanım mutasyonları ise tedavi yanıtları açısından "anlaşılmaz" bir hedef olarak tanımlanmıştır (Cox vd., 2014). Çünkü KRAS genindeki 12, 13 veya 61. pozisyonlardaki bu nokta mutasyonları bir amino asit değişimine yol açar ve RAS sinyal yolunun konstitütif aktivasyonuna neden olur. Ayrıca her bir nokta mutasyonun ürettiği stabil proteinler MAPK, PI3K, sinyal transdüseri ve transkripsiyon kaskadlarının aktivatörü gibi çoklu efektörlerle etkileşime girebilmektedir (Bos, 1989; Lei vd., 2020). Bu durum bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri ile yapılan tedavilerde karmaşık yanıtların alınmasına yol açabilmektedir. Bu fenomeni test etmek KRAS ekzon 2 mutasyonları yönünden karakterize edilen hasta örnekleriyle ex-vivo kültür şartlarında anti PD-L1 tedavi yanıtı simüle edilmiştir. G12A, G12C, G12D ve G12V mutasyonu taşıyan örnekler ex-vivo kültür şartlarında atezolizumab tedavisine oldukça farklı profillerde cevap vermiştir. G12A mutasyonu (n=3) atezolizumab uygulamasına direnç gösterirken G12V mutasyonu etiketli (n=2) örneklerin atezolizumab uygulamasına yanıt verdiği gözlenmiştir. Fakat G12C (n=4) ve G12D (n=3) mutasyonu etiketli örnekler heterojen bir yanıt sergilemiştir. Klinik verilerde bu farklılığı doğrular nitelikte olup KRAS mutasyon alt tiplerinin prognostik değerleri açısından heterojenliği çeşitli klinik çalışmalarda analiz edilmiştir. KRAS G12C mutant tümörlü hastaların, diğer KRAS mutasyonlarını veya KRAS vahşi tip tümörlerini barındıran tümörlere kıyasla, hastalıksız sağkalımı (DFS) önemli ölçüde kısalttığı gösterilmiştir (Nadal vd., 2014). Fakat metastatik KRAS mutant akciğer adenokarsinomu olan 677 hastanın bir retrospektif analizinde KRAS mutasyon alt tipine göre sağkalımda fark olmadığı gösterilmiştir (H. A. Yu vd., 2015). KRAS G12C mutasyonu taşıyan akciğer adenokarsinomu olan ve ikinci-üçüncü basamak kemoterapi alan ileri KHDAK'lı hastaların raporlarında yapılan geriye dönük çalışmada ise KRAS G12C mutasyonu daha kısa bir sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Mellema vd., 2015; Svaton vd., 2016) Bağışıklık

kontrol noktası inhibitörlerine karşı farklı yanıt düzeyleri her çalışmada bulunan hasta kohortunun heterojen genomik manzarasından kaynaklı olabilmektedir (Pabla vd., 2019). Bu nedenle KRAS mutant alt tiplerde gözlenen bu heterojen yanıt, KRAS mutant KHDAK'da birlikte meydana gelen genomik değişikliklerin tanımlanmasının yolunu açmıştır. Örneğin KRAS mutasyonuna en sık eşlik eden TP53, CDKN2A/B, STK11 ve KEAP1 mutasyonları klinik sonuçları ve terapötik güvenlik açıklarını derinden etkileyebilmektedir (Arbour vd., 2018; Kitajima vd., 2019; Scheffler vd., 2019; Skoulidis vd., 2015).

Tez çalışmasında ise KRAS'a eşlik eden ve en sık rastlanan ko-mutasyon olan TP53 geninin atezolizumab yanıtı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Klinik araştırma verileri TP53 ve KRAS ko-mutasyonlarının bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğini arttırdığı ve bu ko-mutasyona sahip olan KHDAK hastaları için immünoterapinin olumlu etkisinin altında yatan mekanizmanın daha fazla araştırılması gerektiği bildirilmiştir (Dong & Wu, 2017; Fang vd., 2019). Hücresel analiz verileriyle atezolizumab yanıtının değerlendirilmesi sonucu KRAS G12A, G12D ve G12V mutasyonuna p53 mutasyonunun eşlik etmesi genel olarak atezolizumab yanıtıyla sonuçlanmıştır. Fakat KRAS G12C, p53 ko-mutant örneklerin tamamında atezolizumab uygulanmasına karşı yüksek bir direnç gözlenmiştir. KHDAK hastalarında yapılan geçmişe yönelik bir çalışmada iki ko-mutasyonun pozitif PD-L1 ekspresyonu ile korelasyon gösterdiği ve anti-PD-1/PD-L1 immünoterapisinin etkinliğinde yararlı olabileceği bildirilmiştir (Aredo vd., 2019). Çin popülasyonuna ait KRAS mutant KHDAK hasta kohortunda ise p53 ko-mutasyonlarının immünoterapisinin etkinliği noktasında heterojen veriler bulunmaktadır (Peng vd., 2023).

İmmun kontrol noktası inhibitörlerinde görülebilen yanıt modellerindeki heterojenlik göz önüne alındığında, yanıt verenleri ve yanıt vermeyenleri tanımlamadaki zorluklar devam etmektedir. Çünkü direnç mekanizması kendi içerisinde oldukça heterojen bir profil sergilemektedir. Temelde immun kontrol noktası inhibitörlerinde tedavi başarısızlığı, anti-tümör T hücrelerinin yetersiz üretimi, tümöre özgü T hücrelerinde işlev kaybı ve bozulmuş T hücre hafızası olarak 3 temel adımda gerçekleşir (Anagnostou vd., 2017; Bronte vd., 2005; O'Donnell vd., 2017). Madalyonun bir diğer noktasında ise karmaşık sinyal yolaklarının modüle ettiği tümöre özgü direnç mekanizmaları bulunmaktadır.

İmmun kontrol noktası inhibitör direncine bakış açısı ve gelişen anlayışla beraber MAPK, Wnt/B-Katenin, JAK-STAT, PI3K/AKT/mTOR ve HIF1A gibi çeşitli sinyal yolakları tümöre özgü direnç mekanizmalarında etkin bir şekilde rol aldıkları bildirilmiştir. Ayrıca KRAS ve p53 mutasyonuna bağlı veya bağımsız olarak PD-L1 ekspresyonu ve direnciyle ilişkili JAK-STAT (Owen vd., 2019), Wnt (Spranger vd., 2015) ve MAPK (L. Liu vd., 2015; Loi vd., 2016) gibi ana sinyal yolaklarının etkinliklerine yönelik ileri in-vitro çalışmalar bulunmaktadır. Güncel çalışmalar göz önüne alınarak biyoinformatik yaklaşımlarla anti PD-L1 direncine yönelik oluşturulan gen panelinin KRAS ekzon 2 ve p53 ko-mutasyonlu "TCGA" kohortu hastalarında taranması sonucu p53 ko-mutant KRAS G12C ve KRAS G12V hasta grubunda ifade seviyelerinin değiştiği gözlenmiştir. Özellikle bu iki hasta grubunda WNT, MAPK, PI3K-AKT, RAS/RAF ve immun sistem aracılı sitotoksiteden sorumlu sinyal yolaklarındaki değişimlerin gözlenmesi bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerle tedavi yanıtını da etkileyebilir. Örneğin; MAPK sinyal yolu MHC-I'in içselleştirilmesini artırarak tümörden kaçmayı da teşvik edebilir (Bradley vd., 2015, 2016; Whipple vd., 2016). VEGF ve IL-6/8/10 gibi immün düzenleyici sitokinlerin regülasyonu ile tümör infiltre lenfositlerde (TIL) aktivasyon ve bun bağlı fonksiyon kaybına neden olur (C. Liu vd., 2013; Sumimoto vd., 2006). KRAS G12V p53 ko-mutant grupta (n=12) MAPK yolağın ait 12 adet gen tespit edilmiştir. Genel olarak azalmış ifade seviyelerine sahip bu genler içerisinde MAPK ailesinin düzenleyicisi olan protein tirozin fosfataz reseptörlerinin (PTPR) ekspresyonlarında artış gözlenmiş (ortalama 3 kat) ve MAPK sinyal yolunda aktivasyon kaybı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca KRAS G12V p53 ko-mutant grupta WNT ve PI3K-AKT sinyal yolaklarında görevli genlerin de ekspresyon seviyelerinde genel bir baskılanma bulunmaktadır. Aynı mutasyon profiline sahip hasta örneklerinin hücresel analizlerinin atezolizumab tedavisine yanıt vermesi biyoinformatik verilerle uyuşmaktadır. Özellikle WNT sinyal yolağı aktivatörleri olan WNT4, WNT11, WNT2B, WNT5A ve AXIN2'de gözlenen azalmış gen ekspresyonu sinyal yolağının baskılandığını düşündürmektedir. KRAS G12C mutasyonu (n=29) taşıyan örnek grubunda ise özellikle CD274 yani PD-L1 ekspresyonunun azalması dikkat çekmektedir. PD-L1 gibi bağışıklık kontrol noktası faktörlerinin artmış ekspresyonu immünosupresif hücrelerin ve faktörlerin mikroçevreye alınarak tümör tarafından immünojenik antijen sunumunun azalması ve sonuç olarak "*immünoediting*" olarak adlandırılan bir süreç yoluyla immün mikroçevreyi immünosupresif bir duruma doğru

şekillendirir (Dunn vd., 2004). Tez çalışmasında kullanılan hasta kohortunda G12C mutasyonu taşıyan hasta örneklerinde atezolizumab tedavisine yanıt gözlenmesi biyoinformatik sonuçlarında gözlenen azalmış PD-L1 gen ifadesini doğrulamaktadır.
G12C ve p53 ko-mutant örnek grubunda (n=15) ise KRAS ve HLA-G artmış gen ifade seviyeleri gözlenmiştir. P53 mutasyonlarının benzersiz bir özelliği stabilize mutant p53 proteinlerini üretebilmektedirler (X. Chen vd., 2022). Mutant protein yapıları ise farklı sinyal yolakları üzerinde aktivatör/inhibitör etki gösterebilmektedir. P53 ko-mutasyonunda KRAS gen ekspresyonundaki artış stabilize mutant p53 proteinlerinden kaynaklı olabilmektedir. HLA-G ekspresyonu ise atezolizumab tedavi direnciyle kuvvetli bir ilişkiye sahip olabilir. Çünkü HLA-G normal fizyolojik koşullarda immün baskılayıcı özelliklere sahip, klasik olmayan bir MHC sınıf I molekülüdür. Tümör infiltre eden $CD8^+$ T hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları, tümör hücresi eksprese eden HLA-G tarafından seçici olarak inhibe edilebilir (Dumont vd., 2019). Yapılan analizlerde KRAS G12C ve p53 ko-mutant hasta örneklerinin atezolizumab uygulamasına gösterdikleri direnç bu noktada açıklanabilir.

Tez çalışması maliyeti yüksek olan immünoterapi uygulanmalarında anti-PD-L1 direncinin KRAS ekzon-12 mutasyonlarına eşlik eden p53 ko-mutasyonu taşıyan KHDAK adenokarsinoma vakalarında incelenmesini ve olası biyobelirteçlerin belirlenmesini içermektedir. Yapılan analizler KRAS ekzon 2 mutasyonları ve onlara eşlik eden p53 ko-mutasyonlarının anti PD-L1 tedavisi olan atezolizumab uygulamasına karşı heterojen yanıt profilleri sergilediğini göstermektedir. Özellikle KRAS G12C ve p53 ko-mutasyon grubunda gözlenen atezolizumab direncinin HLA-G ve KRAS gen ekspresyonundaki artışa bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca alınan deneysel çıktıların biyobelirteç olabilme potansiyelleri ileri in-vivo analizlerle test edilerek ortaya konabilecektir.

