

**T.C.**  
**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MALİGN MELANOMDA HİPOKSİK SÜREÇ**  
**ve**  
**İLİŞKİLİ GENLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Mustafa Emre ERCİN**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Önder BOZDOĞAN**

**KIRIKKALE**

**2014**

**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ****PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

Patoloji Anabilim Dalı uzmanlık programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **UZMANLIK TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

04.03.2014

Yrd.Doç.Dr.Mahi Balcı

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı

Jüri Başkanı

Prof.Dr.Pınar ATASOY

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı

Üye

Prof.Dr.Önder BOZDOĞAN

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

Patoloji Anabilim Dalı

Üye

## TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi, deneyim, disiplin ve mesleki prensiplerinden yararlandığım kıymetli hocalarım Prof. Dr. Önder Bozdoğan'a, Prof. Dr. Pınar Atasoy'a, Yrd. Doç. Dr. Őebnem Ayva'ya ve Yrd. Doç Dr. Mahi Balcı'ya ,

Birlikte çalıŐmaktan büyük mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım Dr. Nurdan Tatar'a, Dr. Sami Turan'a, Dr. Fatma Benli Tanrıkulu'na, Dr. Dilara Yıldız'a, Dr. YeŐim Yıldırım'a,

Tez çalıŐmamda titiz ve hassas davranıŐlarıyla yardımlarını esirgemeyen Muharrem Atlı'ya, Selahattin Gönaylı'ya , Nisa Tandoğan'a ,Uğur Esen'e, Yasin Dilbaz'a,

Bu çalıŐmanın iskeletini oluŐtururken ve her aŐamasında desteğini benden esirgemeyen eŐim Nuran HoŐ Ercin'e ve üzerimde emeği bulunan herkese teŐekkürü bir borç bilirim.

Dr. Mustafa Emre ERCİN

## ÖZET

**Malign Melanomda Hipoksik Süreç ve İlişkili Genlerin Araştırılması, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2014.**

Basamaklı karsinogenez sürecinde neoplazinin içinde bulunduğu mikroçevre oldukça önemli bir yere sahiptir. Hipoksi de tümör gelişimi ve progresyonuna katkıda bulunan mikroçevresel etmenlerden biridir. Artmış proliferasyon ve metabolik gereksinim sonucu fizyolojik oksijen düzeyinin düşmesi solid tümörlerin tipik özelliğidir ve tümör hipoksisi olarak adlandırılır. Tümör hücresi meydana getirmiş olduğu bu hipoksik mikroçevreye adaptasyonu sağlamak ve bu negatif durumu kendi lehine çevirmek için aracı olarak önemli bir protein olan hipoksi indüklenebilir faktörü (*HIF-1*) kullanır.

*HIF-1*, hipoksinin en önemli düzenleyici proteindir. *HIF-1*, *alfa* ve *beta* (*ARNT*) olmak üzere iki komponentten oluşur. Normoksik koşullarda *HIF-1 alfa* proteini hızla ubiquitinlenip proteozomda yıkılırken, hipoksik koşullarda stabilize edilip sitoplazmada birikir. Biriken *HIF-1 alfa* çekirdek içine göç eder ve nükleusta beta alt ünite ile birleşip hipoksiye cevap veren genlerin aktive olmasını sağlar. Hedefe yönelik tedavide hipoksi ile ilişkili genler araştırılmaktadır.

Biz bu çalışmamızda malign melanom hücre hatlarında (CRL-1675, CRL-1676) hipoksik süreç ve ilişkili gen ekspresyonlarının araştırılmasını amaçladık. Primer ve metastatik hücre hatları uygun ortamda büyütülerek, Real-Time PCR yöntemiyle hipoksi ile ilişkili 84 genin ekspresyonları incelenmiştir. Ayrıca primer malign melanom hücre hattında hipoksik ortam oluşturularak, 1. , 4. ve 8. saatlerde gen ekspresyonları arasında farklılıklar araştırılmıştır. Çıkan sonuçlar literatür eşliğinde değerlendirilerek saptanan aday üç genin (*HIF-1 Beta*, *JMJD6*, *NDRG-1*) kodladığı proteinlerin nevüs, melanom ve metastazlarında ekspresyonları, doku array ve arşiv materyallerinde incelenmiştir.

Primer ve metastatik hatlar karşılaştırıldığında toplam 37 genin 2 kat ve üstü farklılık gösterdiği görülmüştür. Primer kutanöz melanomlarda intradermal nevüslere göre *NDRG-1* düzeylerinin düştüğü, *HIF-1 Beta* sitoplazmik boyanmanın ise arttığı saptandı. Yumuşak dokuda

saptanan melanomlarda *JMJD6* proteinin daha yüksek oranda ifade bulunduğu görüldü. Tüm gruplarda üç protein arasında değişik düzeylerde istatistiksel ilişki saptandı.

Çalışmamızda primer ve metastatik hücre hatlarında ekspresyon patternlerinin farklılığının saptanması metastatik tümör klonlarında hipoksiye yanıtın farklı olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca benign lezyonlara göre hipoksik proteinlerin melanomlarda farklı bir profil ortaya çıkardığı dikkati çekmiştir. Bu bulgular, melanomlarda hipoksik süreçlere ışık tutacak ve tedaviye katkı sağlayacak bilgileri sağlamıştır.

#### **Anahtar Kelimeler:**

Melanom, Deri Kanseri, Hipoksi, *HIF-1*, PCR-array, Karsinogenez, Metastaz, *JMJD6*, *NDRG-1*, *ARNT*

## ABSTRACT

**Analysis of hypoxic process and related genes in malignant melanoma, University of KIRIKKALE, Faculty of Medicine, Department of Pathology, Specialization Thesis, KIRIKKALE, 2014.**

Tumor microenvironment has a significant role in the multistep carcinogenesis process. Hypoxia is one of the microenvironmental factors that contributes to tumor development and progression. Decreasing physiological O<sub>2</sub> levels due to increased proliferation and metabolic demand, is a characteristic feature of solid tumors and known as tumor hypoxia. To adapt this hypoxic microenvironment and turn this unfavorable condition in its favor, tumor cell uses *HIF-1* (*Hypoxia Inducible Factor-1*) which is an important protein as a messenger.

*HIF-1* is the most important regulatory protein of hypoxia. It is composed of two subunits:  $\alpha$  and  $\beta$  (*ARNT*). *HIF-1*  $\alpha$  is rapidly ubiquitinated and degraded in proteasome in normoxia whereas it is stabilized and increased in cytoplasm in hypoxia. Accumulated *HIF-1*  $\alpha$  then migrates into nucleus and activates hypoxia responsive genes by binding with  $\beta$  subunit. Hypoxia related genes are investigated in targeted therapy.

In our study we aimed to analyze hypoxic process and related gene expressions in malignant melanoma cell lines (CRL-1675, CRL-1676). Expressions of hypoxia-related 84 genes were investigated by RT-PCR method in cell lines which were grown in convenient medium conditions. Besides, differences between gene expressions were examined in primary malignant melanoma cell lines which were exposed to 1, 4 and 8 hours hypoxia. Expressions of proteins encoded by three candidate genes (*HIF-1* *Beta*, *JMJD6*, *NDRG-1*), selected after evaluation of our study results by literature, in nevi, melanoma and their metastases were studied in tissue arrays and archival materials.

Totally 37 genes were exhibited  $\geq 2$  fold differences in metastatic melanoma vis-à-vis primary melanoma. *NDRG-1* total staining scores were decreased in primary melanoma than nevi. On the other hand, *HIF-1* *Beta* cytoplasmic staining score was increased. *JMJD6* protein

levels were up-regulated in soft tissue localized melanoma. Statistically correlations were determined between three genes in all study groups.

It was suggested that hypoxic response was different in metastatic tumor lineages after differences were detected between primary and metastatic melanomas expression patterns. Furthermore, hypoxic proteins were demonstrated distinct profiles in melanoma with compared benign lesions. These findings will shed light to hypoxic processes in melanoma and provide data for development of new treatment strategies.

**Keywords:**

Malignant Melanoma, Skin Cancers, Hypoxia, *HIF-1*, PCR array, Carcinogenesis, Targeted Therapy, Invasion, Metastasis, *JMJD6*, *NDRG-1*, *ARNT*

## İÇİNDEKİLER

<b>ONAY SAYFASI</b> .....	<b>III</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>IX</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>XI</b>
<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>XIII</b>
<b>TABLolar</b> .....	<b>XIV</b>
<b>GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. MELANOSİTLER:</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. MELANOM TANIMI VE TARİHÇESİ:</b> .....	<b>3</b>
2.2.1. Epidemiyoloji ve İnsidans: .....	4
2.2.2. Moleküler Patogenez: .....	5
2.2.3. Melanomun Histolojik Sınıflandırması: .....	8
2.2.3.1. Kutanöz Melanom: .....	8
2.2.3.2. Oküler Melanom: .....	11
2.2.3.3. Mukozal Melanom: .....	11
2.2.4. Malign Melanom TNM Sınıflandırması-Patolojik Evreleme: .....	18
2.2.5. Prognoz: .....	19
2.2.6. Tedavi: .....	22
<b>2.3. TÜMÖR MİKROÇEVRESİ VE MALİGN MELANOM:</b> .....	<b>22</b>
2.3.1. Hipoksi İndüklenebilir Faktörler: .....	23
2.3.2. JMJD6 (Jumonji domain-containing protein 6): .....	25
2.3.3. NDRG-1 (N-myc downstream-regulated gene-1): .....	27
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>30</b>
3.1. Olgü Seçimi: .....	30
3.2. Hücre Kültürü: .....	30
3.3. RNA eldesi ve cDNA sentezi: .....	32
3.4. Real Time-PCR: .....	32
3.5. Gen Ekspresyon Analizi: .....	32
3.6. İmmünohistokimya: .....	32
3.6.1. İmmünohistokimyasal Skorlama: .....	32



3.7. Hipoksi Deneyi: .....	33
3.8. İstatiksel Yöntem: .....	33
<b>BULGULAR.....</b>	<b>35</b>
4.1. Real Time PCR Bulguları:.....	35
4.1.1. Primer ve Metastatik Hücre Hatlarının Karşılaştırılması:.....	35
4.2. Hipoksi çalışmaları: .....	37
4.3.İmmünohistokimya Bulguları: .....	41
4.3.1. Hipoksi Çalışması:.....	41
4.3.2. Çalışma Grubu:.....	43
4.3.3. H-Skor Bulguları: .....	44
4.4.İstatiksel Bulgular: .....	48
<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>50</b>
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>57</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>58</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>74</b>

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

<b>HIF-1:</b>	Hipoksi İndüklenebilir Faktör 1
<b>JMJD6:</b>	Jumonji-Domain Containing Protein 6
<b>NDRG1:</b>	N-myc downstream-regulated gene 1
<b>Dp44mT:</b>	Di-2-Piridilketon-4,4-dimetil-3-tiyosemikarbazon
<b>PCR:</b>	Polimeraz Zincir Reakyonu
<b>cDNA:</b>	Komplementer DNA
<b>CDK2NA:</b>	Siklin Bağımlı İnhibitör Kinaz 2A
<b>GNAQ:</b>	Guanin Bağlayıcı G Protein, q Polipeptid
<b>MAPK:</b>	Mitojen Aktive Protein Kinaz
<b>PI3K:</b>	Fosfoinositol-3 kinaz
<b>AHRT:</b>	Aril Hidrokarbon Reseptör Taşıyıcısı
<b>vHL:</b>	von-Hippel-Lindau Proteini
<b>DpC:</b>	Di-2-Piridilketon-4-Sikloheksil-4-Metil-3-Tiyosemikarbazon
<b>VEGF:</b>	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
<b>PHD:</b>	Prolil Hidroksilaz
<b>TAD:</b>	Transaktivasyon Bölgesi
<b>AJCC:</b>	Amerikan Kanser Birliği
<b>bHLH:</b>	Basic-Helix-Loop-Helix
<b>HCE:</b>	Hipoksi Cevap Elementi
<b>CDK 4:</b>	Siklin Bağımlı Kinaz 4
<b>CDK6:</b>	Siklin Bağımlı Kinaz 6

<b>miRNA:</b>	Mikro RNA
<b>AKT:</b>	Protein Kinaz B
<b>mTOR:</b>	Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
<b>PTEN:</b>	Fosfataz ve Tensin Homologu
<b>MITF:</b>	Mikrooftalmi İle İlişkili Transkripsiyon Faktörü
<b>ERBB4:</b>	Reseptör Tirozin-Protein Kinaz ErbB-4
<b>U2AF65:</b>	Splicing Factor U2 Auxiliary Factor 65 kDa Subunit
<b>EMT:</b>	Epitelyal-Mezenkimal Değişim
<b>AP-1:</b>	Aktive Edici Protein 1
<b>uPAR:</b>	Ürokinaz Plazminojen Aktivatör Reseptör
<b>AMF:</b>	Otokrin Motilite Faktör
<b>Cap43:</b>	Calcium Protein 43,000
<b>TGF-<math>\alpha</math>:</b>	Transforming Growth Factor Alpha
<b>EMEM:</b>	Eagle's Minimal Essential Medium
<b>PBS:</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>ACTB:</b>	Beta Cytoskeletal Actin
<b>B2M:</b>	Beta-2-Mikroglobulin
<b>GAPDH:</b>	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrojenaz
<b>RPLP0:</b>	Ribosomal Protein, Large, P0
<b>EDTA:</b>	Etilen Diamin Tetra Asetat
<b>CRL-1675 (WM-115):</b>	Primer Melanom Hücre Hattı
<b>CRL-1676 (WM-266-4):</b>	Metastatik Melanom Hücre Hattı

## ŞEKİLLER

ŞEKİL NO:

SAYFA NO:

Şekil-1: Melanomda aktif olan yolaklar ve birbirleriyle olan ilişkileri .....	7
Şekil-2 : İntradermal nevüs(x100) .....	12
Şekil-3 :Melanoma in situ (x100).....	12
Şekil-4 : Yüzeysel yayılan malign melanoma (Pagetoid yayılım) (x100) .....	13
Şekil-5: Nodüler melanom (x40).....	13
Şekil-6 : Akral lentigenöz melanom (x100).....	14
Şekil-7 : Uveal melanom (x100).....	14
Şekil-8 : Mukozal melanom (x100) .....	15
Şekil-9: <i>HIF-1</i> kompleksi oluşumu .....	23
Şekil-10: <i>HIF-1</i> Beta proteininin yapısı .....	25
Şekil-11: <i>JMJD6</i> proteininin yapısı.....	25
Şekil-12: Histon kuyruklarındaki metil gruplarının <i>JMJD6</i> tarafından kaldırılması .....	26
Şekil-13: <i>NdrG-1</i> 'in biyolojik etkileri .....	27
Şekil-14: Kanserde <i>NdrG-1</i> 'in fonksiyonu ve düzenlenmesi .....	28
Şekil-15: Metastatik melanom hücre hatlarında hipoksi ile ilişkili genlerin saçılım grafiği .....	36
Şekil-16: 1 saatlik hipoksi sonrası hipoksi ile ilişkili genlerin saçılım grafiği.....	38
Şekil-17: 4 saatlik hipoksi sonrası hipoksi ile ilişkili genlerin saçılım grafiği.....	39
Şekil-18: 8 saatlik hipoksi sonrası hipoksi ile ilişkili genlerin saçılım grafiği.....	40
Şekil-19: Primer melanom hücre hatlarında hipoksi deneyi sonrası immünohistokimya skorlarının değişim grafikleri.....	41
Şekil-20: Gruplar arasında <i>JMJD6</i> sitoplazmik-nükleer H-skor değerlerinin box-plot grafikleri ....	45
Şekil-21: Gruplar arasında <i>HIF-1 Beta</i> sitoplazmik-nükleer H-skor değerlerinin box-plot grafikleri .....	46
Şekil-22: Gruplar arasında <i>NDRG-1</i> sitoplazmik-nükleer H-skor değerlerinin box-plot grafikleri .	47