KAYNAKLAR

Achiwa, H., Oguri, T., Sato, S., Maeda, H., Niimi, T., & Ueda, R. (2004). Determinants of sensitivity and resistance to gemcitabine: The roles of human equilibrative nucleoside transporter 1 and deoxycytidine kinase in non-small cell lung cancer. *Cancer Science*, *95*(9), 753-757. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03257.x

Akbay, E. A., Koyama, S., Carretero, J., Altabef, A., Tchaicha, J. H., Christensen, C. L., Mikse, O. R., Cherniack, A. D., Beauchamp, E. M., Pugh, T. J., Wilkerson, M. D., Fecci, P. E., Butaney, M., Reibel, J. B., Soucheray, M., Cohoon, T. J., Janne, P. A., Meyerson, M., Hayes, D. N., … Wong, K. K. (2013). Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discovery*, *3*(12), 1355-1363. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0310

Aktar, N., Yueting, C., Abbas, M., Zafar, H., Paiva-Santos, A. C., Zhang, Q., Chen, T., Ahmed, M., Raza, F., & Zhou, X. (2022). Understanding of Immune Escape Mechanisms and Advances in Cancer Immunotherapy. *Journal of Oncology*, *2022*, 1-13. https://doi.org/10.1155/2022/8901326

Amarante-Mendes, G. P., Adjemian, S., Branco, L. M., Zanetti, L. C., Weinlich, R., & Bortoluci, K. R. (2018). Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Frontiers in Immunology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02379

Anagnostou, V., Smith, K. N., Forde, P. M., Niknafs, N., Bhattacharya, R., White, J., Zhang, T., Adleff, V., Phallen, J., Wali, N., Hruban, C., Guthrie, V. B., Rodgers, K., Naidoo, J., Kang, H., Sharfman, W., Georgiades, C., Verde, F., Illei, P., … Velculescu, V. E. (2017). Evolution of Neoantigen Landscape during Immune Checkpoint Blockade in Non–Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discovery*, *7*(3), 264-276. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0828

Ao, M.-H., Zhang, H., Sakowski, L., Sharma, R., Illei, P. B., Gabrielson, E., Askin, F., & Li, Q. K. (2014). The utility of a novel triple marker (combination of TTF1, napsin A, and p40) in the subclassification of non–small cell lung cancer. *Human Pathology*, *45*(5), 926-934. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.01.005

Arany, I., Tyring, S. K., Brysk, H., & Brysk, M. M. (1998). Induction by interferon-γ of its receptor varies with epithelial differentiation and cell type. *Archives of Dermatological Research*, *290*(6), 331-334. https://doi.org/10.1007/s004030050313

Arbour, K. C., Jordan, E., Kim, H. R., Dienstag, J., Yu, H. A., Sanchez-Vega, F., Lito, P., Berger, M., Solit, D. B., Hellmann, M., Kris, M. G., Rudin, C. M., Ni, A., Arcila, M., Ladanyi, M., & Riely, G. J. (2018). Effects of co-occurring genomic alterations on outcomes in patients with KRAS-mutant non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, *24*(2), 334-340. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1841

Aredo, J. V, Padda, S. K., Kunder, C. A., Han, S. S., Neal, J. W., Shrager, J. B., & Wakelee, H. A. (2019). Impact of KRAS mutation subtype and concurrent pathogenic mutations on non-small cell lung cancer outcomes. *Lung Cancer*, *133*, 144-150. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.05.015

Asgarova, A., Asgarov, K., Godet, Y., Peixoto, P., Nadaradjane, A., Boyer-Guittaut, M., Galaine, J., Guenat, D., Mougey, V., Perrard, J., Pallandre, J. R., Bouard, A., Balland, J., Tirole, C., Adotevi, O., Hendrick, E., Herfs, M., Cartron, P. F., Borg, C., & Hervouet, E. (2018). PD-L1 expression is regulated by both DNA methylation and NF-kB during EMT signaling in non-small cell lung carcinoma.

OncoImmunology, *7*(5), e1423170-e1423170. https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1423170

Azuma, K., Ota, K., Kawahara, A., Hattori, S., Iwama, E., Harada, T., Matsumoto, K., Takayama, K., Takamori, S., Kage, M., Hoshino, T., Nakanishi, Y., & Okamoto, I. (2014). Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, *25*(10), 1935-1940. https://doi.org/10.1093/annonc/mdu242

Azzopardi, J. G. (1959). Oat-cell carcinoma of the bronchus. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, *78*(2), 513-519. https://doi.org/10.1002/path.1700780218

Baranyi, M., Buday, L., & Hegedűs, B. (2020). K-Ras prenylation as a potential anticancer target. *Cancer and Metastasis Reviews*, *39*(4), 1127-1141. https://doi.org/10.1007/s10555-020-09902-w

Barbacid, M. (1987). Ras GENES. *Annual Review of Biochemistry*, *56*(1), 779-827. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.004023

Barbone, F., Bovenzi, M., Cavallieri, F., & Stanta, G. (1997). Cigarette Smoking and Histologic Type of Lung Cancer in Men. *Chest*, *112*(6), 1474-1479. https://doi.org/10.1378/chest.112.6.1474

Barnard, W. G. (1926). The nature of the "oat-celled sarcoma" of the mediastinum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, *29*(3), 241-244. https://doi.org/10.1002/path.1700290304

Barquet, N. (1997). Smallpox: The Triumph over the Most Terrible of the Ministers of Death. *Annals of Internal Medicine*, *127*(8_Part_1), 635. https://doi.org/10.7326/0003-4819-127-8_Part_1-199710150-00010

Bar-Sagi, D., Knelson, E. H., & Sequist, L. V. (2020). A bright future for KRAS inhibitors. *Nature Cancer*, *1*(1), 25-27. https://doi.org/10.1038/s43018-019-0016-8

Betzler, A. C., Theodoraki, M. N., Schuler, P. J., Döscher, J., Laban, S., Hoffmann, T. K., & Brunner, C. (2020). NF-κB and its role in checkpoint control. Içinde *International Journal of Molecular Sciences* (C. 21, Sayı 11). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms21113949

Boasso, A., Herbeuval, J.-P., Hardy, A. W., Winkler, C., & Shearer, G. M. (2005). Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells. *Blood*, *105*(4), 1574-1581. https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2089

Bos, J. L., Rehmann, H., & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell*, *129*(5), 865-877. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018

Boutelle, A. M., & Attardi, L. D. (2021). p53 and Tumor Suppression: It Takes a Network. *Trends in Cell Biology*, *31*(4), 298-310. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.12.011

Bradley, S. D., Chen, Z., Melendez, B., Talukder, A., Khalili, J. S., Rodriguez-Cruz, T., Liu, S., Whittington, M., Deng, W., Li, F., Bernatchez, C., Radvanyi, L. G., Davies, M. A., Hwu, P., & Lizée, G. (2015). BRAFV600E Co-opts a Conserved MHC Class I Internalization Pathway to Diminish Antigen Presentation and CD8+ T-cell Recognition of Melanoma. *Cancer Immunology Research*, *3*(6), 602-609. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0030

Bradley, S. D., Melendez, B., Talukder, A., & Lizée, G. (2016). Trouble at the core: BRAF(V600E) drives multiple modes of T-cell suppression in melanoma.

OncoImmunology, *5*(2), e1078966. https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1078966

Brambilla, E., Moro, D., Veale, D., Brichon, P. Y., Stoebner, P., Paramelle, B., & Brambilla, C. (1992). Basal cell (basaloid) carcinoma of the lung: A new morphologic and phenotypic entity with separate prognostic significance. *Human Pathology*, *23*(9), 993-1003. https://doi.org/10.1016/0046-8177(92)90260-A

Bronte, V., Kasic, T., Gri, G., Gallana, K., Borsellino, G., Marigo, I., Battistini, L., Iafrate, M., Prayer-Galetti, T., Pagano, F., & Viola, A. (2005). Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *The Journal of Experimental Medicine*, *201*(8), 1257-1268. https://doi.org/10.1084/jem.20042028

Brunnström, H., Johansson, L., Jirström, K., Jönsson, M., Jönsson, P., & Planck, M. (2013). Immunohistochemistry in the Differential Diagnostics of Primary Lung Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, *140*(1), 37-46. https://doi.org/10.1309/AJCP50RDXSCSBTBO

Burr, M. L., Sparbier, C. E., Chan, K. L., Chan, Y.-C., Kersbergen, A., Lam, E. Y. N., Azidis-Yates, E., Vassiliadis, D., Bell, C. C., Gilan, O., Jackson, S., Tan, L., Wong, S. Q., Hollizeck, S., Michalak, E. M., Siddle, H. V., McCabe, M. T., Prinjha, R. K., Guerra, G. R., … Dawson, M. A. (2019). An Evolutionarily Conserved Function of Polycomb Silences the MHC Class I Antigen Presentation Pathway and Enables Immune Evasion in Cancer. *Cancer Cell*, *36*(4), 385-401.e8. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.08.008

Cameron, F., Whiteside, G., & Perry, C. (2011). Ipilimumab. *Drugs*, *71*(8), 1093-1104. https://doi.org/10.2165/11594010-000000000-00000

Carbon, S., Douglass, E., Dunn, N., Good, B., Harris, N. L., Lewis, S. E., Mungall, C. J., Basu, S., Chisholm, R. L., Dodson, R. J., Hartline, E., Fey, P., Thomas, P. D., Albou, L. P., Ebert, D., Kesling, M. J., Mi, H., Muruganujan, A., Huang, X., … Westerfield, M. (2019). The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D330-D338. https://doi.org/10.1093/nar/gky1055

Carella, R., Deleonardi, G., D'Errico, A., Salerno, A., Egarter–Vigl, E., Seebacher, C., Donazzan, G., & Grigioni, W. F. (2001). Immunohistochemical Panels For Differentiating Epithelial Malignant Mesothelioma From Lung Adenocarcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, *25*(1), 43-50. https://doi.org/10.1097/00000478-200101000-00004

Carlile, A., & Edwards, C. (1986). Poorly differentiated squamous carcinoma of the bronchus: a light and electron microscopic study. *Journal of Clinical Pathology*, *39*(3), 284-292. https://doi.org/10.1136/jcp.39.3.284

Carney, D. N., Gazdar, A. F., Bepler, G., Guccion, J. G., Marangos, P. J., Moody, T. W., Zweig, M. H., & Minna, J. D. (1985). Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer research*, *45*(6), 2913-2923.

Carter, B. W., Glisson, B. S., Truong, M. T., & Erasmus, J. J. (2014). Small Cell Lung Carcinoma: Staging, Imaging, and Treatment Considerations. *RadioGraphics*, *34*(6), 1707-1721. https://doi.org/10.1148/rg.346140178

Castagnoli, L., Cancila, V., Cordoba-Romero, S. L., Faraci, S., Talarico, G., Belmonte, B., Iorio, M. V., Milani, M., Volpari, T., Chiodoni, C., Hidalgo-Miranda, A., Tagliabue, E., Tripodo, C., Sangaletti, S., Di Nicola, M., & Pupa, S. M. (2019). WNT signaling modulates PD-L1 expression in the stem cell compartment of triple-

negative breast cancer. *Oncogene*, *38*(21), 4047-4060. https://doi.org/10.1038/s41388-019-0700-2

Cattaneo, C. M., Dijkstra, K. K., Fanchi, L. F., Kelderman, S., Kaing, S., van Rooij, N., van den Brink, S., Schumacher, T. N., & Voest, E. E. (2020). Tumor organoid–T-cell coculture systems. *Nature Protocols*, *15*(1), 15-39. https://doi.org/10.1038/s41596-019-0232-9

Chang, E. H., Gonda, M. A., Ellis, R. W., Scolnick, E. M., & Lowy, D. R. (1982). Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(16), 4848-4852. https://doi.org/10.1073/pnas.79.16.4848

Chasov, V., Mirgayazova, R., Zmievskaya, E., Khadiullina, R., Valiullina, A., Stephenson Clarke, J., Rizvanov, A., Baud, M. G. J., & Bulatov, E. (2020). Key Players in the Mutant p53 Team: Small Molecules, Gene Editing, Immunotherapy. *Frontiers in Oncology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01460

Chen, B., Li, L., Li, M., & Wang, X. (2020). HIF1A expression correlates with increased tumor immune and stromal signatures and aggressive phenotypes in human cancers. *Cellular Oncology*, *43*(5), 877-888. https://doi.org/10.1007/s13402-020-00534-4

Chen, R., Yang, X., Ding, Z., Zhu, L., Lu, S., & Yu, Y. (2019). Lung squamous cell carcinoma: A postoperative recurrence analysis of keratinizing and nonkeratinizing subtypes. *European Journal of Surgical Oncology*, *45*(5), 838-844. https://doi.org/10.1016/j.ejso.2018.10.535

Chen, X., Zhang, T., Su, W., Dou, Z., Zhao, D., Jin, X., Lei, H., Wang, J., Xie, X., Cheng, B., Li, Q., Zhang, H., & Di, C. (2022). Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. *Cell Death & Disease*, *13*(11), 974. https://doi.org/10.1038/s41419-022-05408-1

Cheng, Y., Zhang, T., & Xu, Q. (2021). Therapeutic advances in non-small cell lung cancer: Focus on clinical development of targeted therapy and immunotherapy. *MedComm*, *2*(4), 692-729. https://doi.org/10.1002/mco2.105

Chiang, Y.-T., Chien, Y.-C., Lin, Y.-H., Wu, H.-H., Lee, D.-F., & Yu, Y.-L. (2021). The Function of the Mutant p53-R175H in Cancer. *Cancers*, *13*(16), 4088. https://doi.org/10.3390/cancers13164088

Clark, D. P. (2018). Biomarkers for immune checkpoint inhibitors: The importance of tumor topography and the challenges to cytopathology. *Cancer Cytopathology*, *126*(1), 11-19. https://doi.org/10.1002/cncy.21951

Collisson, E. A., Campbell, J. D., Brooks, A. N., Berger, A. H., Lee, W., Chmielecki, J., Beer, D. G., Cope, L., Creighton, C. J., Danilova, L., Ding, L., Getz, G., Hammerman, P. S., Hayes, D. N., Hernandez, B., Herman, J. G., Heymach, J. V., Jurisica, I., Kucherlapati, R., … Cheney, R. (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma: The cancer genome atlas research network. *Nature*, *511*(7511), 543-550. https://doi.org/10.1038/nature13385

Cooper, D., Schermer, A., & Sun, T. T. (1985). Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *52*(3), 243-256.

Costa, D. C. F., de Oliveira, G. A. P., Cino, E. A., Soares, I. N., Rangel, L. P., & Silva, J. L. (2016). Aggregation and Prion-Like Properties of Misfolded Tumor Suppressors: Is Cancer a Prion Disease? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(10), a023614. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023614

Cox, A. D., Fesik, S. W., Kimmelman, A. C., Luo, J., & Der, C. J. (2014). Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nature Reviews Drug Discovery*, *13*(11), 828-851. https://doi.org/10.1038/nrd4389

Crapanzano, J. P., Loukeris, K., Borczuk, A. C., & Saqi, A. (2011). Cytological, histological, and immunohistochemical findings of pulmonary carcinomas with basaloid features. *Diagnostic Cytopathology*, *39*(2), 92-100. https://doi.org/10.1002/dc.21335

Cross, D. A. E., Ashton, S. E., Ghiorghiu, S., Eberlein, C., Nebhan, C. A., Spitzler, P. J., Orme, J. P., Finlay, M. R. V., Ward, R. A., Mellor, M. J., Hughes, G., Rahi, A., Jacobs, V. N., Brewer, M. R., Ichihara, E., Sun, J., Jin, H., Ballard, P., Al-Kadhimi, K., … Pao, W. (2014). AZD9291, an Irreversible EGFR TKI, Overcomes T790M-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer Discovery*, *4*(9), 1046-1061. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0337

da Cunha Santos, G., Shepherd, F. A., & Tsao, M. S. (2011). EGFR Mutations and Lung Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *6*(1), 49-69. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130206

Dang, T. O., Ogunniyi, A., Barbee, M. S., & Drilon, A. (2016). Pembrolizumab for the treatment of PD-L1 positive advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *16*(1), 13-20. https://doi.org/10.1586/14737140.2016.1123626

Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, *740*, 364-378. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025

Daud, A. I., Wolchok, J. D., Robert, C., Hwu, W.-J., Weber, J. S., Ribas, A., Hodi, F. S., Joshua, A. M., Kefford, R., Hersey, P., Joseph, R., Gangadhar, T. C., Dronca, R., Patnaik, A., Zarour, H., Roach, C., Toland, G., Lunceford, J. K., Li, X. N., … Hamid, O. (2016). Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti–Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, *34*(34), 4102-4109. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.2477

Deng, R., Bumbaca, D., Pastuskovas, C. V, Boswell, C. A., West, D., Cowan, K. J., Chiu, H., McBride, J., Johnson, C., Xin, Y., Koeppen, H., Leabman, M., & Iyer, S. (2016). Preclinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, tissue distribution, and tumor penetration of anti-PD-L1 monoclonal antibody, an immune checkpoint inhibitor. *mAbs*, *8*(3), 593-603. https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1136043

Dersh, D., Phelan, J. D., Gumina, M. E., Wang, B., Arbuckle, J. H., Holly, J., Kishton, R. J., Markowitz, T. E., Seedhom, M. O., Fridlyand, N., Wright, G. W., Huang, D. W., Ceribelli, M., Thomas, C. J., Lack, J. B., Restifo, N. P., Kristie, T. M., Staudt, L. M., & Yewdell, J. W. (2021). Genome-wide Screens Identify Lineage- and Tumor-Specific Genes Modulating MHC-I- and MHC-II-Restricted Immunosurveillance of Human Lymphomas. *Immunity*, *54*(1), 116-131.e10. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.002

Dijkstra, K. K., Cattaneo, C. M., Weeber, F., Chalabi, M., van de Haar, J., Fanchi, L. F., Slagter, M., van der Velden, D. L., Kaing, S., Kelderman, S., van Rooij, N., van Leerdam, M. E., Depla, A., Smit, E. F., Hartemink, K. J., de Groot, R., Wolkers, M. C., Sachs, N., Snaebjornsson, P., … Voest, E. E. (2018). Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell*, *174*(6), 1586-1598.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.009

Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A. K., Moore, M., Finlay, C., & Levine, A. J. (1993). Gain of function mutations in p53. *Nature Genetics*, *4*(1), 42-46. https://doi.org/10.1038/ng0593-42

Dong, Z. Y., & Wu, Y. L. (2017). What is the significance of TP53 and KRAS mutation for immunotherapy in non-small cell lung cancer? *Translational Cancer Research*, *6*, S1115-S1117. https://doi.org/10.21037/tcr.2017.06.25

Doroshow, D. B., Sanmamed, M. F., Hastings, K., Politi, K., Rimm, D. L., Chen, L., Melero, I., Schalper, K. A., & Herbst, R. S. (2019). Immunotherapy in non-small cell lung cancer: Facts and hopes. *Clinical Cancer Research*, *25*(15), 4592-4602. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1538

Drilon, A., Rekhtman, N., Ladanyi, M., & Paik, P. (2012). Squamous-cell carcinomas of the lung: emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy. *The Lancet Oncology*, *13*(10), e418-e426. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70291-7

Drugan, J. K., Rogers-Graham, K., Gilmer, T., Campbell, S., & Clark, G. J. (2000). The Ras/p120 GTPase-activating Protein (GAP) Interaction Is Regulated by the p120 GAP Pleckstrin Homology Domain. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(45), 35021-35027. https://doi.org/10.1074/jbc.M004386200

Dubey, S., & Schiller, J. H. (2005). Three Emerging New Drugs for NSCLC: Pemetrexed, Bortezomib, and Cetuximab. *The Oncologist*, *10*(4), 282-291. https://doi.org/10.1634/theoncologist.10-4-282

Duma, N., Santana-Davila, R., & Molina, J. R. (2019). Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, *94*(8), 1623-1640. https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013

Dumont, C., Jacquier, A., Verine, J., Noel, F., Goujon, A., Wu, C.-L., Hung, T.-M., Desgrandchamps, F., Culine, S., Carosella, E. D., Rouas-Freiss, N., & LeMaoult, J. (2019). CD8+PD-1–ILT2+ T Cells Are an Intratumoral Cytotoxic Population Selectively Inhibited by the Immune-Checkpoint HLA-G. *Cancer Immunology Research*, *7*(10), 1619-1632. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0764

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, *3*(11), 991-998. https://doi.org/10.1038/ni1102-991

Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004a). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*, *21*(2), 137-148. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017

Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004b). The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*, *22*(1), 329-360. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803

Ettinger, D. S., Akerley, W., Borghaei, H., Chang, A. C., Cheney, R. T., Chirieac, L. R., D'Amico, T. A., Demmy, T. L., Govindan, R., Grannis, F. W., Grant, S. C., Horn, L., Jahan, T. M., Komaki, R., Kong, F.-M. (Spring), Kris, M. G., Krug, L. M., Lackner, R. P., Lennes, I. T., … Hughes, M. (2013). Non–Small Cell Lung Cancer, Version 2.2013. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, *11*(6), 645-653. https://doi.org/10.6004/jnccn.2013.0084

Ettinger, D. S., Wood, D. E., Aisner, D. L., Akerley, W., Bauman, J. R., Bharat, A., Bruno, D. S., Chang, J. Y., Chirieac, L. R., D'Amico, T. A., DeCamp, M., Dilling, T. J., Dowell, J., Gettinger, S., Grotz, T. E., Gubens, M. A., Hegde, A., Lackner, R. P., Lanuti, M., … Hughes, M. (2022). Non–Small Cell Lung Cancer, Version

3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, *20*(5), 497-530. https://doi.org/10.6004/jnccn.2022.0025

Fallarino, F., Fields, P. E., & Gajewski, T. F. (1998). B7-1 Engagement of Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 Inhibits T Cell Activation in the Absence of CD28. *The Journal of Experimental Medicine*, *188*(1), 205-210. https://doi.org/10.1084/jem.188.1.205

Fang, C., Zhang, C., Zhao, W. Q., Hu, W. W., Wu, J., & Ji, M. (2019). Co-mutations of TP53 and KRAS serve as potential biomarkers for immune checkpoint blockade in squamous-cell non-small cell lung cancer: A case report. *BMC Medical Genomics*, *12*(1). https://doi.org/10.1186/s12920-019-0592-6

Farkona, S., Diamandis, E. P., & Blasutig, I. M. (2016). Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer? *BMC Medicine*, *14*(1), 1-18. https://doi.org/10.1186/s12916-016-0623-5

Fell, J. B., Fischer, J. P., Baer, B. R., Blake, J. F., Bouhana, K., Briere, D. M., Brown, K. D., Burgess, L. E., Burns, A. C., Burkard, M. R., Chiang, H., Chicarelli, M. J., Cook, A. W., Gaudino, J. J., Hallin, J., Hanson, L., Hartley, D. P., Hicken, E. J., Hingorani, G. P., … Marx, M. A. (2020). Identification of the Clinical Development Candidate **MRTX849** , a Covalent KRAS ^{G12C} Inhibitor for the Treatment of Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, *63*(13), 6679-6693. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b02052

Folpe, A. L., Gown, A. M., Lamps, L. W., Garcia, R., Dail, D. H., Zarbo, R. J., & Schmidt, R. A. (1999). Thyroid transcription factor-1: immunohistochemical evaluation in pulmonary neuroendocrine tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *12*(1), 5-8.

Funai, K., Yokose, T., Ishii, G., Araki, K., Yoshida, J., Nishimura, M., Nagai, K., Nishiwaki, Y., & Ochiai, A. (2003). Clinicopathologic Characteristics of Peripheral Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *The American Journal of Surgical Pathology*, *27*(7), 978-984. https://doi.org/10.1097/00000478-200307000-00013

Gainor, J. F., Shaw, A. T., Sequist, L. V., Fu, X., Azzoli, C. G., Piotrowska, Z., Huynh, T. G., Zhao, L., Fulton, L., Schultz, K. R., Howe, E., Farago, A. F., Sullivan, R. J., Stone, J. R., Digumarthy, S., Moran, T., Hata, A. N., Yagi, Y., Yeap, B. Y., … Mino-Kenudson, M. (2016). EGFR mutations and ALK rearrangements are associated with low response rates to PD-1 pathway blockade in non-small cell lung cancer: A retrospective analysis. *Clinical Cancer Research*, *22*(18), 4585-4593. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-3101

Garassino, M. C., Marabese, M., Rusconi, P., Rulli, E., Martelli, O., Farina, G., Scanni, A., & Broggini, M. (2011). Different types of K-Ras mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, *22*(1), 235-237. https://doi.org/10.1093/annonc/mdq680

Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Moreno, B. H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G. A., Zaretsky, J. M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., Parisi, G., Saus, C. P., Torrejon, D. Y., Graeber, T. G., Comin-Anduix, B., Hu-Lieskovan, S., Damoiseaux, R., Lo, R. S., & Ribas, A. (2017). Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Reports*, *19*(6), 1189-1201. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.031

Garcia-Robledo, J. E., Rosell, R., Ruíz-Patiño, A., Sotelo, C., Arrieta, O., Zatarain-Barrón, L., Ordoñez, C., Jaller, E., Rojas, L., Russo, A., de Miguel-Pérez, D., Rolfo,

C., & Cardona, A. F. (2022). KRAS and MET in non-small-cell lung cancer: two of the new kids on the 'drivers' block. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, *16*, 175346662110660. https://doi.org/10.1177/17534666211066064

Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A. S., Eder, J. P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M.-J., Felip, E., Lee, J.-S., Hellmann, M. D., Hamid, O., Goldman, J. W., Soria, J.-C., Dolled-Filhart, M., … Gandhi, L. (2015). Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, *372*(21), 2018-2028. https://doi.org/10.1056/nejmoa1501824

Gazdar, A. F., Bunn, P. A., & Minna, J. D. (2017). Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nature Reviews Cancer*, *17*(12), 725-737. https://doi.org/10.1038/nrc.2017.87

Gazdar, A. F., Carney, D. N., Nau, M. M., & Minna, J. D. (1985). Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer research*, *45*(6), 2924-2930.

George, J., Lim, J. S., Jang, S. J., Cun, Y., Ozretić, L., Kong, G., Leenders, F., Lu, X., Fernández-Cuesta, L., Bosco, G., Müller, C., Dahmen, I., Jahchan, N. S., Park, K.-S., Yang, D., Karnezis, A. N., Vaka, D., Torres, A., Wang, M. S., … Thomas, R. K. (2015). Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, *524*(7563), 47-53. https://doi.org/10.1038/nature14664

Giovino, G. A., Mirza, S. A., Samet, J. M., Gupta, P. C., Jarvis, M. J., Bhala, N., Peto, R., Zatonski, W., Hsia, J., Morton, J., Palipudi, K. M., & Asma, S. (2012). Tobacco use in 3 billion individuals from 16 countries: an analysis of nationally representative cross-sectional household surveys. *The Lancet*, *380*(9842), 668-679. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61085-X

Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W. E. E., Nicholson, A. G., Groome, P., Mitchell, A., Bolejack, V., Goldstraw, P., Rami-Porta, R., Asamura, H., Ball, D., Beer, D. G., Beyruti, R., Bolejack, V., Chansky, K., Crowley, J., … Yokoi, K. (2016). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, *11*(1), 39-51. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.09.009

Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Fioretti, M. C., & Puccetti, P. (2002). CTLA-4–Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature Immunology*, *3*(11), 1097-1101. https://doi.org/10.1038/ni846

Guo, L., Lin, Y., & Kwok, H. F. (2017). The function and regulation of PD-L1 in immunotherapy. *ADMET and DMPK*, *5*(3), 159-172. https://doi.org/10.5599/admet.5.3.442

Haerting, F. H. (t.y.). Der Lungenkrebs, die Bergkrankheit in den Schneeberger Gruben. *Med. Óffentl. Ges. wesen 30: 296*, *309*, 661-668.