## TABLolar

**TABLO NO:**

**SAYFA NO:**

Tablo-1: Dünya Sağlık Örgütü 2006 Sınıflamasına Göre Melanom Alt Tipleri .....	8
Tablo-2: Melanomun temel histolojik kriterleri .....	16
Tablo-3: Melanom Alt Tiplerinin Klinik ve Histolojik Özellikleri .....	17
Tablo-4: Melanomda Evreleme .....	19
Tablo-5: Breslow Kalınlığına göre 5 Yıllık Sağ Kalım ve Eksizyon sınırları .....	20
Tablo 6: Breslow kalınlığı ölçümü .....	20
Tablo-7: AJCC 2008 Ortak Veritabanı- Evre I/II Hastalarındaki Mitoz Sayısı/mm <sup>2</sup> İle Sağ Kalım Oranları .....	21
Tablo-8: HIF-1 tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilen genler .....	24
Tablo-9: Primer ve Metastatik Melanom Hücre Hatlarının İvert Mikroskop Görüntüleri .....	31
Tablo-10: Primer Melanom Hücre Hatlarının JMJD6, HIF-1 Beta ve NDRG-1 Antikorları İle Boyanması .....	42
Tablo-11: Çalışma Gruplarında İmmünohistokimyasal (Pozitif Boyanma/Yüzdesi) Sonuçlarının Dağılımı .....	43
Tablo-12: Primer Kutanöz Melanom İle İntradermal Nevüsün <i>JMJD6</i> , <i>HIF-1 Beta</i> ve <i>NDRG-1</i> Antikorları ile Boyanması (x100) .....	43

## GİRİŞ

Melanom nöral krest kaynaklı pigment üretici hücrelerden köken alan yaşamı tehdit edici malign neoplazmdir.(1) Malign melanom en sık deride görülmekle birlikte oküler, mukozal ve leptomeningeal olarak vücudun diğer yerlerinde de saptanabilir.(2)

Melanom kompleks etyopatogeneze sahiptir ve germline, somatik mutasyonlar ile sitogenetik değişiklikler tümöröenez sürecine katkıda bulunmaktadır. Germline mutasyonlar içerisinde *CDKN2A*, *CDK4*, *BAP1*, *MC1R*, *VDR* ile Kseroderma Pigmentoza neden olan gen grubu yer almaktadır.(3-5) Somatik mutasyonlar içerisinde kutanöz melanomlarda sıklıkla *B-RAF*, *N-RAS*, akral ve mukozal melanomlarda sıklıkla *c-KIT*, uveal melanomda *GNAQ/11* mutasyonları bulunmaktadır.(6-9) Sitogenetik değişiklikler arasında 1q, 6p, 7q, 7p, 20q kazanımları ile 6q, 9p, 9q, 11q kayıpları izlenmektedir.(10, 11)

Metabolik mikroçevre tümör oluşumunda önemli faktörlerden birisidir.(12) Hipoksi karsinogenezde yer alan önemli mikroçevresel faktörlerden biridir.(13) Metabolik gereksinimlerin hızlı proliferasyon sonucunda artması ile fizyolojik oksijen düzeyinin düşmesi solid tümörlerin karakteristik özelliğidir ve tümör hipoksisi olarak bilinmektedir.(14, 15) Hipoksinin melanosit transformasyonunda, sağkalımında ve melanom oluşumunun tüm basamaklarında rolü olduğu düşünülmektedir. (16)

HIF-1 hipoksi sinyal yolağını kontrol eden en önemli proteindir ve alfa ile beta olmak üzere iki alt üniteden oluşur.(17) Normoksik koşullarda HIF-1  $\alpha$  sitoplazmada ubiquitin bağımlı olarak yıkılır. Ancak ağır hipoksi durumunda HIF-1  $\alpha$  sitoplazmada birikir ve nükleusa göç ederek HIF-1  $\beta$  ile heterodimerik bir kompleks oluşturarak hipoksi ilişkili hedef genlerin transkripsiyonunu artırır.(18, 19) Kromatin düzenleyiciler (*JMD2B*, *JMJD2C*, *MLL*), transkripsiyon faktörleri (*Snail*, *Twist1*,  *$\beta$ -catenin*, *SMAD7*), enzimler (*MMP1*, *MMP3*, *LOX*, *IDH2*), adhezyon molekülleri (*CD151*, *LICAM*), reseptörler (c-Met, TLR4), miRNAlar (miR-210, miR-126, miR-21, miR-34a) hedef genler arasında yer almaktadır.(20, 21)

Çalışmamız sırasında gen ekspresyon analizi sonucunda üç proteine bu çalışmada odaklanılmıştır. Bunlar *JMJD6*, *HIF-1 Beta* ve *NDRG-1*'dir. *HIF-1  $\beta$* , 789 aminoasitten oluşan 87

kDa ağırlığında bir proteindir. N-ucu basic-helix-loop-helix (bHLH) ve PER-ARNT-SIM (PAS) bölgelerini içermektedir. Basic bölgesi DNA bağlanması için gereklidir. HLH-PAS bölgesine ise *HIF-1 alfa* ve *beta*'nın dimerizasyonu için ihtiyaç duyulur. C-ucunda transaktivasyon bölgesi (TAD) içermektedir.(22, 23)

*JMJD6*, posttranslasyonel hidroksilasyon (U2AF65-LUC7L2) ile histon 3 (H3R2)-histon 4 (H4R3) demetilasyonunda (histon arjinin demetilaz) görevli olduğu düşünülen ve embriyogenezde birçok hücrenin ve dokunun farklılaşmasında gerekli olan 47 kDa ağırlığında 403 aminoasitten oluşan bir proteindir.(24) *JmJc* bölgesi içeren histon demetilazlar lizin rezidülerindeki metil grupları uzaklaştırırken sadece *JMJD6* arjinin rezidüleri üzerindeki metil gruplarını uzaklaştırır. Literatürde özellikle histon demetilasyonda yer alan *JmJc*-bölgesi içeren enzimleri (*JMJD1A*, *JMJD2B*) hipoksinin upregüle ettiği gösterilmiştir.(25, 26)

*NDRG-1* (Cap43/Drg1), ilk olarak Charcot-Marie-Tooth Tip 4D hastalığında tanımlanan metastazın baskılanması, stres cevabı ve hücrel diferansiyasyon ile ilişkisi olduğu düşünülen 43 kDa ağırlığında 394 aminoasitten oluşan bir proteindir.(27, 28) Hipoksinin RNA ve protein düzeyinde *NDRG-1* geninin ekspresyonunu indüklediği ve kolon kanseri dışındaki birçok tümörde (Melanom, böbrek, akciğer, beyin, meme kanseri) hem sitoplazmik hem de nükleer ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.

Biz bu çalışmamızda WM-115 ve WM-266-4 malign melanom hücre hatlarında hipoksinin gen ekspresyon patterni üzerine olan etkisini belirlemeyi amaçladık. Bu amaç doğrultusunda gen ekspresyon analizi sonucunda seçilen 3 gene (*JMJD6*, *HIF-1 Beta* ve *NDRG-1*) ait antikolarla hücre hatlarından hazırlanan hücre bloklarını, bölümümüzdeki 16 malign melanom ve 10 intradermal nevuse ait parafine gömülü dokulardan hazırlanan kesitleri ve toplam 208 (primer ve metastatik melanoma) vaka bulunduran doku arrayini immünohistokimyasal olarak boyandıktan sonra karşılaştırmalı olarak gruplar arasındaki fark incelendi.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Melanositler:

Melanositler deride epidermisin bazal tabakasında yer alan özelleşmiş hücrelerdir. Melanositler embriyogenezde nöral-krest prekürsör hücrelerden gelişirler.(29) Deri dışında göz, mukoza, iç kulak, meninks, kemik ve kalpte de bulunmaktadır.(30, 31)

Dendritik uzantıları ile epidermal-melanin birimindeki yaklaşık 40 keratinosit ile ilişki kurarlar.(32) Membrana bağımlı organeller içerisinde (melanozomlarda) melanin pigmentini üretilip epidermisteki çevre keratinositlere ve yeni oluşturulan kıl foliküle göndermek melanositlerin asıl görevleridir.(33) Melanin pigmenti ultraviyolenin (UV) neden olduğu DNA hasarından korunmada ve termoregülasyonda görevlidir.(34)

Melanositlerin proliferasyonu, diferansiasyonu ve melanogenezis çevre keratinositlerden salgılanan faktörlerin (*NGF,ET-1,SCF, $\alpha$ -MSH,bFGF*) kontrolü altındadır.(35) Melanositlerin gelişim sürecinde yer alan genler arasında *MITF, Kit, Snail/Slug, SOX ve Endotelinler* bulunmaktadır.(36)

### 2.2. Melanom Tanımı ve Tarihçesi:

Melanomlar nöral krestten köken alan pigment üretici hücrelerin oluşturduğu yaşamı tehdit edici malign neoplazmlardır. Sıklıkla kutanöz orijinli olmakla birlikte daha az sıklıkla oküler, mukozal ve leptomeningeal melanom olarak da karşımıza çıkabilmektedir.

Melanomlardan M.Ö. 5. Yüzyılda Hippokrat metastaz yapan ölümcül siyah tümörler olarak ilk defa bahsetmiştir. 1960 yılında paleopatologların 9 inka mumyasına ait kemik ve deri örneklerine yapmış oldukları incelemede örneklerin M.Ö. 4 yüzyıla ait olduğu ve kafatası ve ekstremitte kemikleri ile deriye metastaz yapmış malign melanom olguları olduğu görülmüştür.(37) 1787 yılında John Hunter metastatik melanomu "*kanserli mantarsı yumru*" olarak tarifleyerek opere etmiştir. 1968 yılında bu olgunun metastatik malign melanom olduğu mikroskopik incelemede anlaşılmıştır. 1806 yılında Rene Laennee ayrıntılı bir şekilde hastalığı tariflemiş ve melanozis olarak isimlendirmiştir. 1840 yılında İngiliz cerrah Samuel Cooper ileri evre melanomun tedavisinin olmadığını ve hastanın tek fayda göreceği durumun melanomun



erken rezekte edilmesi olduğu görüşünü ortaya atmıştır. 1956 yılında Henry Oliver Lancaster ise melanomun etyolojisinde güneş ışığı ile direkt ilişkilendirmiştir. (38)

### **2.2.1. Epidemiyoloji ve İnsidans:**

Amerika'da 2013 yılında 76690 yeni olgunun ortaya çıktığı ve 9780 hastanın melanom nedeniyle kaybedildiği bildirilmiştir. Erkeklerde 5. ve kadınlarda 7. en sık görülen kanser tipidir.(39) Etnik gruplar açısından incelendiğinde her iki cinsiyette beyaz ırkta en fazla görülürken, siyah ırkta daha az görülmektedir. İnsidansındaki artışa rağmen ölüm oranları daha yavaş bir artış göstermektedir.(40)

En yüksek insidansa Avustralya ve Yeni Zelanda sahiptir.(41) En düşük insidans ise Akdeniz ülkelerindedir. Bunun nedeni olarak daha koyu deri rengine (Fitzpatrick III-IV) sahip olmaları düşünülmektedir. Almanya'daki 78809 malign melanoma vakası incelendiğinde erkeklerde en sık gövde (özellikle sırt) ve kadınlarda en sık alt ekstremitede görüldüğü bulunmuştur. 80 yaş ve üstü hastalarda gövde ve alt ekstremitte görülme sıklığı azalırken, baş boyun melanomu daha sık görülmektedir.(42)

Türkiye'de kanser kayıt sistemindeki yetersizlikler nedeniyle insidans ve prevalans istatistikleri güvenilir değildir. Ülkemizde 1988-2007 yılları arasındaki malign melanom tanısı alan 1131 hastayı inceleyen bir çalışmada ortalama tanı yaşının 52 olduğu ve 70 yaş ve üstü hastalarda görülme sıklığının arttığı görülmüştür. (43)

*National Cancer Intelligence Network* tarafından İngiltere'de 1990-2009 yılları arasındaki malign melanom olguları incelendiğinde sıklıkla güneşten etkilenen bölgelerde ortaya çıktığı ve daha az sıklıkla güneşten etkilenmeyen diğer anatomik bölgelerde görülebileceği ortaya çıkmıştır. Kadınlarda en sık alt ekstremitte iken, erkeklerde gövdede daha sık görülür.

Beyaz ırkta sıklıkla güneş gören bölgelerde görülürken, siyah ırkta güneşten etkilenmeyen mukozal ve akral (plantar, palmar, subungual) bölgelerde görülmektedir. Beyaz ırkta sıklıkla yüzeysel yayılan malign melanom, siyah ırkta akral lentigenöz malign melanom görülür. (44)

### 2.2.2. Moleküler Patogenez:

Melanomun dünyada insidansının artması ve ileri evre tedavi cevabının düşük olması nedeniyle çalışmalar moleküler mekanizmalara odaklanmıştır. “MAPK” ve “PI3K-Akt-mTOR” yolları sporadik melanomların onkogenesinde yer alan iki önemli yoldur. (Şekil-1)

#### MAPK (*Ras-Raf-Erk*) Yolağı:

##### **Kit:**

*Kit* (*CD117*) melanosit gelişiminde önemli rol oynayan reseptör tirozin kinazı kodlayan genidir. UV'ye daha az maruz kalan akril ve mukozal anatomik bölgelerde *Kit* lokusunun (4q11) mutasyonu veya amplifikasyonu daha sık görülmektedir.(45)

##### **Ras:**

*N-Ras*; *Ras* ailesi içerisinde melanomda en sık mutasyona uğrayan genidir. *H-Ras* ve *K-Ras* mutasyonları melanomda nadirdir. Melanomda en sık görülen *N-Ras* mutasyonu Q61R'dir. Primer ve metastatik melanomların yaklaşık 1/3'ü *N-Ras* mutasyonu içermektedir ve sıklıkla nodüler melanomda görülür. (46)

##### **B-Raf:**

*A-Raf*, *B-Raf* ve *C-Raf* olmak üzere 3 izoformdan oluşan *Raf* ailesi serin-treonin özgül protein kinazdır. Melanomların yaklaşık %50-70'inde *B-Raf* mutasyonu görülür. *B-Raf* mutasyonların %90'ı 600. kodonda valinin glutamik asitle yer değiştirmesi sonucu (*B-Raf*<sup>V600E</sup>) sonucunda ortaya çıkar. *B-Raf* mutasyonu kanser ile ilişkili genlerin (*VEGF*, *HIF-1*, *MDM2*, *Siklin D*, *MMP2*, *Ürokinaz*) ekspresyonlarının artmasına neden olur.(47, 48) Displastik nevüs dahil benign melanotik lezyonların %80'inde *B-raf* mutasyonlarının bulunması bu lezyonların oluşumunda erken değişiklik olduğunu ancak malign transformasyon için yeterli olmadığını düşündürmektedir. (49)*B-Raf*<sup>V600E</sup> mutasyonu ile birlikte *p53* veya *PTEN*'in susturulması ile hayvan kanser modellerinde melanom gelişimi gerçekleştirilmiş ve lenf nodu ve akciğer metastazı gözlenmiştir. *B-Raf* mutasyonları yüzeysel yayılan melanomda daha sık görülmektedir.(50, 51)