Hafner, A., Bulyk, M. L., Jambhekar, A., & Lahav, G. (2019). The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(4), 199-210. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0110-x

Hallin, J., Engstrom, L. D., Hargis, L., Calinisan, A., Aranda, R., Briere, D. M., Sudhakar, N., Bowcut, V., Baer, B. R., Ballard, J. A., Burkard, M. R., Fell, J. B., Fischer, J. P., Vigers, G. P., Xue, Y., Gatto, S., Fernandez-Banet, J., Pavlicek, A., Velastagui, K.,

… Christensen, J. G. (2020). The KRASG12C Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients. *Cancer Discovery*, *10*(1), 54-71. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1167

Hamburger, P. (2005). Cogwheels of the mind. The story of venn diagrams. *The Mathematical Intelligencer*, *27*(4), 36-38. https://doi.org/10.1007/bf02985858

Han, F., He, J., Li, F., Yang, J., Wei, J., Cho, W. C., & Liu, X. (2015). Emerging roles of microRNAs in EGFR-targeted therapies for lung cancer. *BioMed Research International*, *2015*. https://doi.org/10.1155/2015/672759

Hanel, W., Marchenko, N., Xu, S., Xiaofeng Yu, S., Weng, W., & Moll, U. (2013). Two hot spot mutant p53 mouse models display differential gain of function in tumorigenesis. *Cell Death & Differentiation*, *20*(7), 898-909. https://doi.org/10.1038/cdd.2013.17

Hanna, N. H., Schneider, B. J., Temin, S., Baker, S., Brahmer, J., Ellis, P. M., Gaspar, L. E., Haddad, R. Y., Hesketh, P. J., Jain, D., Jaiyesimi, I., Johnson, D. H., Leighl, N. B., Phillips, T., Riely, G. J., Robinson, A. G., Rosell, R., Schiller, J. H., Singh, N., … Masters, G. (2020). Therapy for stage IV non–small-cell lung cancer without driver alterations: ASCO and OH (CCO) joint guideline update. *Journal of Clinical Oncology*, *38*(14), 1608-1632. https://doi.org/10.1200/JCO.19.03022

Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, *553*(7689), 446-454. https://doi.org/10.1038/nature25183

Hernández Borrero, L. J., & El-Deiry, W. S. (2021). Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1876*(1), 188556. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188556

Hibi, K., Trink, B., Patturajan, M., Westra, W. H., Caballero, O. L., Hill, D. E., Ratovitski, E. A., Jen, J., & Sidransky, D. (2000). *AIS* is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(10), 5462-5467. https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5462

Hirano, T., Auer, G., Maeda, M., Hagiwara, Y., Okada, S., Ohira, T., Okuzawa, K., Fujioka, K., Franzén, B., Hibi, N., Seito, T., Ebihara, Y., & Kato, H. (2000). Human Tissue Distribution of TA02, Which is Homologous with a New Type of Aspartic Proteinase, Napsin A. *Japanese Journal of Cancer Research*, *91*(10), 1015-1021. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2000.tb00879.x

Hirano, T., Franzén, B., Uryu, K., Okuzawa, K., Alaiya, A., Vanky, F., Rodrigues, L., Ebihara, Y., Kato, H., & Auer, G. (1995). Detection of polypeptides associated with the histopathological differentiation of primary lung carcinoma. *British Journal of Cancer*, *72*(4), 840-848. https://doi.org/10.1038/bjc.1995.422

Holt, G. E., Podack, E. R., & Raez, L. E. (2011). Immunotherapy as a strategy for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Therapy*, *8*(1), 43-54. https://doi.org/10.2217/thy.10.84

Hong, D. S., Fakih, M. G., Strickler, J. H., Desai, J., Durm, G. A., Shapiro, G. I., Falchook, G. S., Price, T. J., Sacher, A., Denlinger, C. S., Bang, Y.-J., Dy, G. K., Krauss, J. C., Kuboki, Y., Kuo, J. C., Coveler, A. L., Park, K., Kim, T. W., Barlesi, F., … Li, B. T. (2020). KRAS ^{G12C} Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *New England Journal of Medicine*, *383*(13), 1207-1217. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1917239

Hong, D. S., Strickler, J. H., Fakih, M., Falchook, G. S., Li, B. T., Durm, G. A., Burns, T. F., Ramalingam, S. S., Goldberg, S. B., Frank, R. C., Marrone, K., Shu, C. A., Gandara, D. R., Soman, N., Henary, H. A., & Govindan, R. (2021). Trial in progress: A phase 1b study of sotorasib, a specific and irreversible KRAS ^{G12C} inhibitor, as monotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC) with brain metastasis and in combination with other anticancer therapies in advanced solid tumors (CodeBreaK 101). *Journal of Clinical Oncology*, *39*(15_suppl), TPS2669-TPS2669. https://doi.org/10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.TPS2669

Horn, L., Mansfield, A. S., Szczęsna, A., Havel, L., Krzakowski, M., Hochmair, M. J., Huemer, F., Losonczy, G., Johnson, M. L., Nishio, M., Reck, M., Mok, T., Lam, S., Shames, D. S., Liu, J., Ding, B., Lopez-Chavez, A., Kabbinavar, F., Lin, W., … Liu, S. V. (2018). First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, *379*(23), 2220-2229. https://doi.org/10.1056/nejmoa1809064

Hosny Mohammed, K., Ewaz, A., Cohen, C., & Siddiqui, M. T. (2017). Double staining: diagnostic utility in non-small cell lung carcinoma in the era of tissue conservation. *Journal of the American Society of Cytopathology*, *6*(4), 170-175. https://doi.org/10.1016/j.jasc.2017.05.003

Hosseinkhani, N., Derakhshani, A., Kooshkaki, O., Abdoli Shadbad, M., Hajiasgharzadeh, K., Baghbanzadeh, A., Safarpour, H., Mokhtarzadeh, A., Brunetti, O., Yue, S., Silvestris, N., & Baradaran, B. (2020). Immune Checkpoints and CAR-T Cells: The Pioneers in Future Cancer Therapies? *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 8305. https://doi.org/10.3390/ijms21218305

Huang, L., Guo, Z., Wang, F., & Fu, L. (2021). KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 386. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00780-4

Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M. J., Wallweber, H. A., Sasmal, D. K., Huang, J., Kim, J. M., Mellman, I., & Vale, R. D. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1–mediated inhibition. *Science*, *355*(6332), 1428-1433. https://doi.org/10.1126/science.aaf1292

Ihle, N. T., Byers, L. A., Kim, E. S., Saintigny, P., Lee, J. J., Blumenschein, G. R., Tsao, A., Liu, S., Larsen, J. E., Wang, J., Diao, L., Coombes, K. R., Chen, L., Zhang, S., Abdelmelek, M. F., Tang, X., Papadimitrakopoulou, V., Minna, J. D., Lippman, S. M., … Powis, G. (2012). Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: Implications for signaling and clinical outcome. *Journal of the National Cancer Institute*, *104*(3), 228-239. https://doi.org/10.1093/jnci/djr523

Inoue, A., Kobayashi, K., Maemondo, M., Sugawara, S., Oizumi, S., Isobe, H., Gemma, A., Harada, M., Yoshizawa, H., Kinoshita, I., Fujita, Y., Okinaga, S., Hirano, H., Yoshimori, K., Harada, T., Saijo, Y., Hagiwara, K., Morita, S., & Nukiwa, T. (2013). Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin–paclitaxel for chemo-naïve non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002). *Annals of Oncology*, *24*(1), 54-59. https://doi.org/10.1093/annonc/mds214

INOUE, Y., MATSUMOTO, H., YAMADA, S., KAWAI, K., SUEMIZU, H., GIKA, M., TAKANAMI, I., NAKAMURA, M., & IWAZAKI, M. (2010). ATP7B expression is associated with in vitro sensitivity to cisplatin in non-small cell lung cancer. *Oncology Letters*, *1*(2), 279-282. https://doi.org/10.3892/ol_00000049

Iwamoto, M., Nakatani, Y., Fugo, K., Kishimoto, T., & Kiyokawa, T. (2015). Napsin A is frequently expressed in clear cell carcinoma of the ovary and endometrium. *Human Pathology*, *46*(7), 957-962. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.03.008

Jalili-Nik, M., Soltani, A., Mashkani, B., Rafatpanah, H., & Hashemy, S. I. (2021). PD-1 and PD-L1 inhibitors foster the progression of adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *International Immunopharmacology*, *98*, 107870. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107870

Jänne, P. A., Riely, G. J., Gadgeel, S. M., Heist, R. S., Ou, S.-H. I., Pacheco, J. M., Johnson, M. L., Sabari, J. K., Leventakos, K., Yau, E., Bazhenova, L., Negrao, M. V., Pennell, N. A., Zhang, J., Anderes, K., Der-Torossian, H., Kheoh, T., Velastegui, K., Yan, X., … Spira, A. I. (2022). Adagrasib in Non–Small-Cell Lung Cancer Harboring a KRAS G12C Mutation. *New England Journal of Medicine*, *387*(2), 120-131. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2204619

Jänne, P. A., Rybkin, I. I., Spira, A. I., Riely, G. J., Papadopoulos, K. P., Sabari, J. K., Johnson, M. L., Heist, R. S., Bazhenova, L., Barve, M., Pacheco, J. M., Leal, T. A., Velastegui, K., Cornelius, C., Olson, P., Christensen, J. G., Kheoh, T., Chao, R. C., & Ou, S. H. I. (2020). KRYSTAL-1: Activity and Safety of Adagrasib (MRTX849) in Advanced/ Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) Harboring KRAS G12C Mutation. *European Journal of Cancer*, *138*, S1-S2. https://doi.org/10.1016/S0959-8049(20)31076-5

Jänne, P. A., van den Heuvel, M. M., Barlesi, F., Cobo, M., Mazieres, J., Crinò, L., Orlov, S., Blackhall, F., Wolf, J., Garrido, P., Poltoratskiy, A., Mariani, G., Ghiorghiu, D., Kilgour, E., Smith, P., Kohlmann, A., Carlile, D. J., Lawrence, D., Bowen, K., & Vansteenkiste, J. (2017). Selumetinib Plus Docetaxel Compared With Docetaxel Alone and Progression-Free Survival in Patients With *KRAS* -Mutant Advanced Non–Small Cell Lung Cancer. *JAMA*, *317*(18), 1844. https://doi.org/10.1001/jama.2017.3438

Jemal, A., Thun, M. J., Ries, L. A. G., Howe, H. L., Weir, H. K., Center, M. M., Ward, E., Wu, X.-C., Eheman, C., Anderson, R., Ajani, U. A., Kohler, B., & Edwards, B. K. (2008). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2005, Featuring Trends in Lung Cancer, Tobacco Use, and Tobacco Control. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *100*(23), 1672-1694. https://doi.org/10.1093/jnci/djn389

Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2017). KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D353-D361. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092

Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 27-30. https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27

Karantza, V. (2011). Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene*, *30*(2), 127-138. https://doi.org/10.1038/onc.2010.456

Kaufmann, & Dietel. (2000). Thyroid transcription factor-1 is the superior immunohistochemical marker for pulmonary adenocarcinomas and large cell carcinomas compared to surfactant proteins A and B. *Histopathology*, *36*(1), 8-16. https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2000.00801.x

Kaufmann, O., Fietze, E., Mengs, J., & Dietel, M. (2001). Value of p63 and Cytokeratin 5/6 as Immunohistochemical Markers for the Differential Diagnosis of Poorly Differentiated and Undifferentiated Carcinomas. *American Journal of Clinical Pathology*, *116*(6), 823-830. https://doi.org/10.1309/21TW-2NDG-JRK4-PFJX

Kazi, A., Xiang, S., Yang, H., Chen, L., Kennedy, P., Ayaz, M., Fletcher, S., Cummings, C., Lawrence, H. R., Beato, F., Kang, Y., Kim, M. P., Delitto, A., Underwood, P. W., Fleming, J. B., Trevino, J. G., Hamilton, A. D., & Sebti, S. M. (2019). Dual Farnesyl and Geranylgeranyl Transferase Inhibitor Thwarts Mutant KRAS-Driven Patient-Derived Pancreatic Tumors. *Clinical Cancer Research*, *25*(19), 5984-5996. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3399

Keir, M. E., Liang, S. C., Guleria, I., Latchman, Y. E., Qipo, A., Albacker, L. A., Koulmanda, M., Freeman, G. J., Sayegh, M. H., & Sharpe, A. H. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(4), 883-895. https://doi.org/10.1084/jem.20051776

Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, *7*(8), 573-584. https://doi.org/10.1038/nrc2167

Kessler, D., Gmachl, M., Mantoulidis, A., Martin, L. J., Zoephel, A., Mayer, M., Gollner, A., Covini, D., Fischer, S., Gerstberger, T., Gmaschitz, T., Goodwin, C., Greb, P., Häring, D., Hela, W., Hoffmann, J., Karolyi-Oezguer, J., Knesl, P., Kornigg, S., … McConnell, D. B. (2019). Drugging an undruggable pocket on KRAS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(32), 15823-15829. https://doi.org/10.1073/pnas.1904529116

Kim, E. S. (2016). *Chemotherapy Resistance in Lung Cancer* (ss. 189-209). https://doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_10

King, J. E., Thatcher, N., Pickering, C. A. C., & Hasleton, P. S. (2006). Sensitivity and specificity of immunohistochemical markers used in the diagnosis of epithelioid mesothelioma: a detailed systematic analysis using published data. *Histopathology*, *48*(3), 223-232. https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02331.x

Kitajima, S., Ivanova, E., Guo, S., Yoshida, R., Campisi, M., Sundararaman, S. K., Tange, S., Mitsuishi, Y., Thai, T. C., Masuda, S., Piel, B. P., Sholl, L. M., Kirschmeier, P. T., Paweletz, C. P., Watanabe, H., Yajima, M., & Barbie, D. A. (2019). Suppression of STING associated with lkb1 loss in KRAS-driven lung cancer. *Cancer Discovery*, *9*(1), 34-45. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0689