**GNAQ/GNA11:**

Hücre yüzeyinde yer alan G-protein alfa alt birimi q-sınıfı üyeleridir. G-protein ilişkili reseptörün uyarılması ile GDP GTP'ye dönüşerek *MAPK* yolağının aktive olmasıyla sonuçlanan kaskadı aktive ederler ve fizyolojik olarak intrinsik fosfataz (GTPaz) GTP sinyalini durdurur. Ancak GNAQ/GNA11 mutasyonunda GTPaz inaktive olur. Primer uveal melanomların %45'inde GNAQ, %32'sinde GNA11 mutasyonlarına rastlanılmaktadır. Metastatik uveal melanomların %22'sinde GNAQ mutasyonu mevcut iken %57'sinde GNA11 mutasyonu bulunur. GNA11'in uzak metastaz için daha yüksek riske sahip olduğu düşünülmektedir.(52)

**MITF:**

Melanoblastların ve melanositlerin diferansiasyon, proliferasyon ve sağ kalımının en önemli düzenleyicisidir. *MITF* melanomda indükleyici/baskılayıcı etki gösterir. *MITF* onkogeninin amplifikasyonları primer melanomda %10, metastatik melanomların %21'inde görülürken, nevüslerde görülmez.(53)

**Ras/Fosfatidilinositol-3-Kinaz (PI3K-AKT-mTOR) ve PTEN Yolağı:****Akt:**

*PI3K*'nin *Ras* veya direct olarak tirozin kinaz reseptör grubu (*c-Kit*, *c-Met*, *ERBB4*) tarafından uyarılması sonucunda *PIP2*'nin *PIP3*'e dönüşümü gerçekleşir ve *Akt*'in aktivasyonuna neden olur. Bu aktivasyon sonucunda proliferasyonu, sağkalım, angiogenez, apoptozun inhibisyonu, motilite, invazyon gibi özellikler sağlanmış olur. *Akt* bu yolda yer alan önemli bir serin-treonin protein kinaz B'dir. *Akt*'in overekspresyonunun melanom hücre hatlarında radial büyüme fazından vertikal büyüme fazına geçişe neden olduğu gösterilmiştir.(54)

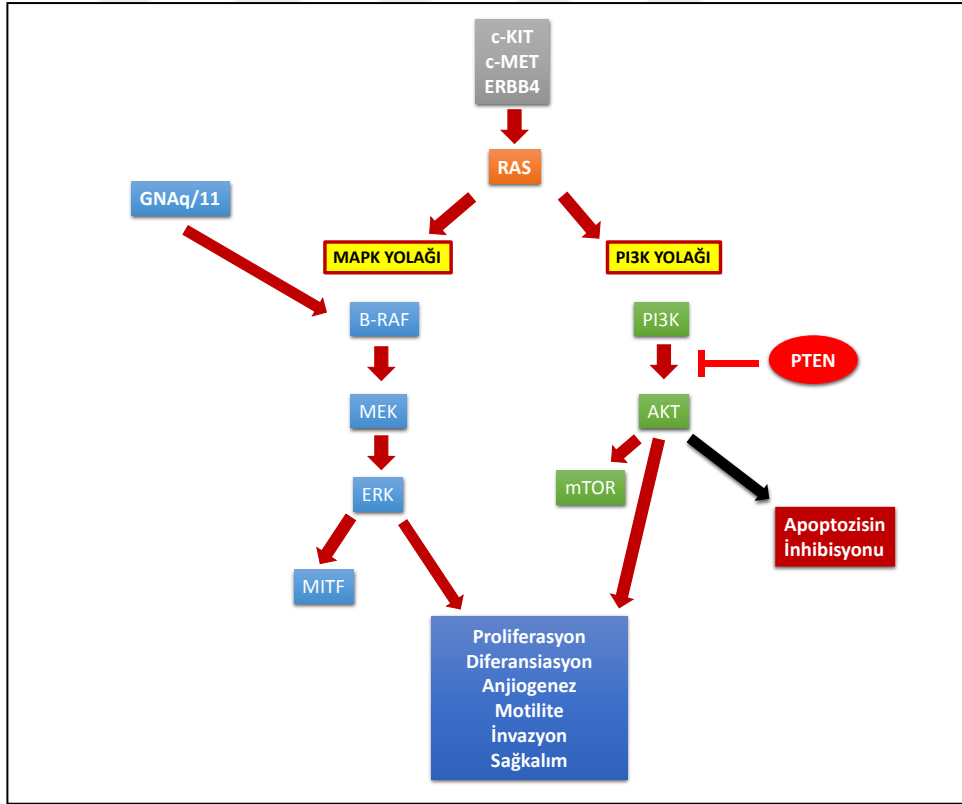
**PTEN:**

*PTEN* (*MMAC-1/TEP-1*) hücre içi fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfat (*PIP3*) düzeyini defosforilasyon ile düzenleyen lipid ve protein fosfatazı kodlayan gendir. Embriyogenez, hücre migrasyonu, apoptoz, tümör baskılanmasında görevlidir. Tümör hücrelerinde *PTEN*'in fonksiyonel kaybı *AKT* fosforilasyonunu ve aktivitesini artırarak apoptozun azalmasına ve hücrenin sağkalımının artmasına neden olur.(55) Melanom hücre hatlarının %30-50'sinde ve

melanomların %5-15'inde *PTEN*'in homozigot delesyonu veya mutasyonu mevcuttur.(56) Metastatik melanom hastalarında epigenetik olarak *PTEN*'in susturulması (*PTEN* metilasyonu) primer melanom hastalarına göre artmış olması *PTEN*'in melanom progresyonunda rolünün olduğunu düşündürmektedir.(57) *PTEN* ve *N-Ras* mutasyonu birlikteliği melanomda nadir iken *B-RAF-PTEN* mutasyonları melanomların %20'sinde birlikte görülmektedir.(58)

### ***mTOR*:**

*Akt*'in aktive ettiği protein translayonunda, ribozom formasyonunda, otofajide ve metabolizmada görevli serin-treonin protein kinazdır. Malign melanom hücre hatlarının çoğunda aktive olduğu gösterilmiştir. Benign melanotik lezyonlarda aktivasyonu nadirdir.(59)



**Şekil-1: Melanomda aktif olan yollar ve birbirleriyle olan ilişkileri**

Şekil hazırlanırken (60) nolu kaynaktan yararlanılmıştır.

### 2.2.3. Melanomun Histolojik Sınıflandırması

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2006 yılında malign melanomun farklı morfolojik tiplerini sınıflandırmıştır. (Tablo 1)

**Tablo-1: Dünya Sağlık Örgütü 2006 Sınıflamasına Göre Melanom Alt Tipleri**

<b>Kutanöz melanoma</b>
Yüzeysel yayılan melanom
Nodüler melanom
Lentigo maligna melanom
Akral lentigenöz melanom
Dezmozplastik melanom
Mavi nevus benzeri melanom
Konjenital nevüsten köken alan melanom
Çocukluk çağı melanomu
Nevoid melanom
Persistan melanoma
<b>Uveal melanoma</b>
<b>Mukozal melanoma</b>

#### 2.2.3.1. Kutanöz Melanom:

##### Yüzeysel Yayılan Melanom:

Yüzeysel yayılan melanom en sık görülen alt tiptir ve tüm melanomların yaklaşık %70'ini oluşturmaktadır. Çoğunluğu de novo olarak gelişir. Yalnızca dörte biri önceden var olan nevüsten gelişir. Erkeklerde sıklıkla gövdede özellikle sırtta, kadınlarda ise alt ekstremitelerde görülme eğilimi vardır. Birkaç milimetreden birkaç santime kadar değişen boyutlarda düzensiz sınırlı, siyah kahverengi gölgeli renk değişiklikleri içeren makül veya plak olarak karşımıza çıkar. Depigmente alanlar içerebilir. Erken dönemde radial büyüme ve ilerleyen dönemlerde papiller ve retiküler dermisi invaze eden melanomdur. Mikroskopisinde epidermiste belirgin nükleollü, pigmentli sitoplazmalı pagetoid yayılım veya epiteloid hücreler görülür. Epidermiste hiperplazi olabilir.(61)

### **Nodüler Melanom:**

Nodüler melanom ikinci en sık görülen melanom tipidir. (%15-30) Sıklıkla koyu pigmente, pedünküle veya polipoid nodül olarak karşımıza çıkar. %5 oranında amelanotik olabilir. 1 mm kalınlıkta tanı konulabilen yüzeysel yayılan tip ve lentigo maligna melanomun aksine tanı esnasında 2 mm kalınlığa sahiptir. İntraepidermal lateral yayılım görülmez. Hızlı vertikal büyüme gösterirler. Mikroskopisinde dermiste ekspansil nodülü oluşturan tümör hücre agregatları mevcuttur. Nodüler lezyondan 3 rete sonrasında in situ komponent görülmez.(62)

### **Lentigo Maligna Melanom:**

Lentigo maligna melanom tüm melanomların %10-15 oranında görülür. Yaşlılarda sıklıkla güneş gören deride (baş-boyun) kahverenkli makül olarak başlar. Zamanla giderek büyümeye başlar ve asimetric değişik renk tonunda odaklar oluşur ve yüzeysel kabarıklar oluşması ile dermal invazyon başlamış olur. Mikroskopisinde epidermal-dermal bileşkede melanosit yoğunluğunda artış, multinükleer hücreler, kıl folliküllerine uzanım vardır. Epidermis atrofiktir.(63)

### **Akrall Lentigenöz Melanom:**

Akrall lentigenöz tip melanomların %5'ini oluşturur. Ancak koyu tenli kişilerde ve zencilerde en sık görülen melanom türüdür. Genellikle avuç içi, ayak tabanı ve tırnak altında görülür. Kahverengi-siyah renkli düzensiz sınırlı maküler lezyonlardır. Proksimal veya lateral tırnak katlantılarında ek pigmentasyon olması (Hutchinson'un melanositik dolması) subungual melanom için tanı koydurucudur. Prognozu kötüdür. Mikroskopisinde lentigenöz dağılım, sitoplazmik retraksiyon, nükleer pleomorfizm, hiperkromazi, retelerin ucunda geniş "junctional" yuvalanmalar görülür.(64)

### **Dezmoplastik Melanom:**

İğsi hücreli melanomun nadir bir varyantıdır. Kutanöz melanomların %1-4'ünü oluşturmaktadır. Baş-boyun bölgesinde sıklıkla görülmektedir. Lezyonlar genellikle ağrısız ve amelanotiktir. Bu yüzden sıklıkla dermatofibrom veya skarla karıştırılır.(65) Rekürrens siktir ve metastaz sıklıkla akciğere olur. Mikroskopisinde difüz infiltratif görünümde iğsi şekilli, bazofilik

dar sitoplazmalı, hiperkromazik nükleuslu ve belirgin eozinofilik nükleollü melanositlerin proliferasyonu mevcuttur.(66) Dermatofibromla karışabilecek fokal storiform alanlar olabilir.(67) Kollajenlerin skar-benzeri görünümü vardır. Perinöral invazyon görülebilir. İmmünohistokimyada S-100, nöron spesifik enolaz, P75 sinir büyüme faktörü reseptörü (P75 NGF-R) ve vimentin ile pozitif boyanma gösterirler. (68) HMB-45 ile süperfisyel papiller dermisteki tümör hücrelerinde pozitiflik olabilir ancak genellikle negatiftir. p16 reaktivitesinin kaybı desmoplastik nevüsten ayırımında yararlı olabilir.(69)

#### **Mavi Nevüs Benzeri Melanom:**

Agresif davranış gösteren sıklıkla lenf nodu, akciğer ve karaciğere metastaz yapma eğilimli, erkeklerde daha sık görülen nadir bir tümördür. Genellikle sellüler mavi nevus zemininden gelişirler. Sıklıkla kafa derisinde yerleşim gösterirler. Mikroskopisinde mavi nevus zemininden gelişen olgularda benign lezyondan melanomlu alana geçiş oldukça belirgindir. Veziküler nükleuslu, belirgin nükleollü, nükleus-sitoplazma oranı artmış tümör hücrelerinde nükleer pleomorfizm ve artmış mitotik aktivite izlenir. Vakaların yaklaşık yarısında *ENAG* mutasyonu mevcuttur.(70)

#### **Çocukluk Çağı Melanomu:**

Melanom olgularının %2'si 20 yaş altında, %0,4'ü prepubertal ortaya çıkmaktadır. Yetişkinlerden farklı olarak prepubertal çocuklarda görülen melanom sıklıkla daha kalın, amelanotik ve nodüler olarak karşımıza çıkmaktadır.(71) Çocukluk çağı melanomu klinikte piyojenik granülom ve siğil gibi non-melanotik lezyonları taklit edebilir.(72) Mikroskopik olarak malign potansiyeli tam anlaşılamayan melanositik proliferasyonlar tanıyı zorlaştırmaktadır.(73)

#### **Nevoid Melanom:**

Histolojik benzerlikleri nedeniyle banal nevüsle kolaylıkla karıştırılabilen nadir bir melanom varyantıdır. Mikroskopide verrüköz veya nodüler görünümde olabilir. Papiller dermisi ekspansiyon eden ve üzerindeki epidermis tabakasını incelten difüz nevoid populasyon görülebilir. Tümör hücreleri oldukça uniform görünümde, veziküler nükleuslu ve belirgin nükleollüdür. Tümörü infiltre eden lenfositler, mitoz ve perinöral invazyon görülebilir.(74) Ki-67 ve Siklin D1 immünohistokimyada yararlı olabilir.(74)

### 2.2.3.2. Oküler Melanom:

Oküler melanom erişkinlerdeki en sık primer göz tümörü olup tüm melanomların yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır.(75, 76) Çoğunluğu uvea tabakasından köken alır ve daha az sıklıkla iris ve silier cisimcikte görülebilir.Konjunktivada %5'in altında görülür.(77) Uveal melanomların %80'inde *GNAQ/GNA11* mutasyonları mevcuttur. (78, 79) Uveal melanomlarda metastaz genellikle karaciğere olur.(80) Metastatik uveal melanomların %84'ünde *BAP1 (BRCA İlişkili Protein 1)* inaktivasyonel somatik mutasyonu mevcuttur. (81)

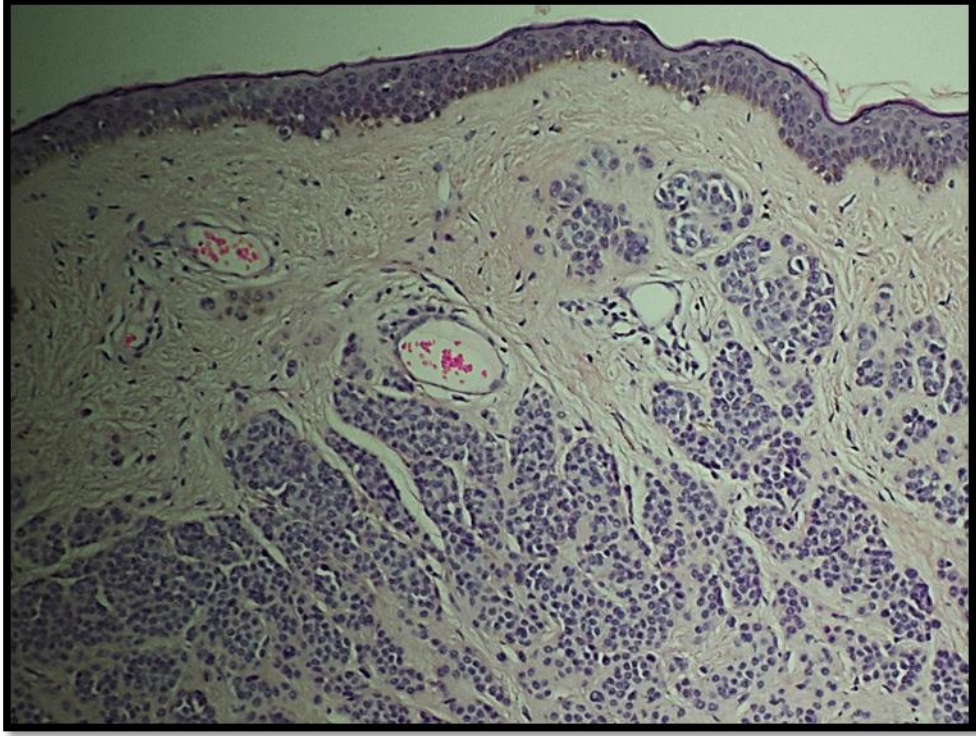
### 2.2.3.3. Mukozal Melanom:

Mukozal melanomlar, solunum yolları, sindirim sistemi ve genitoüriner traktı döşeyen mukozal epitelden köken alırlar. Mukozal melanomlar oldukça nadirdir ve melanomların yaklaşık %1'ini oluşturmaktadır.(82) Sıklıkla baş-boyun, anorektal ve vulvajinal bölgelerden köken alırlar. Ortalama tanı yaşı 70'dir.(83) Kadınlarda daha sık görülür. Genellikle kötü prognozludur. Mukozal melanom siyah ırkta ve Asyalılarda daha sık görülür.(84) En sık *Kit* mutasyonu izlenir. *B-raf* mutasyonu nadirdir.(85)

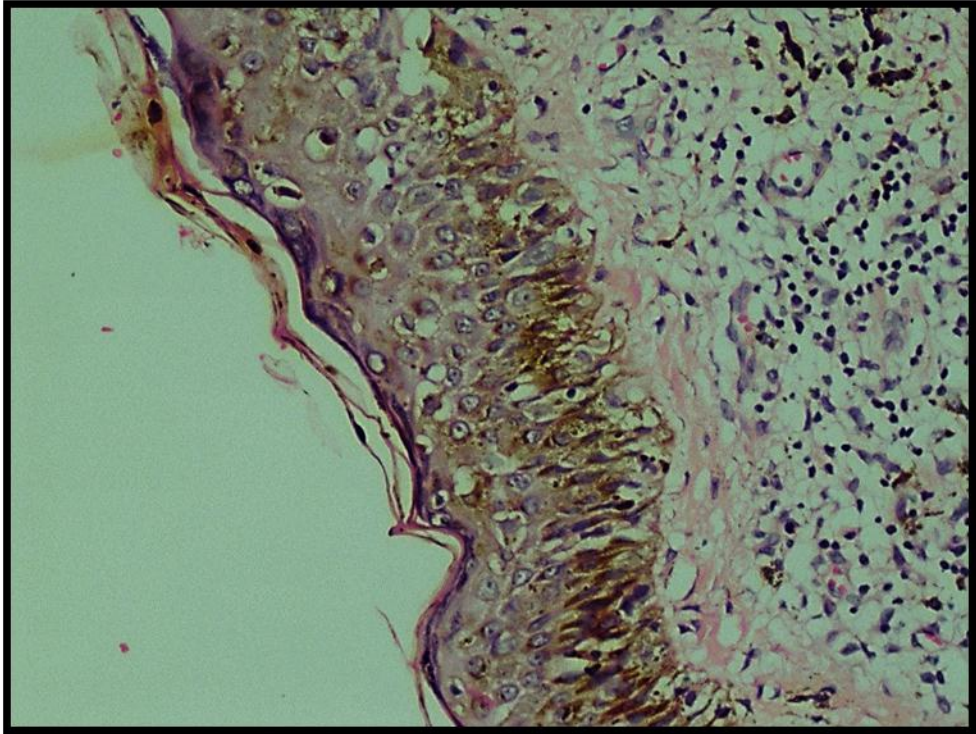
Tablo-2'de malign melanomun temel histolojik ve sitolojik özellikleri özetlenmiştir.

Tablo-3' te melanom alt tiplerinin klinik ve histolojik özellikleri özetlenmiştir.



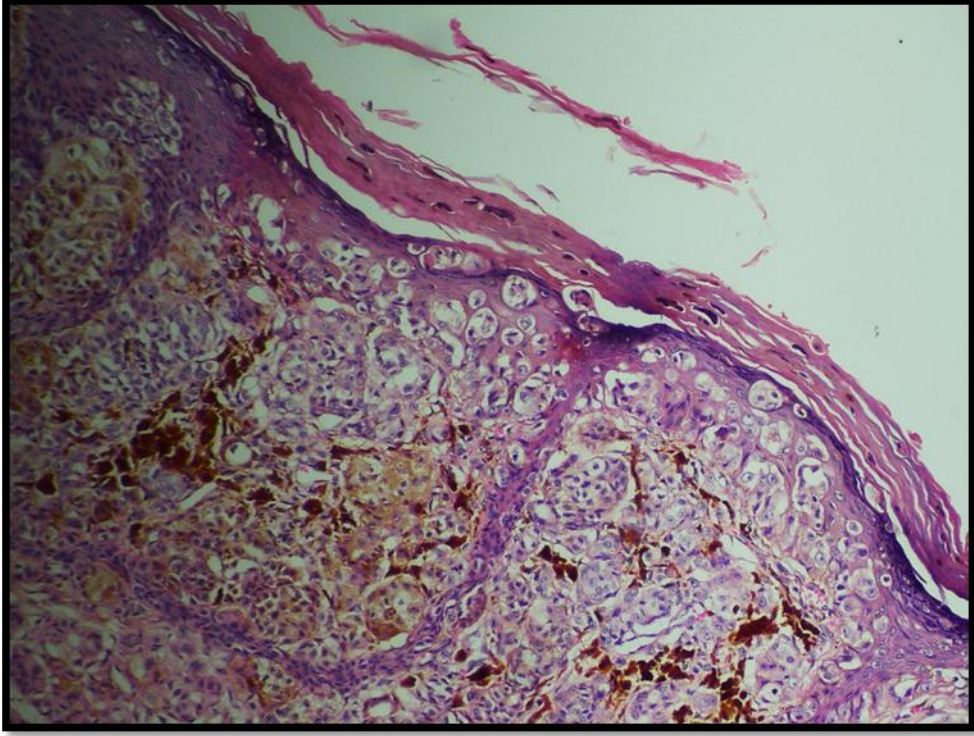


Şekil-2 : İntradermal Nevüs(x100)

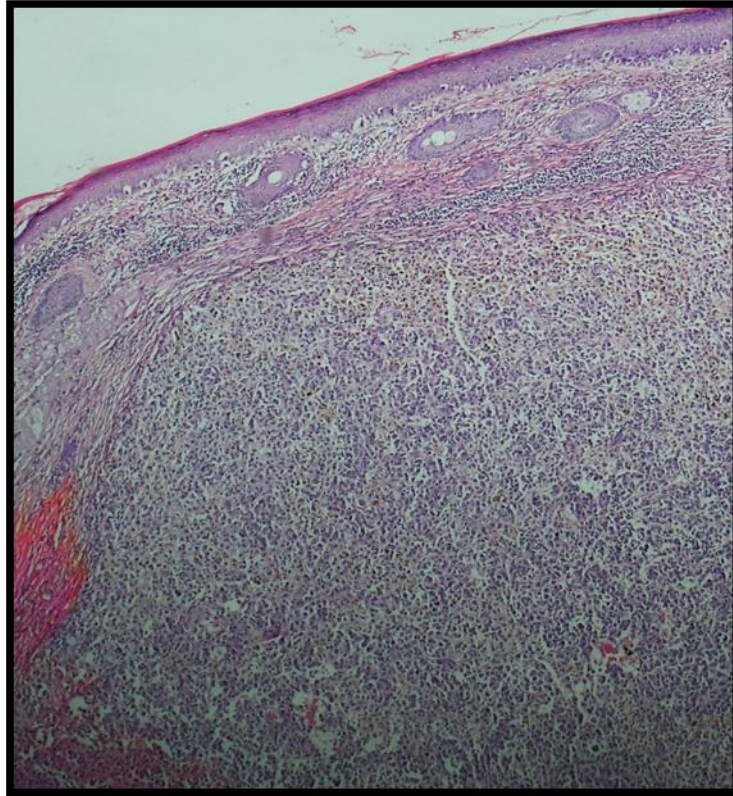


Şekil-3 :Melanoma in situ (x100)



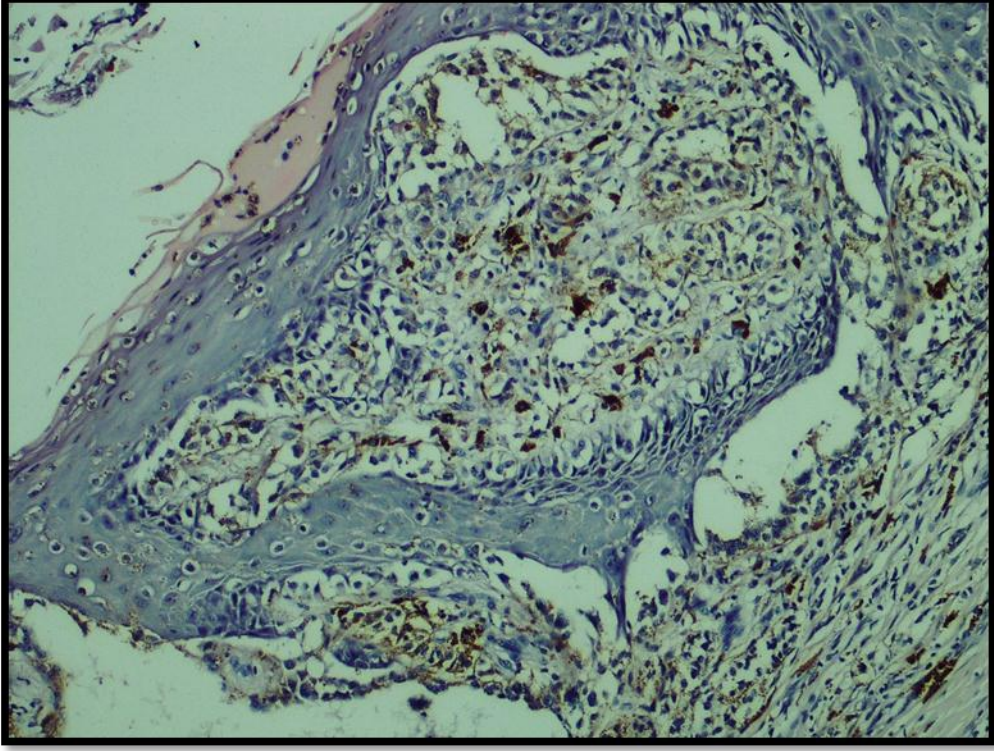


Şekil-4 : Yüzeysel yayılan malign melanoma (Pagetoid yayılım) (x100)

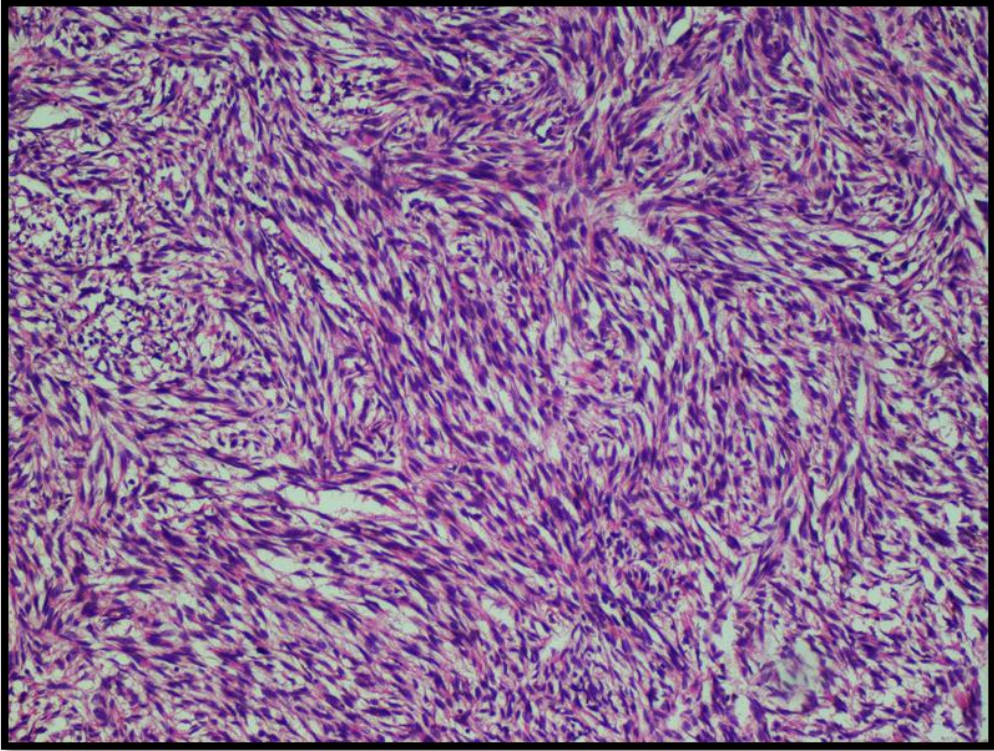


Şekil-5: Nodüler Melanom (x40)



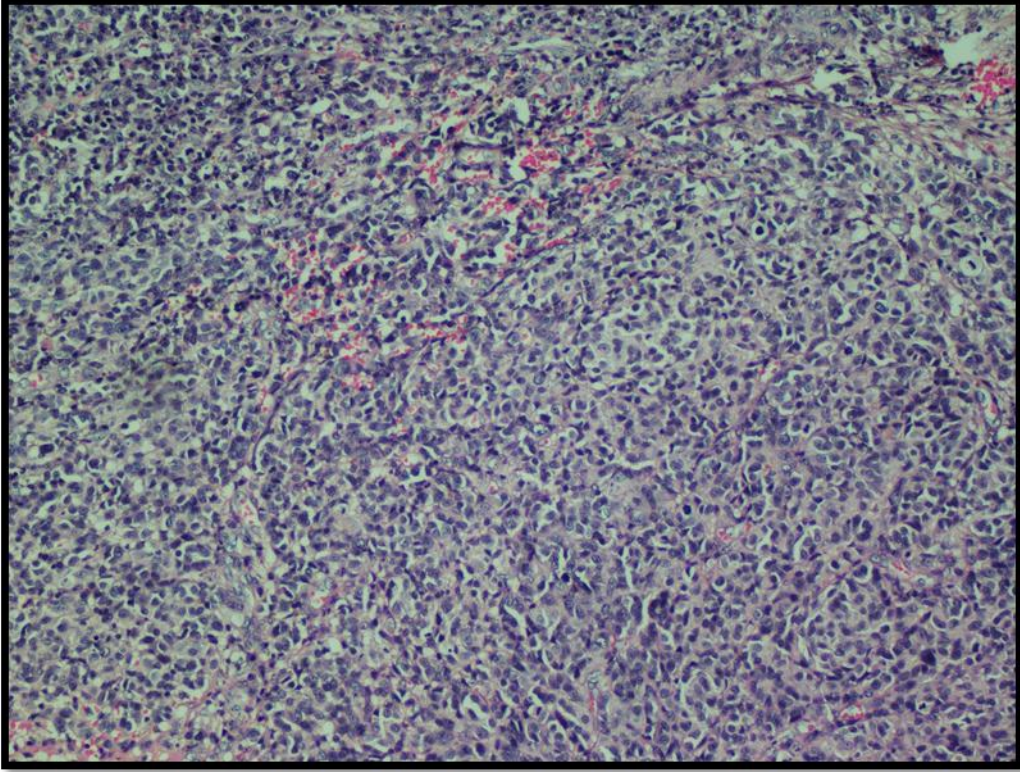


Şekil-6 : Akral Lentigenöz Melanom (x100)