Knight, S. B., Crosbie, P. A., Balata, H., Chudziak, J., Hussell, T., & Dive, C. (2017). Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open Biology*, *7*(9). https://doi.org/10.1098/rsob.170070

Koster, M. I., Kim, S., Mills, A. A., DeMayo, F. J., & Roop, D. R. (2004). p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes & Development*, *18*(2), 126-131. https://doi.org/10.1101/gad.1165104

Kovacs, E., Zorn, J. A., Huang, Y., Barros, T., & Kuriyan, J. (2015). A Structural Perspective on the Regulation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Annual Review of Biochemistry*, *84*(1), 739-764. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034402

Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of experimental medicine*, *182*(2), 459-465. https://doi.org/10.1084/jem.182.2.459

Kuiper, J. L., Heideman, D. A. M., Thunnissen, E., Paul, M. A., van Wijk, A. W., Postmus, P. E., & Smit, E. F. (2014). Incidence of T790M mutation in (sequential) rebiopsies in EGFR-mutated NSCLC-patients. *Lung Cancer*, *85*(1), 19-24. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.03.016

Kwei, K. A., Kim, Y. H., Girard, L., Kao, J., Pacyna-Gengelbach, M., Salari, K., Lee, J., Choi, Y.-L., Sato, M., Wang, P., Hernandez-Boussard, T., Gazdar, A. F., Petersen,

I., Minna, J. D., & Pollack, J. R. (2008). Genomic profiling identifies TITF1 as a lineage-specific oncogene amplified in lung cancer. *Oncogene*, *27*(25), 3635-3640. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1211012

Lanman, B. A., Allen, J. R., Allen, J. G., Amegadzie, A. K., Ashton, K. S., Booker, S. K., Chen, J. J., Chen, N., Frohn, M. J., Goodman, G., Kopecky, D. J., Liu, L., Lopez, P., Low, J. D., Ma, V., Minatti, A. E., Nguyen, T. T., Nishimura, N., Pickrell, A. J., … Cee, V. J. (2020). Discovery of a Covalent Inhibitor of KRAS ^{G12C} (AMG 510) for the Treatment of Solid Tumors. *Journal of Medicinal Chemistry*, *63*(1), 52-65. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01180

Lantuejoul, S., Fernandez-Cuesta, L., Damiola, F., Girard, N., & McLeer, A. (2020). New molecular classification of large cell neuroendocrine carcinoma and small cell lung carcinoma with potential therapeutic impacts. *Translational Lung Cancer Research*, *9*(5), 2233-2244. https://doi.org/10.21037/tlcr-20-269

Lastwika, K. J., Wilson, W., Li, Q. K., Norris, J., Xu, H., Ghazarian, S. R., Kitagawa, H., Kawabata, S., Taube, J. M., Yao, S., Liu, L. N., Gills, J. J., & Dennis, P. A. (2016). Control of PD-L1 expression by oncogenic activation of the AKT-mTOR pathway in non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, *76*(2), 227-238. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3362

Leal, T., Schehr, J., Kamisnki, A., Campbell, T., Traynor, A., & Lang, J. (2018). P3.04-08 Identifying Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors by Screening for PD-L1 and MHC I Expression on CTCs in Pts with NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology*, *13*(10), S924-S925. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.1715

Lee, V., Murphy, A., Le, D. T., & Diaz, L. A. (2016). Mismatch Repair Deficiency and Response to Immune Checkpoint Blockade. *The Oncologist*, *21*(10), 1200-1211. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0046

Leko, V., & Rosenberg, S. A. (2020). Identifying and Targeting Human Tumor Antigens for T Cell-Based Immunotherapy of Solid Tumors. *Cancer Cell*, *38*(4), 454-472. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.07.013

Letourneur, D., Danlos, F. X., & Marabelle, A. (2020). Chemokine biology on immune checkpoint–targeted therapies. Içinde *European Journal of Cancer* (C. 137, ss. 260-271). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.06.009

Levine, A. J., & Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer*, *9*(10), 749-758. https://doi.org/10.1038/nrc2723

Li, T., Kon, N., Jiang, L., Tan, M., Ludwig, T., Zhao, Y., Baer, R., & Gu, W. (2012). Tumor Suppression in the Absence of p53-Mediated Cell-Cycle Arrest, Apoptosis, and Senescence. *Cell*, *149*(6), 1269-1283. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.026

Li, Z., Qian, Y., Li, W., Liu, L., Yu, L., Liu, X., Wu, G., Wang, Y., Luo, W., Fang, F., Liu, Y., Song, F., Cai, Z., Chen, W., & Huang, W. (2020). Human Lung Adenocarcinoma-Derived Organoid Models for Drug Screening. *iScience*, *23*(8). https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101411

Li, Z., Qiu, M., Zeng, Z., Luo, H., Wu, W., Wang, F., Wang, Z., Zhang, D., Li, Y., & Xu, R. (2012). Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7A) is associated with platinum-resistance in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Translational Medicine*, *10*(1), 21. https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-21

Lim, S. H., Sun, J. M., Lee, S. H., Ahn, J. S., Park, K., & Ahn, M. J. (2016). Pembrolizumab for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *16*(3), 397-406. https://doi.org/10.1517/14712598.2016.1145652

Lind, H., Gameiro, S. R., Jochems, C., Donahue, R. N., Strauss, J., Gulley, J. L., Palena, C., & Schlom, J. (2020). Dual targeting of TGF-β and PD-L1 via a bifunctional anti-PD-L1/TGF-βRII agent: Status of preclinical and clinical advances. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *8*(1). https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000433

Liu, C., Peng, W., Xu, C., Lou, Y., Zhang, M., Wargo, J. A., Chen, J. Q., Li, H. S., Watowich, S. S., Yang, Y., Frederick, D. T., Cooper, Z. A., Mbofung, R. M., Whittington, M., Flaherty, K. T., Woodman, S. E., Davies, M. A., Radvanyi, L. G., Overwijk, W. W., … Hwu, P. (2013). BRAF Inhibition Increases Tumor Infiltration by T cells and Enhances the Antitumor Activity of Adoptive Immunotherapy in Mice. *Clinical Cancer Research*, *19*(2), 393-403. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1626

Liu, L., Mayes, P. A., Eastman, S., Shi, H., Yadavilli, S., Zhang, T., Yang, J., Seestaller-Wehr, L., Zhang, S. Y., Hopson, C., Tsvetkov, L., Jing, J., Zhang, S., Smothers, J., & Hoos, A. (2015). The BRAF and MEK inhibitors dabrafenib and trametinib: Effects on immune function and in combination with immunomodulatory antibodies targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4. *Clinical Cancer Research*, *21*(7), 1639-1651. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2339

Liu, P., Wang, Y., & Li, X. (2019). Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *9*(5), 871-879. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.03.002

Liu, Z., Zhao, K., Wei, S., Liu, C., Zhou, J., Gou, Q., Wu, X., Yang, Z., Yang, Y., Peng, Y., Cheng, Q., & Liu, L. (2020). ROS1-fusion protein induces PD-L1 expression via MEK-ERK activation in non-small cell lung cancer. *OncoImmunology*, *9*(1). https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1758003

Loi, S., Dushyanthen, S., Beavis, P. A., Salgado, R., Denkert, C., Savas, P., Combs, S., Rimm, D. L., Giltnane, J. M., Estrada, M. V., Sánchez, V., Sanders, M. E., Cook, R. S., Pilkinton, M. A., Mallal, S. A., Wang, K., Miller, V. A., Stephens, P. J., Yelensky, R., … Balko, J. M. (2016). RAS/MAPK activation is associated with reduced tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: Therapeutic cooperation between MEK and PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors. *Clinical Cancer Research*, *22*(6), 1499-1509. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1125

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Maan, M., & Pati, U. (2018). CHIP promotes autophagy-mediated degradation of aggregating mutant p53 in hypoxic conditions. *The FEBS Journal*, *285*(17), 3197-3214. https://doi.org/10.1111/febs.14602

Mamdani, H., Matosevic, S., Khalid, A. B., Durm, G., & Jalal, S. I. (2022). Immunotherapy in Lung Cancer: Current Landscape and Future Directions. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.823618

Marofi, F., Al-Awad, A. S., Sulaiman Rahman, H., Markov, A., Abdelbasset, W. K., Ivanovna Enina, Y., Mahmoodi, M., Hassanzadeh, A., Yazdanifar, M., Stanley Chartrand, M., & Jarahian, M. (2021). CAR-NK Cell: A New Paradigm in Tumor Immunotherapy. *Frontiers in Oncology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.673276

Martin, L. P., Hamilton, T. C., & Schilder, R. J. (2008a). Platinum Resistance: The Role of DNA Repair Pathways. *Clinical Cancer Research*, *14*(5), 1291-1295. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2238

Martin, L. P., Hamilton, T. C., & Schilder, R. J. (2008b). Platinum Resistance: The Role of DNA Repair Pathways. *Clinical Cancer Research*, *14*(5), 1291-1295. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2238

Mayakonda, A., Lin, D. C., Assenov, Y., Plass, C., & Koeffler, H. P. (2018). Maftools: Efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer. *Genome Research*, *28*(11), 1747-1756. https://doi.org/10.1101/gr.239244.118

McBride, O. W., Swan, D. C., Tronick, S. R., Gol, R., Klimanis, D., Moore, D. E., & Aaronson, S. A. (1983). Regional chromosomal localization of N-ras , K-ras1, K-ras2 and myb oncogenes in human cells. *Nucleic Acids Research*, *11*(23), 8221-8236. https://doi.org/10.1093/nar/11.23.8221

McCarthy, E. F. (2006). The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa orthopaedic journal*, *26*, 154-158.

McDermott, U., Longley, D. B., Galligan, L., Allen, W., Wilson, T., & Johnston, P. G. (2005). Effect of p53 Status and STAT1 on Chemotherapy-Induced, Fas-Mediated Apoptosis in Colorectal Cancer. *Cancer Research*, *65*(19), 8951-8960. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0961

Meder, L., Schuldt, P., Thelen, M., Schmitt, A., Dietlein, F., Klein, S., Borchmann, S., Wennhold, K., Vlasic, I., Oberbeck, S., Riedel, R., Florin, A., Golfmann, K., Schlößer, H. A., Odenthal, M., Buettner, R., Wolf, J., Hallek, M., Herling, M., … Ullrich, R. T. (2018). Combined VEGF and PD-L1 blockade displays synergistic treatment effects in an autochthonous mouse model of small cell lung cancer. *Cancer Research*, *78*(15), 4270-4281. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2176

Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (2002). Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science*, *296*(5566), 298-300. https://doi.org/10.1126/science.1068883

Mellema, W. W., Masen-Poos, L., Smit, E. F., Hendriks, L. E. L., Aerts, J. G., Termeer, A., Goosens, M. J., Smit, H. J. M., van den Heuvel, M. M., van der Wekken, A. J., Herder, G. J. M., Krouwels, F. H., Stigt, J. A., van den Borne, B. E. E. M., Haitjema, T. J., Staal-Van den Brekel, A. J., van Heemst, R. C., Pouw, E., & Dingemans, A. M. C. (2015). Comparison of clinical outcome after first-line platinum-based chemotherapy in different types of KRAS mutated advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, *90*(2), 249-254. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.09.012

Miettinen, M. (1993). Keratin immunohistochemistry: update of applications and pitfalls. *Pathology annual*, *28 Pt 2*, 113-143.