Şekil-7 : Uveal Melanom (x100)





**Şekil-8 : Mukozal Melanom (x100)**

**Tablo-2: Melanomun temel histolojik kriterleri**

<b>Yapısal Özellikler</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Lezyon çapının 6 mm'den büyük olması (Konjenital nevus, Spitz nevus, Blue nevus, "Deep Penetrating" nevüs haricinde)</li> <li>➤ Siluet Asimetrisi</li> <li>➤ Lezyonun lateral kenarlarındaki yuvalanmaların asimetrik olması</li> <li>➤ İntraepidermal melanositik komponentin iyi sınırlanmış olması</li> <li>➤ Lezyonun lateral kenarlarında spinöz tabakada sıkışmış, tek tek dağılmış melanosit varlığı</li> <li>➤ Tümör tabanının net olmaması</li> <li>➤ Lezyonda pigment dağılımının asimetrik olması</li> <li>➤ Lenfositik infiltratın asimetrik dağılımı</li> <li>➤ Epidermiste pagetoid yayılım</li> <li>➤ Olgunlaşmamış melanositlerin dermise progresif ilerleyişi (Matürasyonda bozulma)</li> <li>➤ Epidermiste birbirinden eşit uzaklıkta olmayan melanosit yuvaları</li> <li>➤ Değişik büyüklükte melanosit yuvaları</li> <li>➤ Epidermisteki değişikliklerin (hiperplazi/atrofi) asimetrisi</li> <li>➤ Bazı melanosit yuvalarının birbiriyle birleşmesi (Konjenital nevüs, genital bölgelerdeki nevüsler haricinde)</li> <li>➤ Melanositlerin adneksiyal epitele doğru ilerlemesi</li> <li>➤ Güneş hasarının kutanöz bulgularının olması (Solar elastoz)</li> </ul>
<b>Sitomorfoloji</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pleomorfik nükleuslu, belirgin eozinofilik nükleollü atipik melanositler (epiteloid, iğsi, nevoid, dendritik hücreler)</li> <li>➤ Derin mitotik figürler</li> <li>➤ Multinükleer hücreler</li> <li>➤ Nekrotik melanositler</li> </ul>

**Tablo hazırlanırken (86) nolu kaynaktan yararlanılmıştır.**

**Tablo-3: Melanom Alt Tiplerinin Klinik ve Histolojik Özellikleri**

	<b>Yüzeysel Yayılan Melanom</b>	<b>Lentigo Maligna Melanom</b>	<b>Nodüler Melanom</b>	<b>Akral Lentigenöz Melanom</b>
<b>Görülme sıklığı</b>	%70	%5	%15-30	%5
<b>KLİNİK BULGULAR</b>				
<b>Renk</b>	Kahverengi, Siyah Gri	Kahverengi, Siyah Gri (beneklenme)	Koyu Kahverengi, Siyah, Mavimsi Siyah	Kahverengi, Siyah
<b>Kenar</b>	Keskin sınırlı Ada benzeri uzantılar	Düzensiz sınırlı	Plak veya nodül	Düzensiz keskin sınırlı
<b>Şekil</b>	Palpabl plak veya nodül	Düz nadiren papül	Düzgün yüzeyle nodül, ülsere polip yüzeyleden kabarık papül	Maküler lezyon
<b>Anatomik bölge</b>	Gövde, ekstremiteler	Yüz (burun ve yanaklar) ve boyun	Gövde, ekstremiteler	Avuç içi, ayak tabanı (topuk) ve tırnak altı
<b>Güneş maruziyeti</b>	Aralıklı	Kronik	Aralıklı	-
<b>HİSTOLOJİK BULGULAR</b>				
<b>İntraepidermal melanositik proliferasyon</b>	Belirgin nükleollü, pigmente sitoplazmalı pagetoid yayılım veya yuvalanma yapan epiteloid hücreler	Epidermal-dermal bileşkede melanosit yoğunluğunda artış, geniş hiperkromatik nükleus, multinükleer hücreler, kıl folliküllerine uzanım	Nodüler lezyondan 3 rete sonrasında in-situ komponent yok	Lentigenöz dağılım, sitoplazmik retraksiyon, nükleer pleomorfizm, hiperkromazi, retelerin ucunda geniş "junctional" yuvalanmalar
<b>Epidermis</b>	Hiperplazi	Atrofi	Atrofi/Hiperplazi	Hiperplazi
<b>Radyal büyüme</b>	Var	Var	Yok	Var
<b>İntradermal melanositik proliferasyon</b>	Değişik boyutta yuvalanmalar, ekspansil tümör nodülü, epidermisteki hücrelere benzer sitolojik özellikler	Yuvalanma veya infiltratif pattern Epiteloid veya iğsi hücreler	Küçük yuvalanmalar Ekspansil nodülü oluşturan tümör hücre agregatları	İğsi melanositler Yoğun bant tarsi lenfositik infiltrat ile birlikte melanofajlar

Tablo hazırlanırken (87) nolu kaynaktan yararlanılmıştır.

#### 2.2.4. Malign Melanom TNM sınıflandırması-Patolojik Evreleme

Malign melanomun TNM sınıflandırmasında Amerikan Kanser Evreleme Birleşik Komitesi'nin (AJCC) 2009 TNM sınıflandırması kullanılmaktadır.Tablo 4 'te malign melanomun patolojik ve klinik evrelemesi gösterilmiştir.

##### Primer Tümör(pT)

pTx: Primer tümör değerlendirilemiyor.

pT0: Primer tümör ile ilgili kanıt yok.

pTis: Melanom in situ

pT1:Melanomun kalınlığı 1 mm veya altında, ülserasyon yok/var

pT1a:Melanomun kalınlığı 1mm veya altında, ülserasyon yok, <1 mitoz/mm<sup>2</sup>

pT1b: Melanomun kalınlığı 1mm veya altında, ülserasyon var ve/veya ≥1mitoz/mm<sup>2</sup>

pT2:Melanomun kalınlığı 1.01-2 mm, ülserasyon yok/var

pT2a:Melanomun kalınlığı 1.01-2 mm, ülserasyon yok

pT2b: Melanomun kalınlığı 1.01-2 mm, ülserasyon var

pT3: Melanomun kalınlığı 2.01-4 mm, ülserasyon yok/var

pT3a: Melanomun kalınlığı 2.01-4 mm, ülserasyon yok

pT3b: Melanomun kalınlığı 2.01-4 mm, ülserasyon var

pT4: Melanomun kalınlığı >4 mm, ülserasyon yok/var

pT4a: Melanomun kalınlığı >4 mm, ülserasyon yok

pT4b: Melanomun kalınlığı >4 mm, ülserasyon var

##### Bölgesel Lenf Nodları(pN)

pNx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor

pN0:Bölgesel lenf nodu metastazı yok.

pN1:1 adet bölgesel lenf nodunda metastaz

pN1a:Mikrometastaz

pN1b:Makrometastaz

pN2:2-3 adet bölgesel lenf nodunda metastaz

pN2a:Mikrometastaz

pN2b:Makrometastaz

pN2c:Nodal metaz yok, satellit veya in-transit metastaz

pN3:>4 bölgesel lenf nodu metastazı

##### Uzak Metastaz(pM)

pM0:Uzak metastaz yok.

pM1:Uzak metastaz var

pM1:Deri, deri altı veya nodal metastaz

pM2:Akciğer metastazı

pM3:Diğer tüm viseral bölgelere metastaz, serum LDH düzeyi yüksek

**Tablo-4: Melanomda Evreleme**

Patolojik Evreleme		Kinik Evreleme	
Evre 0	TisN0M0	Evre 0	TisN0M0
Evre IA	T1aN0M0	Evre IA	T1aN0M0
Evre IB	T1bN0M0	Evre IB	T1bN0M0
	T2aN0M0		T2aN0M0
Evre IIA	T2bN0M0	Evre IIA	T2bN0M0
	T3aN0M0		T3aN0M0
Evre IIB	T3bN0M0	Evre IIB	T3bN0M0
	T4aN0M0		T4aN0M0
Evre IIC	T4bN0M0	Evre IIC	T4bN0M0
Evre IIIA	T1-4aN1aM0	Evre III	TN1-3M0
	T1-4aN2aM0	Evre IV	TNM1
Evre IIIB	T1-4bN1aM0		
	T1-4bN2aM0		
	T1-4aN1bM0		
	T1-4aN2bM0		
	T1-4aN2cM0		
Evre IIIC	T1-4bN1bM0		
	T1-4bN2bM0		
	T1-4bN2cM0		
Evre IV	TN3M0		
	TNM1		

**2.2.5. Prognoz:**

Prognoz üzerine etkili olan faktörleri şu şekilde özetlemek mümkündür.

**Breslow kalınlığı (Tümörün vertikal kalınlığı):**

Breslow kalınlığı prognoz üzerine etkili olan en önemli faktördür ve kalınlık artıça prognoz kötüleşir.(88)(Tablo 5)



**Tablo-5: Breslow Kalınlığına göre 5 Yıllık Sağ Kalım ve Eksizyon sınırları**

Breslow Kalınlığı	5 Yıllık Sağ Kalım	Eksizyon sınırları
İn situ	95-100%	5 mm
<1 mm	95-100%	1 cm
1-2 mm	80-86%	1-2 cm
2.1-4 mm	60-75%	2-3 cm
>4 mm	37-50%	3 cm

**Tablo hazırlanırken (88) nolu kaynaktan yararlanılmıştır.**

**Tablo 6: Breslow kalınlığı ölçümü**

Ölçüm granüler tabakanın üst sınırından lezyonun en derin kısmına kadar vertikal olarak ölçülür.

Ülserli yüzeylerde ölçüm ülser tabanından başlayarak yapılır.

Deri eklerinden kaynaklanmış ve ekleri takiben derinlere eklerin çevresine uzanmış melanoma yapısı varsa ölçümde esas alınmaz.

Regresyon mevcut ise rezidü melanoma göre ölçüm yapılmalıdır.

Mikrosatellit lezyonlar ve vasküler emboliler de ölçüme dâhil edilmemelidir.

Ölçüm, kalibrasyonu mikroskoba göre ayarlanmış oküler mikrometrelerle yapılmalıdır.

**Tablo hazırlanırken (89) nolu kaynaktan yararlanılmıştır.**

### Ülserasyon:

Ülserin varlığı kutanöz melanomda dominant prognostik faktördür ve evrelemede T1a'dan T1b'ye dönüşmesine neden olur. Ülserasyon; tam kat epidermal kayıp (stratum korneum ve bazale dahil), reaktif değişiklik bulguları (nötrofiller, fibrin birikimi), komşu epidermiste incelme veya reaktif hiperplazi ile birlikte mikroskopik olarak tanımlanmalıdır. Tümöre bağlı ülserasyonla travmatik ülserasyonun veya artefaktın ayrımı önemlidir.(90, 91)

Ülserasyon ile tümör kalınlığı arasında pozitif korelasyon mevcuttur. 1 mm'den büyük melanomlarda ülserasyon Breslow kalınlığından prognoz açısından daha önemlidir.(92)

Ülserin çapı veya tumor genişliğine göre yüzdesinin verilmesinin sadece ülserin olup olmadığını söylemekten prognoz üzerine daha etkili olabileceği düşünülmektedir. (93)

### Mitoz sayısı:

Mitotik oran Breslow kalınlığından sonra sağkalım için en güçlü ve bağımsız ikinci önemli prediktif faktördür. Mitoz sayısı ile sağ kalım arasında negatif korelasyon mevcuttur. Mitotik indeks mm<sup>2</sup> deki mitoz sayısı olarak raporlanmalıdır. x400 büyütmede sayılmalıdır. 1 mm<sup>2</sup> yaklaşık olarak 4 BBA'ya denk gelmektedir. Mitoz sayısı vertikal büyüme alanındaki en fazla

mitozun bulunduğu alanda ("hot spot") mitoz ile komşu alanlardaki mitozlarda eklenerek toplam alan  $1 \text{ mm}^2$ 'ye ulaşana kadar sayılarak elde edilir. Eğer bir noktada yoğunlaşma yok ve etrafa dağılmış bir şekilde mitoz varsa rasgele alanlar sayılır ve ortalaması alınır. Tümörün derinliğinin  $1 \text{ mm}$ 'den küçük olduğu melanomlarda  $1 \text{ mm}^2$ 'ye göre oranlama yapılabilir.  $<1/\text{mm}^2$  ile  $0/\text{mm}^2$  nin sağ kalım üzerinde farklı etkileri bulunduğu için mitoz yok ise  $0/\text{mm}^2$  olacak şekilde raporlanmalıdır.(94) (Tablo 7)

**Tablo-7: AJCC 2008 Ortak Veritabanı- Evre I/II Hastalarındaki Mitoz Sayısı/ $\text{mm}^2$  İle Sağ Kalım Oranları**

Mitoz Sayısı/ $\text{mm}^2$	N	Sağ Kalım Oranı $\pm$ Standart Hata	
		5 yıl	10 yıl
0	3031	0,978 $\pm$ 0,004	0,932 $\pm$ 0,008
0,01-0,09	281	0,945 $\pm$ 0,014	0,892 $\pm$ 0,021
1-1,99	2117	0,920 $\pm$ 0,007	0,842 $\pm$ 0,012
2-4,99	3254	0,869 $\pm$ 0,007	0,754 $\pm$ 0,012
5-10,99	2049	0,781 $\pm$ 0,011	0,680 $\pm$ 0,018
11-19,99	673	0,695 $\pm$ 0,022	0,576 $\pm$ 0,027
$\geq 20$	259	0,594 $\pm$ 0,039	0,476 $\pm$ 0,050
<b>Toplam</b>	11664		

Tablo hazırlanırken (94) nolu kaynaktan yararlanılmıştır.

#### **Lenfovasküler invazyon:**

Tümör hücrelerinin vasküler endoteli geçerek lümende yer almaları vasküler invazyon olarak tanımlanır. İnce fibröz septalarla yuvalar oluşturan melanom yapıları damarlarla karıştırılmamalıdır. Kötü prognostik kriterdir.(95)

#### **Pigment varlığı:**

Oküler melanomlarda pigmentasyon arttıkça prognoz kötüdür.(96)

#### **Mikroskopik satellit:**

Ana tümör kitlesinden retiküler kollajenle ayrılmış halde ya da subkutis yağ dokusunda ayrı bir yapı olarak görülür.Mikroskopik satellitli olgularda prognoz daha kötüdür.(97)

#### **Perinöral invazyon:**

Sıklıkla dezmoplastik melanomlarda görülmekle birlikte diğer melanom tiplerinde de görülebilir.(98) Lokal rekürrens artışı ile ilişkilidir.(99)

### 2.2.6. Tedavi:

Tedavi yöntemleri arasında cerrahi, immünoterapi, kemoterapi, radyoterapi bulunmaktadır. Bu tedavi yöntemlerinden hangisinin seçileceği melanomun evresine bağlıdır. Oküler melanomdaki tedavi seçenekleri arasında cerrahi, radyoterapi, lazer tedavisi ve kriyoterapi yer almaktadır.