Mimura, K., Teh, J. L., Okayama, H., Shiraishi, K., Kua, L.-F., Koh, V., Smoot, D. T., Ashktorab, H., Oike, T., Suzuki, Y., Fazreen, Z., Asuncion, B. R., Shabbir, A., Yong, W.-P., So, J., Soong, R., & Kono, K. (2018). PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer Science*, *109*(1), 43-53. https://doi.org/10.1111/cas.13424

Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I., & Mazzei, T. (2006). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*, *17*, v7-v12. https://doi.org/10.1093/annonc/mdj941

Mirzaei, S. A., Gholamian Dehkordi, N., Ghamghami, M., Amiri, A. H., Dalir Abdolahinia, E., & Elahian, F. (2017). ABC-transporter blockage mediated by xanthotoxin and bergapten is the major pathway for chemosensitization of multidrug-resistant cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *337*, 22-29. https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.10.018

Mitsudomi, T., Morita, S., Yatabe, Y., Negoro, S., Okamoto, I., Tsurutani, J., Seto, T., Satouchi, M., Tada, H., Hirashima, T., Asami, K., Katakami, N., Takada, M., Yoshioka, H., Shibata, K., Kudoh, S., Shimizu, E., Saito, H., Toyooka, S., … Fukuoka, M. (2010). Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, *11*(2), 121-128. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70364-X

Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, *27*, 16-25. https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004

Mojic, M., Takeda, K., & Hayakawa, Y. (2018). The dark side of IFN-γ: Its role in promoting cancer immunoevasion. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1). https://doi.org/10.3390/ijms19010089

Mok, T. S., Wu, Y.-L., Ahn, M.-J., Garassino, M. C., Kim, H. R., Ramalingam, S. S., Shepherd, F. A., He, Y., Akamatsu, H., Theelen, W. S. M. E., Lee, C. K., Sebastian, M., Templeton, A., Mann, H., Marotti, M., Ghiorghiu, S., & Papadimitrakopoulou, V. A. (2017). Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, *376*(7), 629-640. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1612674

Mok, T. S., Wu, Y.-L., Thongprasert, S., Yang, C.-H., Chu, D.-T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., Nishiwaki, Y., Ohe, Y., Yang, J.-J., Chewaskulyong, B., Jiang, H., Duffield, E. L., Watkins, C. L., Armour, A. A., & Fukuoka, M. (2009). Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*, *361*(10), 947-957. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810699

Mori, K., Ogawa, Y., Tamura, N., Ebihara, K., Aoki, T., Muro, S., Ozaki, S., Tanaka, I., Tashiro, K., & Nakao, K. (1997). Molecular cloning of a novel mouse aspartic protease-like protein that is expressed abundantly in the kidney. *FEBS Letters*, *401*(2-3), 218-222. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01473-1

Mosesson, Y., Mills, G. B., & Yarden, Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nature Reviews Cancer*, *8*(11), 835-850. https://doi.org/10.1038/nrc2521

Muller, P. A. J., & Vousden, K. H. (2014). Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell*, *25*(3), 304-317. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.021

Nadal, E., Chen, G., Prensner, J. R., Shiratsuchi, H., Sam, C., Zhao, L., Kalemkerian, G. P., Brenner, D., Lin, J., Reddy, R. M., Chang, A. C., Capellà, G., Cardenal, F., Beer, D. G., & Ramnath, N. (2014). KRAS-G12C mutation is associated with poor outcome in surgically resected lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, *9*(10), 1513-1522. https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000305

Nagakawa, H., Hiroshima, K., Takiguchi, Y., Yatomi, M., Takahashi, Y., Mikami, M., Nakatani, Y., & Kuriyama, T. (2006). Basaloid squamous-cell carcinoma of the lung in a young woman. *International Journal of Clinical Oncology*, *11*(1), 66-68. https://doi.org/10.1007/s10147-005-0533-6

Naidoo, J., Page, D. B., & Wolchok, J. D. (2014). Immune Checkpoint Blockade. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *28*(3), 585-600. https://doi.org/10.1016/j.hoc.2014.02.002

Nakamura, T., Sato, T., Endo, R., Sasaki, S., Takahashi, N., Sato, Y., Hyodo, M., Hayakawa, Y., & Harashima, H. (2021). STING agonist loaded lipid nanoparticles overcome anti-PD-1 resistance in melanoma lung metastasis via NK cell activation. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *9*(7), e002852. https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002852

Ng, M., Freeman, M. K., Fleming, T. D., Robinson, M., Dwyer-Lindgren, L., Thomson, B., Wollum, A., Sanman, E., Wulf, S., Lopez, A. D., Murray, C. J. L., & Gakidou, E. (2014). Smoking Prevalence and Cigarette Consumption in 187 Countries, 1980-2012. *JAMA*, *311*(2), 183. https://doi.org/10.1001/jama.2013.284692

Nicholson, A. G., Tsao, M. S., Beasley, M. B., Borczuk, A. C., Brambilla, E., Cooper, W. A., Dacic, S., Jain, D., Kerr, K. M., Lantuejoul, S., Noguchi, M., Papotti, M., Rekhtman, N., Scagliotti, G., van Schil, P., Sholl, L., Yatabe, Y., Yoshida, A., & Travis, W. D. (2022). The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *Journal of Thoracic Oncology*, *17*(3), 362-387. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.11.003

Noman, M. Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmim, M., Karray, S., Dessen, P., Bronte, V., & Chouaib, S. (2014). PD-L1 is a novel direct target of HIF-1α, and its blockade under hypoxia enhanced: MDSC-mediated T cell activation. *Journal of Experimental Medicine*, *211*(5), 781-790. https://doi.org/10.1084/jem.20131916

O'Donnell, J. S., Long, G. V., Scolyer, R. A., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2017). Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. *Cancer Treatment Reviews*, *52*, 71-81. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.11.007

O'flynn, K., Russul-Saib, M., Ando, I., Wallacet, D. L., Beverley, P. C. L., Boylston$, A. W., & Linch, D. C. (1986). Different pathways of human T-cell activation revealed by PHA-P and PHA-M. *Immunology*, *57*(1), 55. /pmc/articles/PMC1453876/?report=abstract

Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T., & Honjo, T. (2001). PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(24), 13866-13871. https://doi.org/10.1073/pnas.231486598

O'Neill, R. E., & Cao, X. (2019). *Co-stimulatory and co-inhibitory pathways in cancer immunotherapy* (ss. 145-194). https://doi.org/10.1016/bs.acr.2019.03.003

Ordóñez, N. G. (2012). Napsin A Expression in Lung and Kidney Neoplasia. *Advances in Anatomic Pathology*, *19*(1), 66-73. https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e31823e472e

Ostrem, J. M., Peters, U., Sos, M. L., Wells, J. A., & Shokat, K. M. (2013). K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*, *503*(7477), 548-551. https://doi.org/10.1038/nature12796

Owen, K. L., Brockwell, N. K., & Parker, B. S. (2019). JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. *Cancers*, *11*(12), 2002. https://doi.org/10.3390/cancers11122002

Pabla, S., Conroy, J. M., Nesline, M. K., Glenn, S. T., Papanicolau-Sengos, A., Burgher, B., Hagen, J., Giamo, V., Andreas, J., Lenzo, F. L., Yirong, W., Dy, G. K., Yau, E., Early, A., Chen, H., Bshara, W., Madden, K. G., Shirai, K., Dragnev, K., … Morrison, C. (2019). Proliferative potential and resistance to immune checkpoint blockade in lung cancer patients. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *7*(1), 27. https://doi.org/10.1186/s40425-019-0506-3

Pantsar, T. (2020). KRAS(G12C)–AMG 510 interaction dynamics revealed by all-atom molecular dynamics simulations. *Scientific Reports*, *10*(1), 11992. https://doi.org/10.1038/s41598-020-68950-y

Pao, W., & Hutchinson, K. E. (2012). Chipping away at the lung cancer genome. *Nature Medicine*, *18*(3), 349-351. https://doi.org/10.1038/nm.2697

Pao, W., Miller, V. A., Politi, K. A., Riely, G. J., Somwar, R., Zakowski, M. F., Kris, M. G., & Varmus, H. (2005). Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain. *PLoS Medicine*, *2*(3), e73. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020073

Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, *12*(4), 252-264. https://doi.org/10.1038/nrc3239

Parikh, K., Banna, G., Liu, S. V., Friedlaender, A., Desai, A., Subbiah, V., & Addeo, A. (2022). Drugging KRAS: current perspectives and state-of-art review. *Journal of Hematology & Oncology*, *15*(1), 152. https://doi.org/10.1186/s13045-022-01375-4

Park, K., Tan, E.-H., O'Byrne, K., Zhang, L., Boyer, M., Mok, T., Hirsh, V., Yang, J. C.-H., Lee, K. H., Lu, S., Shi, Y., Kim, S.-W., Laskin, J., Kim, D.-W., Arvis, C. D., Kölbeck, K., Laurie, S. A., Tsai, C.-M., Shahidi, M., … Paz-Ares, L. (2016). Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*, *17*(5), 577-589. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30033-X

Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., Linsley, P. S., Thompson, C. B., & Riley, J. L. (2005). CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(21), 9543-9553. https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005

Parsa, A. T., Waldron, J. S., Panner, A., Crane, C. A., Parney, I. F., Barry, J. J., Cachola, K. E., Murray, J. C., Tihan, T., Jensen, M. C., Mischel, P. S., Stokoe, D., & Pieper, R. O. (2007). Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nature Medicine*, *13*(1), 84-88. https://doi.org/10.1038/nm1517

Patsoukis, N., Brown, J., Petkova, V., Liu, F., Li, L., & Boussiotis, V. A. (2012). Selective effects of PD-1 on Akt and ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Science Signaling*, *5*(230). https://doi.org/10.1126/scisignal.2002796

Pelosi, G., Pasini, F., Olsen Stenholm, C., Pastorino, U., Maisonneuve, P., Sonzogni, A., Maffini, F., Pruneri, G., Fraggetta, F., Cavallon, A., Roz, E., Iannucci, A., Bresaola, E., & Viale, G. (2002). p63 immunoreactivity in lung cancer: yet another player in the development of squamous cell carcinomas? *The Journal of Pathology*, *198*(1), 100-109. https://doi.org/10.1002/path.1166

Peng, L., Guo, J., Kong, L., Huang, Y., Tang, N., Zhang, J., Wang, M., He, X., Li, Z., Peng, Y., Wang, Z., & Han, X. (2023). Efficacy of immunotherapy in KRAS-mutant advanced NSCLC: A real-world study in a Chinese population. *Frontiers in Oncology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1070761

Perea, F., Sánchez-Palencia, A., Gómez-Morales, M., Bernal, M., Concha, Á., García, M. M., González-Ramírez, A. R., Kerick, M., Martin, J., Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., & Aptsiauri, N. (2018). HLA class I loss and PD-L1 expression in lung cancer:

Impact on T-cell infiltration and immune escape. *Oncotarget*, *9*(3), 4120-4133. https://doi.org/10.18632/oncotarget.23469

Pignon, J.-P., Tribodet, H., Scagliotti, G. V., Douillard, J.-Y., Shepherd, F. A., Stephens, R. J., Dunant, A., Torri, V., Rosell, R., Seymour, L., Spiro, S. G., Rolland, E., Fossati, R., Aubert, D., Ding, K., Waller, D., & Le Chevalier, T. (2008). Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation: A Pooled Analysis by the LACE Collaborative Group. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(21), 3552-3559. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.9030

Pulendran, B., van Driel, R., & Nossal, G. J. V. (1997). Immunological tolerance in germinal centres. *Immunology Today*, *18*(1), 27-32. https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)80011-4

Ramalingam, S., & Belani, C. (2008). Systemic Chemotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Recent Advances and Future Directions. *The Oncologist*, *13*(S1), 5-13. https://doi.org/10.1634/theoncologist.13-S1-5

Raso, M. G., Bota-Rabassedas, N., & Wistuba, I. I. (2021). Pathology and Classification of SCLC. *Cancers*, *13*(4), 820. https://doi.org/10.3390/cancers13040820

Reck, M., Spira, A., Besse, B., Wolf, J., Skoulidis, F., Borghaei, H., Goto, K., Park, K., Griesinger, F., Felip, E., Boyer, M., Barrios, C. H., Goss, G., Yang, H., Obiozor, C., & Ramalingam, S. S. (2020). 1416TiP CodeBreak 200: A phase III multicenter study of sotorasib (AMG 510), a KRAS(G12C) inhibitor, versus docetaxel in patients with previously treated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring KRAS p.G12C mutation. *Annals of Oncology*, *31*, S894-S895. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.1730

Rekhtman, N., Ang, D. C., Sima, C. S., Travis, W. D., & Moreira, A. L. (2011). Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Modern Pathology*, *24*(10), 1348-1359. https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.92

Riedel, S. (2005). Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination. *Baylor University Medical Center Proceedings*, *18*(1), 21-25. https://doi.org/10.1080/08998280.2005.11928028

Román, M., Baraibar, I., López, I., Nadal, E., Rolfo, C., Vicent, S., & Gil-Bazo, I. (2018). KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target. *Molecular Cancer*, *17*(1), 33. https://doi.org/10.1186/s12943-018-0789-x

Rosell, R., Moran, T., Queralt, C., Porta, R., Cardenal, F., Camps, C., Majem, M., Lopez-Vivanco, G., Isla, D., Provencio, M., Insa, A., Massuti, B., Gonzalez-Larriba, J. L., Paz-Ares, L., Bover, I., Garcia-Campelo, R., Moreno, M. A., Catot, S., Rolfo, C., … Taron, M. (2009). Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, *361*(10), 958-967. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904554

Roskoski, R. (2019). Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. *Pharmacological Research*, *139*, 395-411. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.014

Rudin, C. M., Poirier, J. T., Byers, L. A., Dive, C., Dowlati, A., George, J., Heymach, J. V., Johnson, J. E., Lehman, J. M., MacPherson, D., Massion, P. P., Minna, J. D., Oliver, T. G., Quaranta, V., Sage, J., Thomas, R. K., Vakoc, C. R., & Gazdar, A. F. (2019). Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and

mouse model data. *Nature Reviews Cancer*, *19*(5), 289-297. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0133-9

Scheffler, M., Ihle, M. A., Hein, R., Merkelbach-Bruse, S., Scheel, A. H., Siemanowski, J., Brägelmann, J., Kron, A., Abedpour, N., Ueckeroth, F., Schüller, M., Koleczko, S., Michels, S., Fassunke, J., Pasternack, H., Heydt, C., Serke, M., Fischer, R., Schulte, W., … Wolf, J. (2019). K-ras Mutation Subtypes in NSCLC and Associated Co-occuring Mutations in Other Oncogenic Pathways. *Journal of Thoracic Oncology*, *14*(4), 606-616. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.12.013

Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., & Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants. *Science*, *277*(5324), 333-339. https://doi.org/10.1126/science.277.5324.333

Schmale, H., & Bamberger, C. (1997). A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene*, *15*(11), 1363-1367. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201500

Schütz, F., Stefanovic, S., Mayer, L., von Au, A., Domschke, C., & Sohn, C. (2017). PD-1/PD-L1 Pathway in Breast Cancer. *Oncology Research and Treatment*, *40*(5), 294-297. https://doi.org/10.1159/000464353