### 2.3. Tümör Mikroçevresi ve Malign Melanom:

Malign melanomun önemli özelliklerinden birisi metastaz potansiyelinin oldukça yüksek olmasıdır. Metastaz oldukça kompleks bir süreçtir. İlk aşamada tümör hücresi hücre-hücre bağlantıları ile adhezyonunu kaybeder ve ekstrasellüler matriksi yıkmaya başlar. Endotel bazal membranına ulaşan tümör hücresi lenfovasküler invazyon ile bulunduğu ortamdan uzaklaşır. Dolaşımdaki serbest tümör hücreleri bir yandan immün sistemin tanınmasını engelleyecek sistemleri geliştirirken bir yandan da programlı hücre ölümünü engeller. Uzak organ kapillerinde hareketleri yavaşlayan tümör hücreleri endotel bazal membranını geçerek dokuya ekstrasvaze olur. Yeni mikroçevredeki strese karşı genetik ekspresyonlarını değiştirerek sağ kalmaya çalışır. Tümör hücresinin içerisinde bulunduğu mikroçevre büyümesinde ve metastaz yapmasında önemlidir. Paget'in "*seed and soil*" (toprak ve tohum) hipotezine göre, tümör hücrelerinin uzak organlarda kolonize olması hücre büyümesine uygun mikroçevrede gerçekleşebilir.(100)

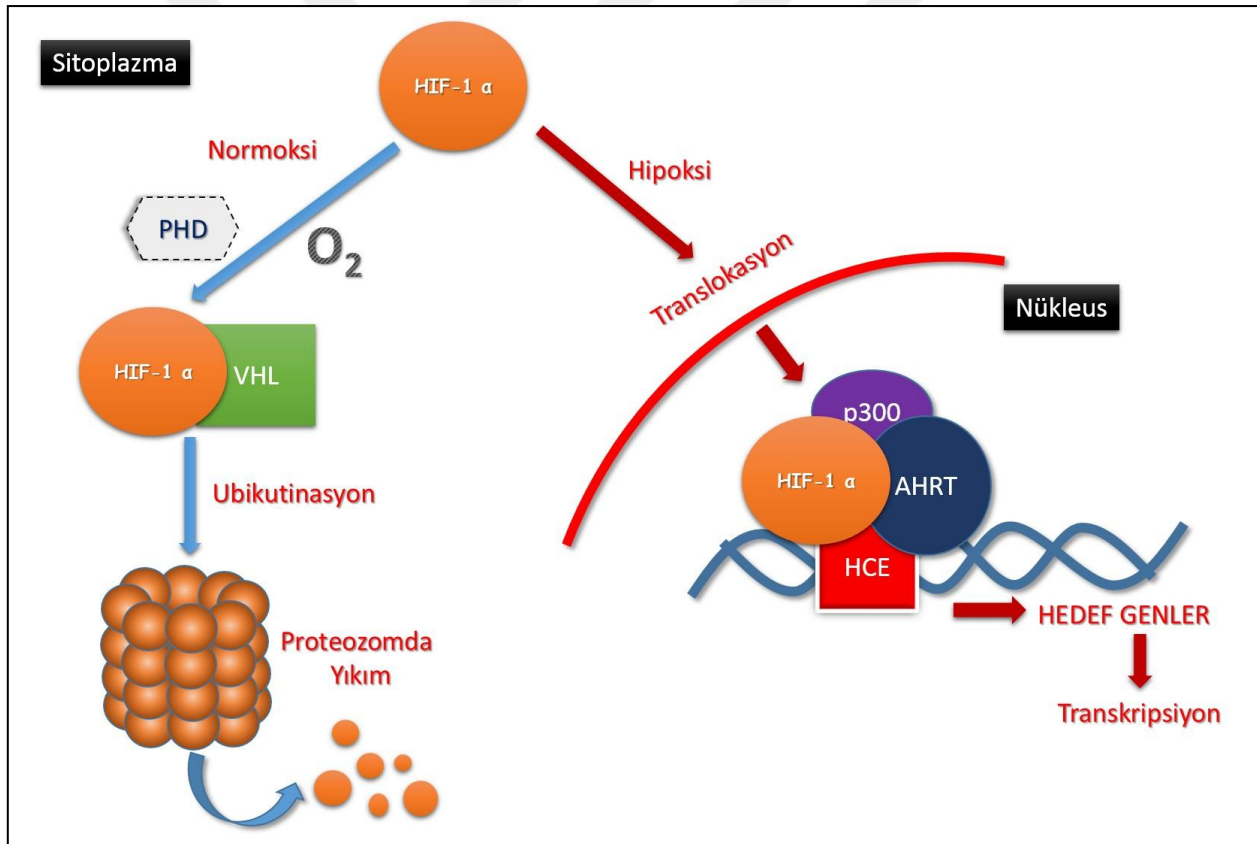
Haqq ve ark. nevüs, primer melanom ve metastazlarının gen ekspresyonlarını karşılaştırdıkları çalışmada gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulmuşlardır. Bu durum melanom hücrelerinin metastaz öncesinde ve sonrasında tümör mikroçevresine ve etkileyen faktörlere göre yeni özellikler kazandığını göstermektedir. (101)

Hipoksi de tümör gelişimi ve progresyonuna katkıda bulunan önemli mikroçevresel faktörlerden biridir. Tümör hipoksisi solid tümörlerin bilinen özelliğidir ve hızlı proliferasyon ile artmış metabolik gereksinim sonucu fizyolojik oksijen düzeyinin düşmesi sonucunda ortaya çıkar. Tümör hücresi meydana getirmiş olduğu bu hipoksik mikroçevreye adaptasyonu sağlamak ve bu negatif durumu kendi lehine çevirmek için aracı olarak önemli bir protein olan hipoksi indüklenebilir faktörü (*HIF-1*) kullanır.(102)

### 2.3.1. Hipoksi İndüklenebilir Faktörler:

*HIF-1*, alfa ve beta olmak üzere iki altünitten oluşur. *HIF-1 α*, normoksik koşullarda oksijen bağımlı ve bağımsız olarak iki türlü yıkılır. Oksijen bağımlı yıkım Prolil Hidroksilaz (PHD), *von-Hippel-Lindau/Elongin C/Elongin B E3* ubiquitin kompleksi ve proteazom ile gerçekleşir. Oksijen bağımsız yıkımda ise *RACK1* proteini yer alır. (103)

*HIF-1 α* hipoksik koşullarda ise stabilize edilir ve nükleusa translokasyonu sonucu nükleustaki *HIF-1 Beta (AHRT)* alt ünitesiyle birleşip *HIF-1* kompleksini oluşturarak, hedef gen promotör bölgeleri üzerinde yer alan hipoksi cevap elementi (HCE) adlı –CGTG– baz dizisine bağlanır. (104) (Şekil 9)



Şekil-9: *HIF-1* Kompleksi Oluşumu

Şekil hazırlanırken (105) nolu kaynaktan yararlanılmıştır.

*HIF-1* anjiogenezis, hücre proliferasyonu, glukoz metabolizması, pH regülasyonu ve migrasyonu içeren farklı biyolojik süreçleri düzenleyen hedef genlerin transkripsiyonunu aktive ederek tümör hücresinin hipoksiye adaptasyonunda önemli bir yere sahiptir.(106)

Hipoksinin tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz kapasitesini arttırdığı gösterilmiştir.(107)

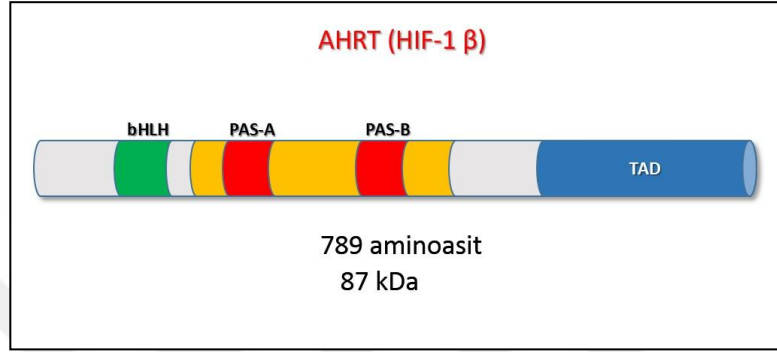
*HIF-1*; katepsin D, matriks metalloproteinaz 2, keratin 14-18-19, ürokinaz plazminojen aktivatör reseptör (uPAR), vimentin, *AMF*, *TGF- $\alpha$* , *c-MET* gibi invazyon ve metastaz patofizyolojisinde rol alan proteinlerin sentezinde görevli genleri düzenler (Tablo-8).(108, 109)

**Tablo-8: *HIF-1* tarafından transkripsiyonel olarak aktive edilen genler**

Anjiogenez	Vasküler Tonus	Motilite	Apoptosis	İlaç Direnci	pH Düzenlemesi
EG-VEGF	ADM ET1	AMF/GPI c-Met	NIP3 RTP801	MDR1	Karbonik Anhidraz 9
ENG	Hem	LRP1	NIX		
LEP	Oksijenaz-1 NOS2	TGF- $\alpha$			
LRP1					
TGF- $\beta$ 3					
VEGF					
Hücre Çoğalması	Hücre Sağkalımı	Nükleotid Metabolizması	Demir Metabolizması	Glukoz Metabolizması	Ekstrasellüler Matris Metabolizması
Siklin G2	ADM EPO	Adenilat Kinaz 3	Serüloplazmin Transferrin	HK1,2 AMF/GPI	CATHD Kollajen Tip V ( $\alpha$ 1)
IGF2	IGF2	Ekto-5'- Nükleotidaz	Transferrin Reseptör	ENO1 GLUT1	FN1 MMP2
IGF-BP1,2,3	IGF-BP1,2,3 NOS2			GAPDH LDHA	PAI1 Prolil-4-hidroksilaz $\alpha$ (I)
WAF1	TGF- $\alpha$ VEGF			PGK1 PFKFB3	uPAR
TGF- $\alpha$				TPI PFKL PKM	
Hücre adezyonu	Aminoasit Metabolizması	Sitoskelatal yapı	Eritropoezis	Epitelyal Homeostazis	Transkripsiyonel Regülasyon
MIC2	Transglutaminaz 2	KRT 14 KRT 18 KRT 19 VIM	EPO	İntestinal Trefoil Faktör	DEC1 DEC2 ETS-1 NUR77

Tablo hazırlanırken (110) kaynaktan yararlanılmıştır.

**HIF-1 Beta**, 789 aminoasitten oluşan 87 kDa ağırlığında bir proteindir. N-ucu basic-helix-loop-helix (bHLH) ve PER-ARNT-SIM (PAS) bölgelerini içermektedir. Basic bölgesi DNA bağlanması için gereklidir. HLH-PAS bölgesine ise HIF-1 alfa ve betanın dimerizasyonu için ihtiyaç duyulur. C-ucunda transaktivasyon bölgesi (TAD) içermektedir. (Şekil 10)

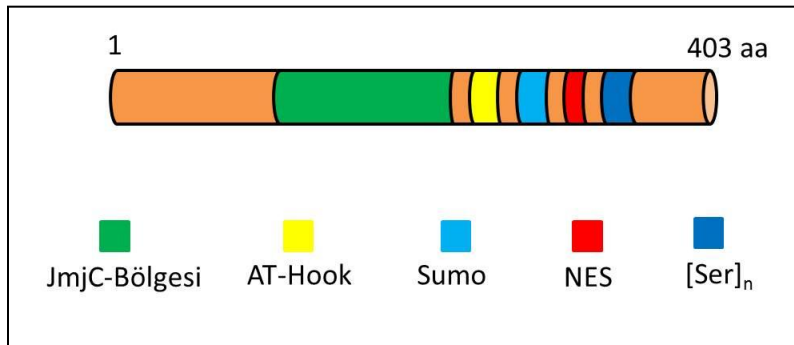


**Şekil-10: HIF-1 Beta Proteininin Yapısı**

Şekil hazırlanırken (111) kaynaktan yararlanılmıştır.

### 2.3.2. JMJD6 (Jumonji domain-containing protein 6):

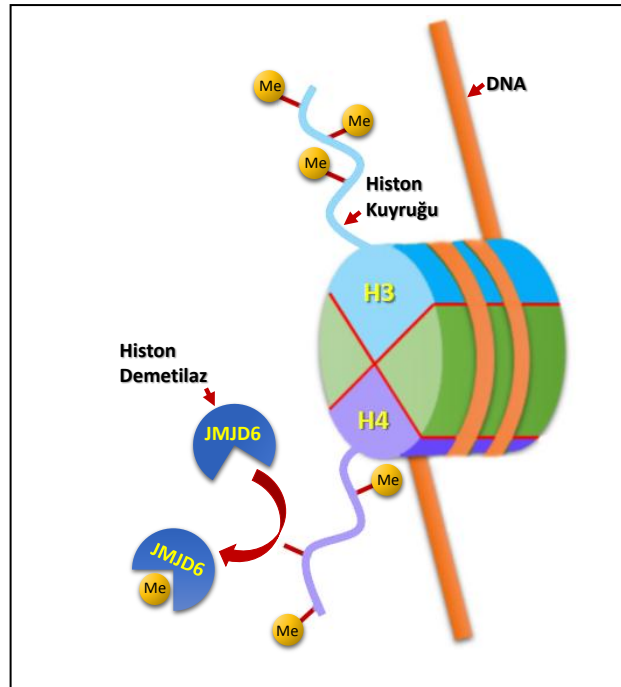
**JMJD6**, posttranslasyonel hidroksilasyon (*U2AF65-LUC7L2*) ile histon 3 (*H3R2*)-histon 4 (*H4R3*) demetilasyonunda (histon arjinin demetilaz) görevli olduğu düşünülen ve embriyogenezde birçok hücrenin ve dokunun farklılaşmasında gerekli olan 47 kDa ağırlığında 403 aminoasitten oluşan bir proteindir. *JmjC* bölgesi içeren histon demetilazlar lizin rezidülerindeki metil grupları uzaklaştırırken sadece *JMJD6* arjinin rezidüleri üzerindeki metil gruplarını uzaklaştırır.(112)



**Şekil-11: JMJD6 proteininin yapısı**

Şekil hazırlanırken (113) nolu kaynaktan yararlanılmıştır.

Histon proteinlerinin bazik amino-terminal kuyrukları asetilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon ve metilasyon gibi kromatin düzenleyici enzimler ile birçok kovalent modifikasyonlara uğrarlar. Histonlar üzerinde yapılan bu değişiklikler kromatin yapısının gevşek ya da sıkı olma durumunu etkileyerek gen ifadesinde düzenleyici rol oynar. Histon metil transferazlar tarafından gerçekleştirilen metilasyon işlemi genlerin transkripsiyonunu baskılayıcı (H3K9, H3K27) ve arttırıcı (H3K4) etki de olabilir. Kutanöz malign melanomda H3K27 HMT EZH2 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. EZH2' nin upregüle olmasının malign melanom hücrelerinde p16<sup>INK4A</sup> ekspresyonunu baskılayarak hücre yaşlanmasının azalmasına ve E-Cadherinin baskılanması ile çevre dokuya invazyon özelliklerini kazandırdığı düşünülmektedir.(114, 115) İleri evre kutanöz melanomda KDM5B histon demetilazın ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir.A375 kutanöz melanom hücre hattında ektopik KDM5B ekspresyonunun hücre siklusunu bloke ettiği ve DNA replikasyonun ve proliferasyonun azaldığı gösterilmiştir.(116) JMJD6 Histon 3 (H3R2) ve 4 (H4R3)'ün amino-terminal kuruklarındaki metil gruplarını uzaklaştırır. (Şekil-12)



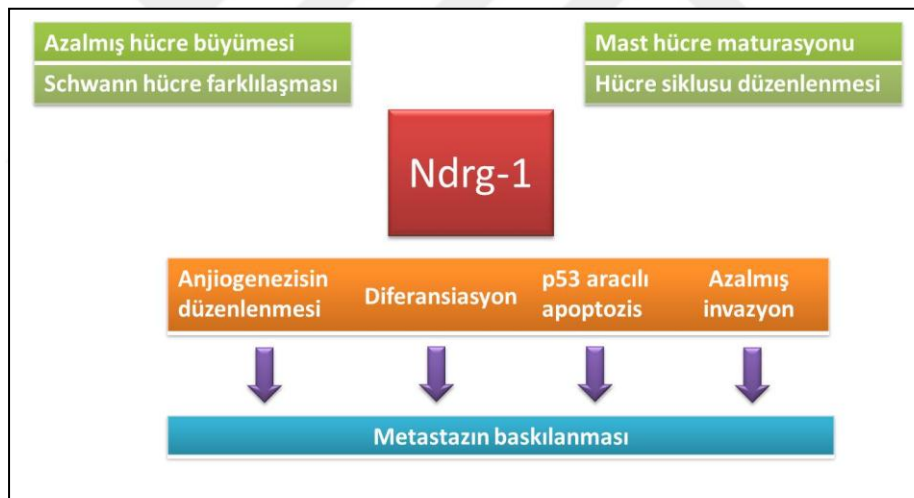
**Şekil-12: Histon kuyruklarındaki metil gruplarının JMJD6 tarafından kaldırılması**

Şekil hazırlanırken (117) kaynaktan yararlanılmıştır.

### 2.3.3. NDRG-1 (N-myc downstream-regulated gene 1):

**NDRG-1 (Cap43/Drg1)**, ilk olarak Charcot-Marie-Tooth Tip 4D hastalığında tanımlanan tümör progresyonu ve hücrel diferansiyasyon ile ilişkisi olduğu düşünülen 43 kDa ağırlığında 394 aminoasitten oluşan bir proteindir.(118, 119)

**NDRG-1** başlıca embriyogenezde, hücrel diferansiyasyon, lipid sentezi, miyelinizasyon, hücrel stres cevabı, mast hücre maturasyonu, metastazın baskılanmasında görevlidir. (120) (Şekil-6) Literatürde çoğu çalışma *Ndr-1*'in tümör baskılayıcı özelliğinden bahsetmekte ancak tümörojenik özelliğinin gösterildiği çalışmalar da mevcuttur. Androjen reseptör pozitif prostat kanserlerinde *Ndr-1* düzeylerinin normal dokuya göre yüksek olduğu gösterilmiştir. İleri evre kolon kanserlerinde de seviyesinin yükseldiği bulunması *Ndr-1*'in metastazı artıran gen olduğunu düşündürmüştür. *Ndr-1*'in bu yüksekliği hipoksinin *Ndr-1*'i upregüle etmesi nedeniyle tümör mikroçevresindeki hipoksi ile ilişkilendirilmiştir.(121)



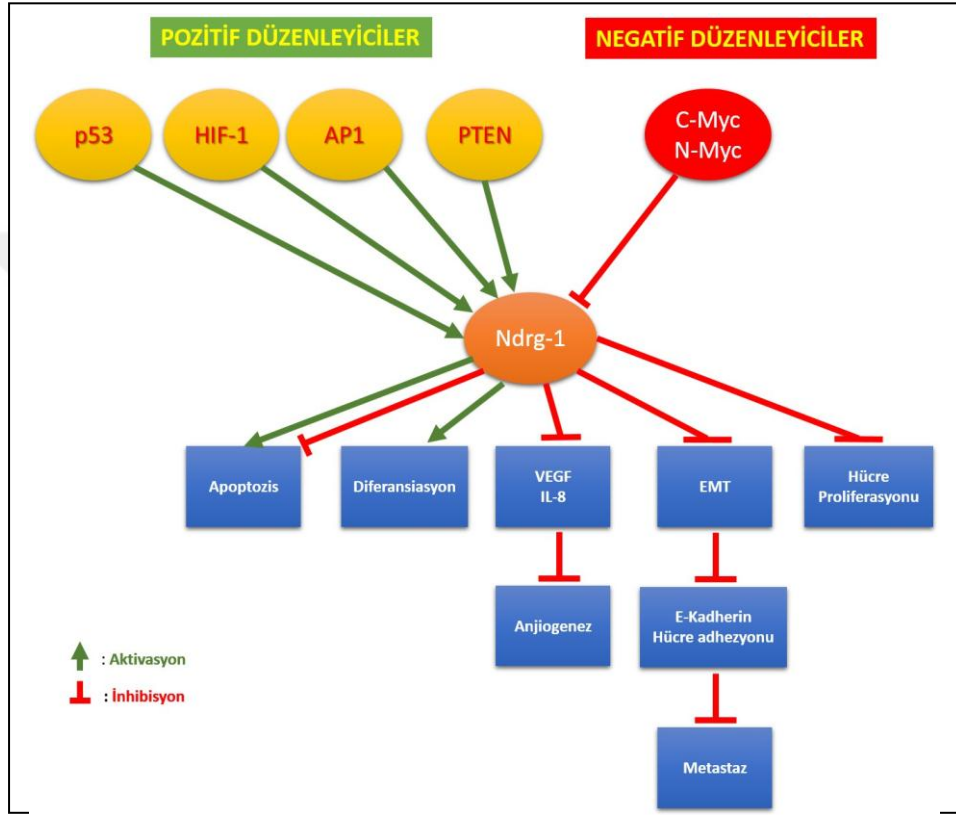
**Şekil-13: *Ndr-1*'in biyolojik etkileri**

Şekil hazırlanırken (119) nolu kaynaktan yararlanılmıştır.

Kısa süreli hipoksinin *HIF-1<sup>+/+</sup>* hücrelerde *Ndr-1* ekspresyonunu artırdığı gözlenirken, *HIF-1<sup>-/-</sup>* hücrelerde *Ndr-1* ekspresyon artışı gözlenmemiştir.(122) *PTEN* ve *p53*'ün *Ndr-1* aracılığıyla onkogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. *PTEN* ve *Ndr-1*'in meme prostat kanserlerinde benzer immünohistokimyasal boyanma gösterdiği görülmüştür. Pankreas kanseri hücrelerinde *Ndr-1*'in *PTEN* ekspresyonunu arttırdığı görülmüştür. Ancak endometrial kanserde *PTEN* kaybı/inaktivasyonu ile *Ndr-1*'in upregülasyonu gösterilmiştir. Bu durum *Ndr-1*'in hücre



veya doku spesifik özellik gösterdiğini düşündürmektedir. *NdrG-1*'in pozitif düzenleyicileri arasında *HIF-1*, *p53*, *AP-1*, *PTEN* yer almaktadır. *Myc* onkoproteinlerinin *NdrG-1* ekspresyonlarını baskıladığı gösterilmiştir. (123)(Şekil-14)



**Şekil-14: Kanserde *NdrG-1*'in fonksiyonu ve düzenlenmesi**

Şekil hazırlanırken (123) nolu kaynaktan yararlanılmıştır.

Günümüzde hipoksi merkezli hedefe yönelik tedavilerde *HIF-1 alfa*'yı transkripsiyonel aktivite/DNA'ya bağlanma (YC-1, PX-12, Pleurotin), translasyon (Silibinin, CCI-779), yıkım (Apigenin, FK228) aşamalarında bloke eden kimyasal inhibitörler geliştirilmiştir.(124) Ancak HIF-1 kompleksi oluşumunda ikinci alt birim olan HIF-1 Beta üzerine çok az çalışma mevcuttur. Bunun yanında hipoksi ile ilişkili karsinogenezin önemli basamaklarından epigenetik modifikasyonda yer alan histon demetilazlar ile tümör baskılayıcı özelliği olduğu düşünülen *NDRG-1* de antikanser ilaçların geliştirilmesinde ilgi odağı olmuştur.(125) Hipoksinin malign melanomun basamaklı karsinogenez sürecinde yer alan önemli mikroçevresel faktörlerden biri olması nedeniyle bu

Çalışmamızda primer ve metastatik malign melanom hücre hatlarında hipoksinin gen ekspresyonu üzerine olan etkisini araştırmayı amaçladık.



## GEREÇ ve YÖNTEM

### 3.1.Olgu Seçimi:

#### Arşiv olguları:

Yeterli klinik bilgiye sahip 13 adet primer ve 3 adet metastatik olmak üzere toplam 16 adet malign melanom, 10 adet intradermal nevüs olgusu çalışma kapsamına alındı. Arşiv olguları hakkındaki bilgi ek 1'dedir. Olgulara ait H&E boyalı prepratlar tekrar değerlendirilerek immünohistokimyasal inceleme için tümörü temsil eden uygun bloklar seçildi. Tümörlü vakaların tümünde tümör komşuluğunda immünohistokimyasal değerlendirmeye imkan verecek nitelikte normal alan bulunmaktaydı.

Malign melanom olgularınının 8'i kadın (%50), 8'i erkek (%50) hastadan oluşmakta idi.Yaş aralığı 41 ile 88 arasında değişiyordu.Ortalama yaş 61,375 olarak saptandı.Intradermal nevus olgularınının 9'u kadın (%90), 1'i erkek (%10) hastadan oluşmakta idi.Yaş aralığı 19 ile 51 arasında değişmekteydi.Ortalama yaş 34,3 olarak saptandı.

#### Doku array:





Doku array (US Biomax, ABD) 128'i primer melanom, 64'ü metastatik melanom, 16'sı normal doku olmak üzere toplam 208 "tissue core"dan oluşmaktadır. Doku array hakkındaki bilgi ek 2'tedir.

### 3.2. Hücre Kültürü:

Primer (WM-115) ve metastatik (WM-266-4) insan melanom hücre hatları ATCC (American Type Culture Collection) tarafından sağlandı. Primer hücre hatları 34 °C'de ve metastatik melanom hücre hatları 37 °C'de EMEM kültür ortamında (LonzaVerviers, Belçika) %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin (v/v) eklenerek %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde büyütüldü. Hücrelerin gelişme ve çoğalması ile kontaminasyonun olup olmadığı invert mikroskop ile kontrol edildi. İki günde bir hücrelerin ortamı yenilendi ve %75-90 konfluense ulaşıldığında hücreler PBS w/o Ca (LonzaVerviers, Belçika) ile yıkandı ve %0,25 Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, Almanya) ile kaldırılarak 1:3 oranında yeni kültür kaplarına pasajlandı. Hücre canlılık oranı %0,4 tripan mavisi

kullanılarak Countess-Otomatik Hücre Sayım Cihazında (Invitrogen, Ca, ABD) değerlendirildi.(Tablo-9)

Hücre bloğu hazırlanmasında hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra santrifüjlenerek %10 nötral bufferlı formaline alındı. Bir günlük fiksasyondan sonra hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek hücre pelleti metal çubuk yardımıyla dağılmayacak şekilde hafifçe alınarak filtre kağıdına sarıldı ve rutin takibe alındıktan sonra parafine gömüldü.

<b>Tablo-9: Primer ve Metastatik Melanom Hücre Hatlarının İvert Mikroskop Görüntüleri</b>			
<b>Primer Melanom Hücre Hattı</b>		<b>x100</b>	
<b>Metastatik Melanom Hücre Hattı</b>		<b>x100</b>	

### 3.3. RNA eldesi ve cDNA sentezi:

Primer ve metastatik melanom hücre hatlarından total RNA eldesi için RNeasy Mini Kit (Qiagen, ABD) kullanıldı. RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen, ABD) ile 2 µg RNA kullanılarak hipoksi ile ilişkili 84 genin real-time PCR analizinde kullanılmak üzere cDNA sentezlendi.

### 3.4. Real Time-PCR:

RT<sup>2</sup> profiler PCR array (PAHS-032Z-Human Hypoxia Signalling Pathway PCR Array, Qiagen) ile RT<sup>2</sup> Real Time SYBR Green PCR Master Mix kullanılarak real-time PCR işlemleri ATQ firmasının Ankara'daki Biyoteknoloji Laboratuvarlarında gözetimli olarak gerçekleştirildi.

### 3.5. Gen Ekspresyon Analizi:

Hipoksi ilişkili 84 genin ekspresyonları incelendi. **(Ek3)**. Data analizi SABiosciences'a ait online PCR Array Data analizi yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Programa ait basamaklar **Ek 4'**de ayrıntılı özetlenmiştir. Tüm örnekler 5 "housekeeping" genin (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPLP0*) düzeylerine göre normalize edildi. 0,05 p değeri için istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve Rotor Gene cihazında çalışıldığı için firma önerisiyle cut-off Ct değeri 33 olarak seçildi.

### 3.6. İmmünohistokimya:

Doku arrayler, arşiv olgularına ve hücre pelletlerine ait kesitlerden yapılan immünohistokimyasal çalışma Bond Max (Leica Microsystems Inc., Almanya, Wetzlar) cihazında gerçekleştirildi. Preparatlar Bond Dewax solusyonunda (AR9222) deparafinize edildikten sonra Bond Yıkama solusyonunda (AR9590) hidrate edildi. *HIF-1 β* antikoruna (Abcam,1:200) ve *JMJD6* antikoruna (Abcam,1:50) için antikor retrieval aşaması ph 6 'da Bond-Epitope Retrieval Solusyonu 1 'de (AR9961) ve *NDRG-1* antikoruna (Santa Cruz Biotech, ABD , Santa Cruz, 1:300) için retrieval işlemi ph 6 'da Bond-Epitope Retrieval Solution 2 'de 100 °C 'de gerçekleştirildi. Boyanma işlemi Bond Polymer Refine Red Detection kit (DS9390) ile yapıldı. Boyalı preparatlar dehidrate edildikten sonra su bazlı medium ile kapatıldı. (DAKO; s3023).

#### 3.6.1. İmmünohistokimyasal Skrolama:

İmmünohistokimyasal olarak *ARNT*, *JMJD6* ve *NDRG-1* ile boyanan doku arrayler ve hastalara ait dokuların histolojik preparatları Nikon Eclipse Ni mikroskobu ile x100 büyütmedeki

dijital görüntüleri çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı. Dijital görüntülerin skorlanması H-skor kullanılarak değerlendirildi.(126) H-skorun hesaplanması için aşağıdaki denklemi kullanan MS Excel makro dosyası oluşturuldu.

$$H\text{-skor}=\sum(P_i \times i)$$

$P_i$  boyanan hücrelerin yüzdesi gösteren katsayı ve  $i$  ise boyanmanın yoğunluğu ( 3+ (güçlü), 2+ (orta), 1+ (zayıf), and 0 (boyanma yok) ) ifade etmektedir. H-Skor kullanılarak tüm preparatlarda nükleer ve sitoplazmik boyanma ayrı ayrı değerlendirildi.

### 3.7. Hipoksi Deneyi:

Hipoksik ortam BD GasPak EZ Gas Üreten Kap Sistemleri (Becton Dickinson and Co., Cockeysville, Md.) ve GasPak EZ Kap Sistemi Torbacığı ile sağlanmıştır. İnorganik karbonat, aktif karbon, askorbik asit ve su içeren reaktif torbacığı (GasPak EZ Anaerob Kap Sistemi Torbacıkları) 2,5 saat içerisinde %1'den daha düşük oksijen içeren anaerobik bir ortam oluşturmaktadır. Ortamdaki oksijen düzeyinin düşmesi beyazdan mavi renge dönüşen GasPak EZ w/İndikator ile kontrol edilmiştir. Hipoksik ortamda primer insan melanom hatları %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 1, 4 ve 8 saat süreyle bekletildikten sonra hücreler immünohistokimyasal boyama için toplanarak hücre bloğuna hazır hale getirildi.