Schwendenwein, A., Megyesfalvi, Z., Barany, N., Valko, Z., Bugyik, E., Lang, C., Ferencz, B., Paku, S., Lantos, A., Fillinger, J., Rezeli, M., Marko-Varga, G., Bogos, K., Galffy, G., Renyi-Vamos, F., Hoda, M. A., Klepetko, W., Hoetzenecker, K., Laszlo, V., & Dome, B. (2021). Molecular profiles of small cell lung cancer subtypes: Therapeutic implications. *Molecular Therapy - Oncolytics*, *20*, 470-483. https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.02.004

Seo, J., Park, S.-J., Kim, J., Choi, S.-J., Moon, S.-H., & Chung, H.-M. (2013). Effective method for the isolation and proliferation of primary lung cancer cells from patient lung tissues. *Biotechnology Letters*, *35*(8), 1165-1174. https://doi.org/10.1007/s10529-013-1189-3

Shtiegman, K., Kochupurakkal, B. S., Zwang, Y., Pines, G., Starr, A., Vexler, A., Citri, A., Katz, M., Lavi, S., Ben-Basat, Y., Benjamin, S., Corso, S., Gan, J., Yosef, R. B., Giordano, S., & Yarden, Y. (2007). Defective ubiquitinylation of EGFR mutants of lung cancer confers prolonged signaling. *Oncogene*, *26*(49), 6968-6978. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210503

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *70*(1), 7-30. https://doi.org/10.3322/caac.21590

Skoulidis, F., Byers, L. A., Diao, L., Papadimitrakopoulou, V. A., Tong, P., Izzo, J., Behrens, C., Kadara, H., Parra, E. R., Canales, J. R., Zhang, J., Giri, U., Gudikote, J., Cortez, M. A., Yang, C., Fan, Y., Peyton, M., Girard, L., Coombes, K. R., … Heymach, J. V. (2015). Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities. *Cancer Discovery*, *5*(8), 861-878. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1236

Skoulidis, F., Li, B. T., Dy, G. K., Price, T. J., Falchook, G. S., Wolf, J., Italiano, A., Schuler, M., Borghaei, H., Barlesi, F., Kato, T., Curioni-Fontecedro, A., Sacher, A., Spira, A., Ramalingam, S. S., Takahashi, T., Besse, B., Anderson, A., Ang, A., … Govindan, R. (2021). Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *New England Journal of Medicine*, *384*(25), 2371-2381. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2103695

Song, T. L., Nairismägi, M. L., Laurensia, Y., Lim, J. Q., Tan, J., Li, Z. M., Pang, W. L., Kizhakeyil, A., Wijaya, G. C., Huang, D. C., Nagarajan, S., Chia, B. K. H., Cheah, D., Liu, Y. H., Zhang, F., Rao, H. L., Tang, T., Wong, E. K. Y., Bei, J. X., … Ong, C. K. (2018). Oncogenic activation of the STAT3 pathway drives PD-L1 expression in natural killer/T-cell lymphoma. *Blood*, *132*(11), 1146-1158. https://doi.org/10.1182/blood-2018-01-829424

Soragni, A., Janzen, D. M., Johnson, L. M., Lindgren, A. G., Thai-Quynh Nguyen, A., Tiourin, E., Soriaga, A. B., Lu, J., Jiang, L., Faull, K. F., Pellegrini, M., Memarzadeh, S., & Eisenberg, D. S. (2016). A Designed Inhibitor of p53 Aggregation Rescues p53 Tumor Suppression in Ovarian Carcinomas. *Cancer Cell*, *29*(1), 90-103. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.12.002

Soria, J.-C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K. H., Dechaphunkul, A., Imamura, F., Nogami, N., Kurata, T., Okamoto, I., Zhou, C., Cho, B. C., Cheng, Y., Cho, E. K., Voon, P. J., Planchard, D., Su, W.-C., Gray, J. E., … Ramalingam, S. S. (2018). Osimertinib in Untreated EGFR Mutated Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, *378*(2), 113-125. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1713137

Sos, M. L., & Thomas, R. K. (2012). Genetic insight and therapeutic targets in squamous-cell lung cancer. *Oncogene*, *31*(46), 4811-4814. https://doi.org/10.1038/onc.2011.640

Sow, H., Ren, J., Camps, M., Ossendorp, F., & ten Dijke, P. (2019). Combined Inhibition of TGF-β Signaling and the PD-L1 Immune Checkpoint Is Differentially Effective in Tumor Models. *Cells*, *8*(4), 320. https://doi.org/10.3390/cells8040320

Spranger, S., Bao, R., & Gajewski, T. F. (2015). Melanoma-intrinsic β-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature*, *523*(7559), 231-235. https://doi.org/10.1038/nature14404

Steurer, S., Riemann, C., Büscheck, F., Luebke, A. M., Kluth, M., Hube-Magg, C., Hinsch, A., Höflmayer, D., Weidemann, S., Fraune, C., Möller, K., Menz, A., Fisch, M., Rink, M., Bernreuther, C., Lebok, P., Clauditz, T. S., Sauter, G., Uhlig, R., … Marx, A. H. (2021). p63 expression in human tumors and normal tissues: a tissue microarray study on 10,200 tumors. *Biomarker Research*, *9*(1), 7. https://doi.org/10.1186/s40364-021-00260-5

Stewart, D. J. (2007). Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *63*(1), 12-31. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.02.001

Stewart, E. L., Tan, S. Z., Liu, G., & Tsao, M.-S. (2015). Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations-a review. *Translational lung cancer research*, *4*(1), 67-81. https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.11.06

Sul, J., Blumenthal, G. M., Jiang, X., He, K., Keegan, P., & Pazdur, R. (2016). FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Patients With Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Whose Tumors Express Programmed Death-Ligand 1. *The Oncologist*, *21*(5), 643-650. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0498

Sumimoto, H., Imabayashi, F., Iwata, T., & Kawakami, Y. (2006). The BRAF–MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *203*(7), 1651-1656. https://doi.org/10.1084/jem.20051848

Sundström, B. E., & Stigbrand, T. I. (1994). Cytokeratins and Tissue Polypeptide Antigen. *The International Journal of Biological Markers*, *9*(2), 102-108. https://doi.org/10.1177/172460089400900207

Svaton, M., Fiala, O., Pesek, M., Bortlicek, Z., Minarik, M., Benesova, L., & Topolcan, O. (2016). The prognostic role of kras mutation in patients with advanced NSCLC treated with second-or third-line chemotherapy. *Anticancer Research*, *36*(3), 1077-1082.

Tagne, J.-B., Gupta, S., Gower, A. C., Shen, S. S., Varma, S., Lakshminarayanan, M., Cao, Y., Spira, A., Volkert, T. L., & Ramirez, M. I. (2012). Genome-Wide Analyses of Nkx2-1 Binding to Transcriptional Target Genes Uncover Novel Regulatory Patterns Conserved in Lung Development and Tumors. *PLoS ONE*, *7*(1), e29907. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029907

Takai, Y., Sasaki, T., & Matozaki, T. (2001). Small GTP-Binding Proteins. *Physiological Reviews*, *81*(1), 153-208. https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.153

Tameishi, M., Kobori, T., Tanaka, C., Urashima, Y., Ito, T., & Obata, T. (2021). Contribution of Ezrin on the Cell Surface Plasma Membrane Localization of Programmed Cell Death Ligand-1 in Human Choriocarcinoma JEG-3 Cells. *Pharmaceuticals*, *14*(10), 963. https://doi.org/10.3390/ph14100963

Tan, A. C., & Tan, D. S. W. (2022). Targeted Therapies for Lung Cancer Patients With Oncogenic Driver Molecular Alterations. *Journal of Clinical Oncology*, *40*(6), 611-625. https://doi.org/10.1200/JCO.21.01626

Tan, N., Malek, M., Zha, J., Yue, P., Kassees, R., Berry, L., Fairbrother, W. J., Sampath, D., & Belmont, L. D. (2011). Navitoclax Enhances the Efficacy of Taxanes in Non–Small Cell Lung Cancer Models. *Clinical Cancer Research*, *17*(6), 1394-1404. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2353

Tanaka, C., Kobori, T., Tameishi, M., Urashima, Y., Ito, T., & Obata, T. (2021). Ezrin Modulates the Cell Surface Expression of Programmed Cell Death Ligand-1 in Human Cervical Adenocarcinoma Cells. *Molecules*, *26*(18), 5648. https://doi.org/10.3390/molecules26185648

Tanaka, H., Yanagisawa, K., Shinjo, K., Taguchi, A., Maeno, K., Tomida, S., Shimada, Y., Osada, H., Kosaka, T., Matsubara, H., Mitsudomi, T., Sekido, Y., Tanimoto, M., Yatabe, Y., & Takahashi, T. (2007). Lineage-Specific Dependency of Lung Adenocarcinomas on the Lung Development Regulator TTF-1. *Cancer Research*, *67*(13), 6007-6011. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4774

Tarhini, A. (2013). Immune-Mediated Adverse Events Associated with Ipilimumab CTLA-4 Blockade Therapy: The Underlying Mechanisms and Clinical Management. *Scientifica*, *2013*, 1-19. https://doi.org/10.1155/2013/857519

Tomasini, P., Khobta, N., Greillier, L., & Barlesi, F. (2012). Ipilimumab: its potential in non-small cell lung cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, *4*(2), 43-50. https://doi.org/10.1177/1758834011431718

Travis, W. D. (2020). Lung Cancer Pathology. *Clinics in Chest Medicine*, *41*(1), 67-85. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.11.001

Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, Lucian. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., & Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology*, *10*(9), 1243-1260. https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630

Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., Beer, D. G., Powell, C. A., Riely, G. J., Van Schil, P. E., Garg, K., Austin, J. H. M., Asamura, H., Rusch, V. W., Hirsch, F. R., Scagliotti, G., Mitsudomi, T., Huber, R. M., Ishikawa, Y., … Yankelewitz, D. (2011). International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, *6*(2), 244-285. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318206a221

Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K., Yatabe, Y., Ishikawa, Y., Wistuba, I., Flieder, D. B., Franklin, W., Gazdar, A., Hasleton, P. S., Henderson, D. W., Kerr, K. M., Nakatani, Y., Petersen, I., Roggli, V., Thunnissen, E., & Tsao, M. (2013). Diagnosis of Lung Adenocarcinoma in Resected Specimens: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *137*(5), 685-705. https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0264-RA

Tsui, D. W. Y., Murtaza, M., Wong, A. S. C., Rueda, O. M., Smith, C. G., Chandrananda, D., Soo, R. A., Lim, H. L., Goh, B. C., Caldas, C., Forshew, T., Gale, D., Liu, W., Morris, J., Marass, F., Eisen, T., Chin, T. M., & Rosenfeld, N. (2018). Dynamics of multiple resistance mechanisms in plasma DNA during EGFR-targeted therapies in non-small cell lung cancer. *EMBO Molecular Medicine*, *10*(6). https://doi.org/10.15252/emmm.201707945

Vaddavalli, P. L., & Schumacher, B. (2022). The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in cancer and aging. *Trends in Genetics*, *38*(6), 598-612. https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.02.010

Vansteenkiste, J., Zielinski, M., Linder, A., Dahabreh, J., Gonzalez, E. E., Malinowski, W., Lopez-Brea, M., Vanakesa, T., Jassem, J., Kalofonos, H., Perdeus, J., Bonnet, R., Basko, J., Janilionis, R., Passlick, B., Treasure, T., Gillet, M., Lehmann, F. F., & Brichard, V. G. (2013). Adjuvant MAGE-A3 Immunotherapy in Resected Non–Small-Cell Lung Cancer: Phase II Randomized Study Results. *Journal of Clinical Oncology*, *31*(19), 2396-2403. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.7103

Viale, G., Trapani, D., & Curigliano, G. (2017). Mismatch Repair Deficiency as a Predictive Biomarker for Immunotherapy Efficacy. *BioMed Research International*, *2017*. https://doi.org/10.1155/2017/4719194

Vilgelm, A. E., & Richmond, A. (2019). Chemokins modulate immune surveillance in tumorignesis, metastatsis, and response to immunotherapy. Içinde *Frontiers in Immunology* (C. 10, Sayı FEB, s. 333). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00333

Villegas-Mendez, A., de Souza, J. B., Murungi, L., Hafalla, J. C. R., Shaw, T. N., Greig, R., Riley, E. M., & Couper, K. N. (2011). Heterogeneous and Tissue-Specific Regulation of Effector T Cell Responses by IFN-γ during *Plasmodium berghei* ANKA Infection. *The Journal of Immunology*, *187*(6), 2885-2897. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100241

Vilmar, A., & Sørensen, J. B. (2009). Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) in platinum-based treatment of non-small cell lung cancer with special emphasis on carboplatin: A review of current literature. *Lung Cancer*, *64*(2), 131-139. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2008.08.006

Vollmer, R. T. (1982). The effect of cell size on the pathologic diagnosis of small and large cell carcinomas of the lung. *Cancer*, *50*(7), 1380-1383.

https://doi.org/10.1002/1097-0142(19821001)50:7<1380::AID-CNCR2820500725>3.0.CO;2-K

Wadowska, K., Bil-Lula, I., Trembecki, Ł., & Śliwińska-Mossoń, M. (2020). Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(13), 4569. https://doi.org/10.3390/ijms21134569

Waldman, A. D., Fritz, J. M., & Lenardo, M. J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology*, *20*(11), 651-668. https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5

Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Thompson, C. B., & Bluestone, J. A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, *1*(5), 405-413. https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90071-X

Wang, B. Y., Gil, J., Kaufman, D., Gan, L., Kohtz, D. S., & Burstein, D. E. (2002). p63 In pulmonary epithelium, pulmonary squamous neoplasms, and other pulmonary tumors. *Human Pathology*, *33*(9), 921-926. https://doi.org/10.1053/hupa.2002.126878

Wang, L. C., Wang, L., Kwauk, S., Woo, J. A., Wu, L. Q., Zhu, H., Zhan, L. Z., Sun, N. L., & Zhang, L. (2011). Analysis on the clinical features of 22 basaloid squamous cell carcinoma of the lung. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, *6*(1), 10. https://doi.org/10.1186/1749-8090-6-10

Wang, X., Yang, L., Huang, F., Zhang, Q., Liu, S., Ma, L., & You, Z. (2017). Inflammatory cytokines IL-17 and TNF-α up-regulate PD-L1 expression in human prostate and colon cancer cells. *Immunology Letters*, *184*, 7-14. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.02.006

Wang, Z., Strasser, A., & Kelly, G. L. (2022). Should mutant TP53 be targeted for cancer therapy? *Cell Death & Differentiation*, *29*(5), 911-920. https://doi.org/10.1038/s41418-022-00962-9

Wang, Z.-F., Ren, S.-X., Li, W., & Gao, G.-H. (2018). Frequency of the acquired resistant mutation T790 M in non-small cell lung cancer patients with active exon 19Del and exon 21 L858R: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, *18*(1), 148. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4075-5

Waterman, H., Katz, M., Rubin, C., Shtiegman, K., Lavi, S., Elson, A., Jovin, T., & Yarden, Y. (2002). A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling. *The EMBO Journal*, *21*(3), 303-313. https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.303

Watson, W. L., & Berg, J. W. (1962). Oat cell lung cancer. *Cancer*, *15*(4), 759-768. https://doi.org/10.1002/1097-0142(196207/08)15:4<759::AID-CNCR2820150410>3.0.CO;2-6

Weber, J. (2007). Review: Anti–CTLA-4 Antibody Ipilimumab: Case Studies of Clinical Response and Immune-Related Adverse Events. *The Oncologist*, *12*(7), 864-872. https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-7-864

West, H., McCleod, M., Hussein, M., Morabito, A., Rittmeyer, A., Conter, H. J., Kopp, H. G., Daniel, D., McCune, S., Mekhail, T., Zer, A., Reinmuth, N., Sadiq, A., Sandler, A., Lin, W., Lohmann, T. O., Archer, V., Wang, L., Kowanetz, M., & Cappuzzo, F. (2019). Atezolizumab in combination with carboplatin plus nab-paclitaxel chemotherapy compared with chemotherapy alone as first-line treatment for metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer (IMpower130): a

multicentre, randomised, open-label, phase 3 tria. *The Lancet Oncology*, *20*(7), 924-937. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30167-6

Westover, D., Zugazagoitia, J., Cho, B. C., Lovly, C. M., & Paz-Ares, L. (2018). Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Annals of Oncology*, *29*, i10-i19. https://doi.org/10.1093/annonc/mdx703

Whipple, C. A., Boni, A., Fisher, J. L., Hampton, T. H., Tsongalis, G. J., Mellinger, D. L., Yan, S., Tafe, L. J., Brinckerhoff, C. E., Turk, M. J., Mullins, D. W., Fadul, C. E., & Ernstoff, M. S. (2016). The mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in regulating immunological properties of BRAF mutant cutaneous melanoma cells. *Melanoma Research*, *26*(3), 223-235. https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000244

Whithaus, K., Fukuoka, J., Prihoda, T. J., & Jagirdar, J. (2012). Evaluation of Napsin A, Cytokeratin 5/6, p63, and Thyroid Transcription Factor 1 in Adenocarcinoma Versus Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *136*(2), 155-162. https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0232-OA

Whyte, D. B., Kirschmeier, P., Hockenberry, T. N., Nunez-Oliva, I., James, L., Catino, J. J., Bishop, W. R., & Pai, J.-K. (1997). K- and N-Ras Are Geranylgeranylated in Cells Treated with Farnesyl Protein Transferase Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(22), 14459-14464. https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.14459

Willis, N. J. (1997). Edward Jenner and the Eradication of Smallpox. *Scottish Medical Journal*, *42*(4), 118-121. https://doi.org/10.1177/003693309704200407

Wolchok, J. (2018). Putting the Immunologic Brakes on Cancer. *Cell*, *175*(6), 1452-1454. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.006

Wolff, S., Erster, S., Palacios, G., & Moll, U. M. (2008). p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. *Cell Research*, *18*(7), 733-744. https://doi.org/10.1038/cr.2008.62

Wu, S.-G., Liu, Y.-N., Tsai, M.-F., Chang, Y.-L., Yu, C.-J., Yang, P.-C., Yang, J. C.-H., Wen, Y.-F., & Shih, J.-Y. (2016). The mechanism of acquired resistance to irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitor-afatinib in lung adenocarcinoma patients. *Oncotarget*, *7*(11), 12404-12413. https://doi.org/10.18632/oncotarget.7189

Wu, Y.-L., Cheng, Y., Zhou, X., Lee, K. H., Nakagawa, K., Niho, S., Tsuji, F., Linke, R., Rosell, R., Corral, J., Migliorino, M. R., Pluzanski, A., Sbar, E. I., Wang, T., White, J. L., Nadanaciva, S., Sandin, R., & Mok, T. S. (2017). Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, *18*(11), 1454-1466. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30608-3

Xu, B., Abourbih, S., Sircar, K., Kassouf, W., Aprikian, A., Tanguay, S., & Brimo, F. (2014). Diagnostic and Prognostic Role of Immunohistochemical Expression of Napsin-A Aspartic Peptidase in Clear Cell and Papillary Renal Cell Carcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, *22*(3), 206-212. https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31828ef24e

Xu, D., Li, J., Li, R. Y., Lan, T., Xiao, C., & Gong, P. (2019). PD-LI expression is regulated by NF-κB during EMT signaling in gastric carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, *12*, 10099-10105. https://doi.org/10.2147/OTT.S224053

Yaguchi, T., Goto, Y., Kido, K., Mochimaru, H., Sakurai, T., Tsukamoto, N., Kudo-Saito, C., Fujita, T., Sumimoto, H., & Kawakami, Y. (2012). Immune Suppression and

Resistance Mediated by Constitutive Activation of Wnt/β-Catenin Signaling in Human Melanoma Cells. *The Journal of Immunology*, *189*(5), 2110-2117. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102282

Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M. D., Dötsch, V., Andrews, N. C., Caput, D., & McKeon, F. (1998). p63, a p53 Homolog at 3q27–29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. *Molecular Cell*, *2*(3), 305-316. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80275-0

Yang, J., Chen, J., Wei, J., Liu, X., & Cho, W. C. (2016). Immune checkpoint blockade as a potential therapeutic target in non-small cell lung cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *16*(10), 1209-1223. https://doi.org/10.1080/14712598.2016.1214265

Yasuda, H., Park, E., Yun, C.-H., Sng, N. J., Lucena-Araujo, A. R., Yeo, W.-L., Huberman, M. S., Cohen, D. W., Nakayama, S., Ishioka, K., Yamaguchi, N., Hanna, M., Oxnard, G. R., Lathan, C. S., Moran, T., Sequist, L. V., Chaft, J. E., Riely, G. J., Arcila, M. E., … Costa, D. B. (2013). Structural, Biochemical, and Clinical Characterization of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Exon 20 Insertion Mutations in Lung Cancer. *Science Translational Medicine*, *5*(216). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007205

Yi, M., Jiao, D., Qin, S., Chu, Q., Wu, K., & Li, A. (2019). Synergistic effect of immune checkpoint blockade and anti-angiogenesis in cancer treatment. *Molecular Cancer*, *18*(1). https://doi.org/10.1186/s12943-019-0974-6

Yoshizawa, A., Motoi, N., Riely, G. J., Sima, C. S., Gerald, W. L., Kris, M. G., Park, B. J., Rusch, V. W., & Travis, W. D. (2011). Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Modern Pathology*, *24*(5), 653-664. https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.232

Young, L. C., Campling, B. G., Cole, S. P., Deeley, R. G., & Gerlach, J. H. (2001). Multidrug resistance proteins MRP3, MRP1, and MRP2 in lung cancer: correlation of protein levels with drug response and messenger RNA levels. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *7*(6), 1798-1804.

Yu, G., Wang, L. G., Han, Y., & He, Q. Y. (2012). ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, *16*(5), 284-287. https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118

Yu, H. A., Sima, C. S., Shen, R., Kass, S., Gainor, J., Shaw, A., Hames, M., Iams, W., Aston, J., Lovly, C. M., Horn, L., Lydon, C., Oxnard, G. R., Kris, M. G., Ladanyi, M., & Riely, G. J. (2015). Prognostic impact of KRAS mutation subtypes in 677 patients with metastatic lung adenocarcinomas. *Journal of Thoracic Oncology*, *10*(3), 431-437. https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000432

Yuan, M., Huang, L.-L., Chen, J.-H., Wu, J., & Xu, Q. (2019). The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *4*(1), 61. https://doi.org/10.1038/s41392-019-0099-9

Zaretsky, J. M., Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Escuin-Ordinas, H., Hugo, W., Hu-Lieskovan, S., Torrejon, D. Y., Abril-Rodriguez, G., Sandoval, S., Barthly, L., Saco, J., Moreno, B. H., Mezzadra, R., Chmielowski, B., Ruchalski, K., Shintaku, I. P., Sanchez, P. J., Puig-Saus, C., Cherry, G., … Ribas, A. (2016). Mutations associated

with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *New England Journal of Medicine*, *375*(9), 819-829. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1604958

Zeng-Rong, N., Paterson, J., Alpert, L., Tsao, M. S., Viallet, J., & Alaoui-Jamali, M. A. (1995). Elevated DNA repair capacity is associated with intrinsic resistance of lung cancer to chemotherapy. *Cancer research*, *55*(21), 4760-4764.

Zhang, W., Girard, L., Zhang, Y.-A., Haruki, T., Papari-Zareei, M., Stastny, V., Ghayee, H. K., Pacak, K., Oliver, T. G., Minna, J. D., & Gazdar, A. F. (2018). Small cell lung cancer tumors and preclinical models display heterogeneity of neuroendocrine phenotypes. *Translational lung cancer research*, *7*(1), 32-49. https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.02.02

Zhang, Y., Xiong, S., Liu, B., Pant, V., Celii, F., Chau, G., Elizondo-Fraire, A. C., Yang, P., You, M. J., El-Naggar, A. K., Navin, N. E., & Lozano, G. (2018). Somatic Trp53 mutations differentially drive breast cancer and evolution of metastases. *Nature Communications*, *9*(1), 3953. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06146-9

Zhang, Y., Xu, L., Chang, Y., Li, Y., Butler, W., Jin, E., Wang, A., Tao, Y., Chen, X., Liang, C., & Huang, J. (2020). Therapeutic potential of ReACp53 targeting mutant p53 protein in CRPC. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, *23*(1), 160-171. https://doi.org/10.1038/s41391-019-0172-z

Zhang, Y., Zeng, Y., Liu, T., Du, W., Zhu, J., Liu, Z., & Huang, J. A. (2019). The canonical TGF-β/Smad signalling pathway is involved in PD-L1-induced primary resistance to EGFR-TKIs in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Respiratory Research*, *20*(1). https://doi.org/10.1186/s12931-019-1137-4

Zhang, Y.-L., Yuan, J.-Q., Wang, K.-F., Fu, X.-H., Han, X.-R., Threapleton, D., Yang, Z.-Y., Mao, C., & Tang, J.-L. (2016a). The prevalence of *EGFR* mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, *7*(48), 78985-78993. https://doi.org/10.18632/oncotarget.12587

Zhang, Y.-L., Yuan, J.-Q., Wang, K.-F., Fu, X.-H., Han, X.-R., Threapleton, D., Yang, Z.-Y., Mao, C., & Tang, J.-L. (2016b). The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, *7*(48), 78985-78993. https://doi.org/10.18632/oncotarget.12587

Zhao, J., Kim, J., Reed, E., & Li, Q. (2005). Molecular mechanism of antitumor activity of taxanes in lung cancer (Review). *International Journal of Oncology*. https://doi.org/10.3892/ijo.27.1.247

Zhao, Z., Li, L., Wang, Z., Duan, J., Bai, H., & Wang, J. (2020). The Status of the EGFR T790M Mutation is associated with the Clinical Benefits of Osimertinib Treatment in Non-small Cell Lung Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Journal of Cancer*, *11*(11), 3106-3113. https://doi.org/10.7150/jca.38411

Zheng, Y., Yang, Y., Wu, S., Zhu, Y., Tang, X., & Liu, X. (2017). Combining MPDL3280A with adoptive cell immunotherapy exerts better antitumor effects against cervical cancer. *Bioengineered*, *8*(4), 367-373. https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1230573

Zhou, J., Kang, Y., Chen, L., Wang, H., Liu, J., Zeng, S., & Yu, L. (2020). The Drug-Resistance Mechanisms of Five Platinum-Based Antitumor Agents. *Frontiers in Pharmacology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00343

Zuo, H., & Wan, Y. (2022). Inhibition of myeloid PD-L1 suppresses osteoclastogenesis and cancer bone metastasis. *Cancer Gene Therapy*, *29*(10), 1342-1354. https://doi.org/10.1038/s41417-022-00446-5