### 3.8. İstatiksel Yöntem:

İstatiksel analiz "PASW Statistics 17" istatistik programı kullanılarak yapıldı. Dağılımlar normal dağılım göstermediğinden ve gruplar 30'un altında öge içerdiğinden non-parametrik testler kullanıldı.Grupların arasında fark olup olmadığı Kruskal-Wallis testi ile bakıldıktan sonra farklı olan gruplar arasında fark Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. 4'lü grubun (Primer melanom, mukozal melanom, okuler melanom, diğer melanomlar) karşılaştırılmasında  $p < 0,008$  olarak istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Gruplar arasındaki ögeler arasındaki ilişki (korelasyon) Spearman korelasyon testi ile araştırıldı. 4'lü grubun dışındaki tüm testlerde  $p \leq 0,05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

**Finansal Destek ve Etik Kurul Kararı:**

Proje (12/59) Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Destek fonu tarafından desteklenmiştir. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu onayı çalışma başlamadan önce alındı. (26.04.2012-Karar No: 12/175)



## BULGULAR

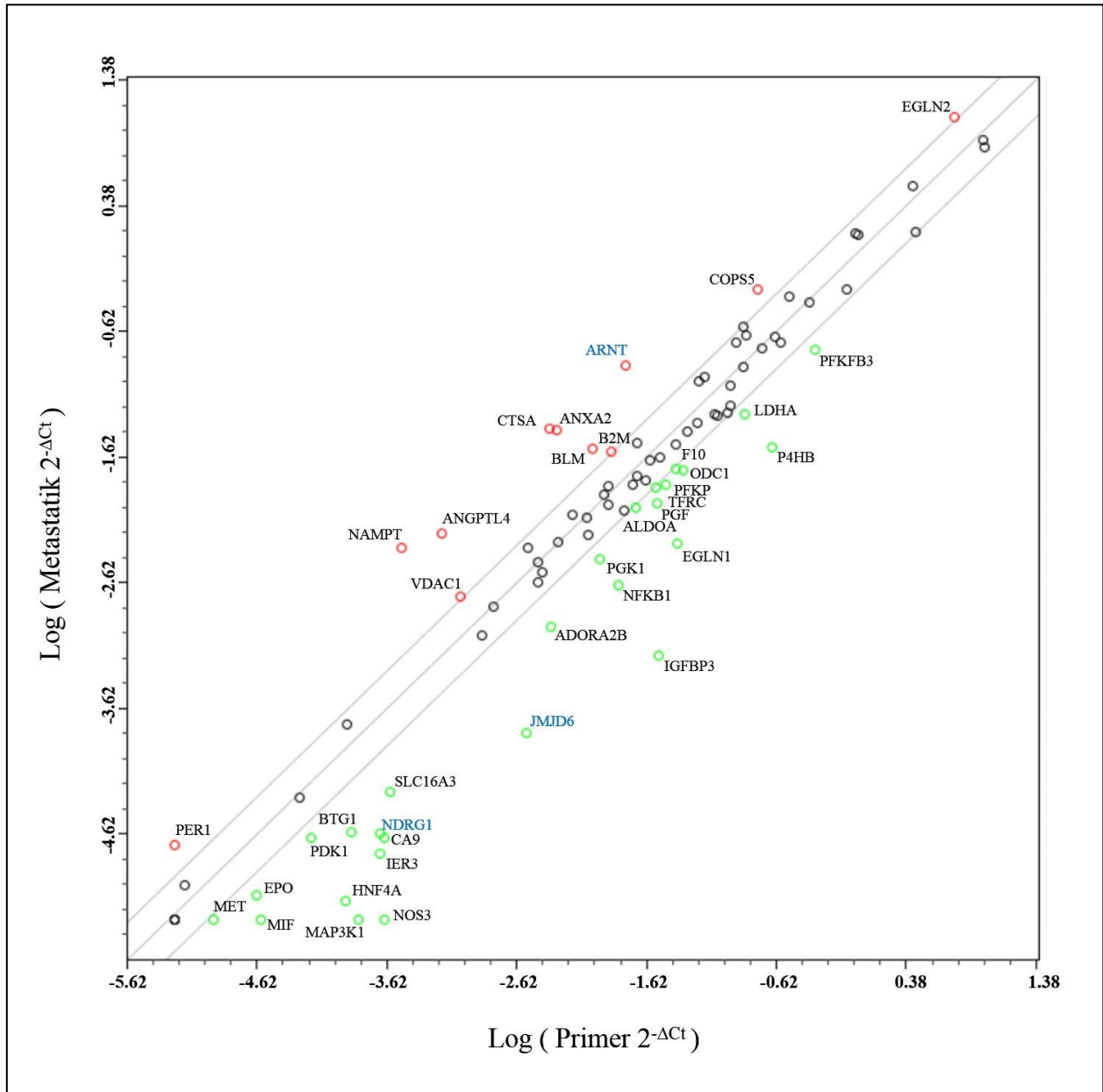
### 4.1. Real Time PCR Bulguları:

#### 4.1.1. Primer ve Metastatik Melanom Hücre Hatlarının Karşılaştırılması:

Bu çalışma kapsamında hipoksi ile ilişkili genlerin primer ve metastatik hücre hatlarına farklılıklarının ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla yapılan iki hat karşılaştırıldığında toplam 37 genin 2 kat (fold) ve üstü farklılık gösterdiği görülmüştür. Bunlardan 10 genin metastatik hatta ifadelerinin arttığı (upregule), 27 genin ise ifadelerinin azaldığı (downregule) dikkati çekmiştir. Şekil-15'de metastatik melanom hücre hatlarında hipoksi ile ilişkili genler saçılım grafiğinde gösterilmektedir.

Real time PCR bulguları literatür eşliğinde değerlendirilerek Real-Time PCR çalışmalarında farklılık saptadığımız genler arasından üç genin seçilmesi; bu genler tarafından kodlanan proteinlerin nevüste, primer ve metastatik melanomlarda düzeyinin ve dağılımının saptanması amaçlanmıştır. *HIF-1*'in karsinogenezde önemli genlerin upregülasyonundan sorumlu olması ve literatürdeki çalışmaların genellikle *HIF-1* kompleksinde yer alan iki alt birimden *HIF-1 alfa* üzerinde yoğunlaşması nedeniyle biz bu çalışmada hakkında daha az çalışma bulunan ikinci alt birim ***HIF-1 Beta*** seçtiğimiz ilk genidir. Literatürde özellikleri bakımından yeni keşfedilmekle birlikte zebra balığı kanser modellerinde araştırılan ve hipoksi ile ilişkisi bakımından incelenmesi nedeniyle karsinogenezde önemli bir basamak olan epigenetik modifikasyonda yer alan ***JMJD6*** çalışmamızda incelediğimiz ikinci gen olmuştur. Çalışmamızın odaklandığı üçüncü gen ise metastazın baskılanması, angiogenezin düzenlenmesi, invazyonun azalmasında fonksiyonu olan ve hipoksi ile ilişkisi üzerine tartışmalı sonuçlar bulunduran ***NDRG-1***'dir.





Şekil-15: Metastatik Melanom Hücre Hatlarında Hipoksi İle İlişkili Genlerin Saçılım Grafiği

## 4.2. Hipoksi çalışmaları:

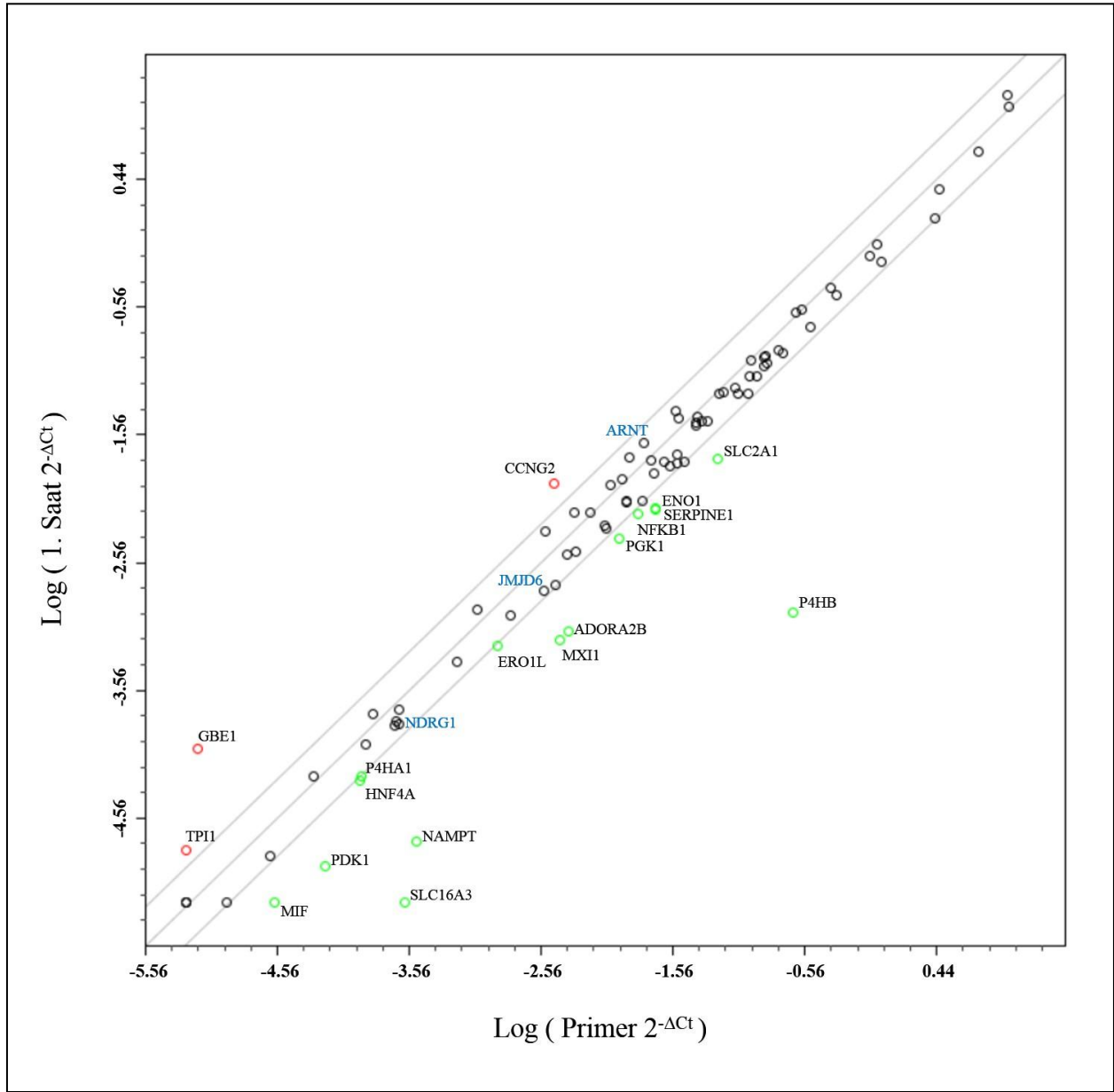
Hipoksi çalışmalarında primer hücre hattı hipoksi koşullarında 1, 4 ve 8 saatlerde toplanarak hipoksiyle ilişkili genlerde ortaya çıkacak ifade farklılıklar araştırılmıştır.

Şekil-16'de 1 saatlik hipoksi sonrası hipoksi ile ilişkili genler saçılım grafiğinde gösterilmektedir. 1 saatlik hipoksi sonucunda normal hata göre "fold regulation" değeri 2'nin üzerinde toplam 3 genin up-regüle, 15 genin down-regüle olduğu bulunmuştur.

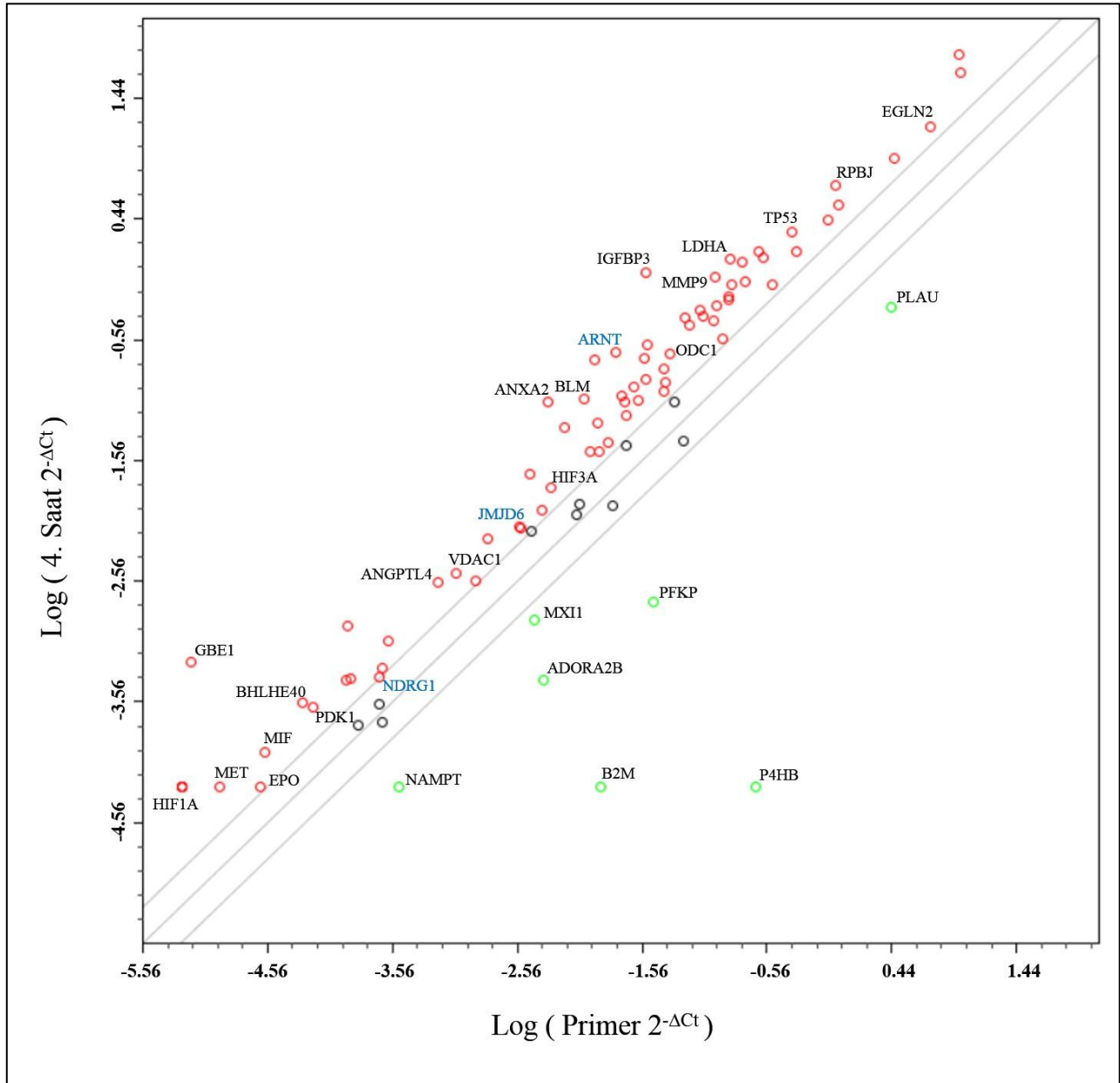
Şekil-17'te 4 saatlik hipoksi sonrası hipoksi ile ilişkili genler saçılım grafiğinde gösterilmektedir. 4 saatlik hipoksi sonucunda "fold regulation" değeri normal hatta göre 2'nin üzerinde toplam 68 genin up-regüle, 6 genin down-regüle olduğu bulunmuştur.

Şekil-18'te 8 saatlik hipoksi sonrası hipoksi ile ilişkili genler saçılım grafiğinde gösterilmektedir. 8 saatlik hipoksi sonucunda normal hatta göre "fold regulation" değeri 2'nin üzerinde toplam 14 genin up-regüle, 17 genin down-regüle olduğu bulunmuştur.

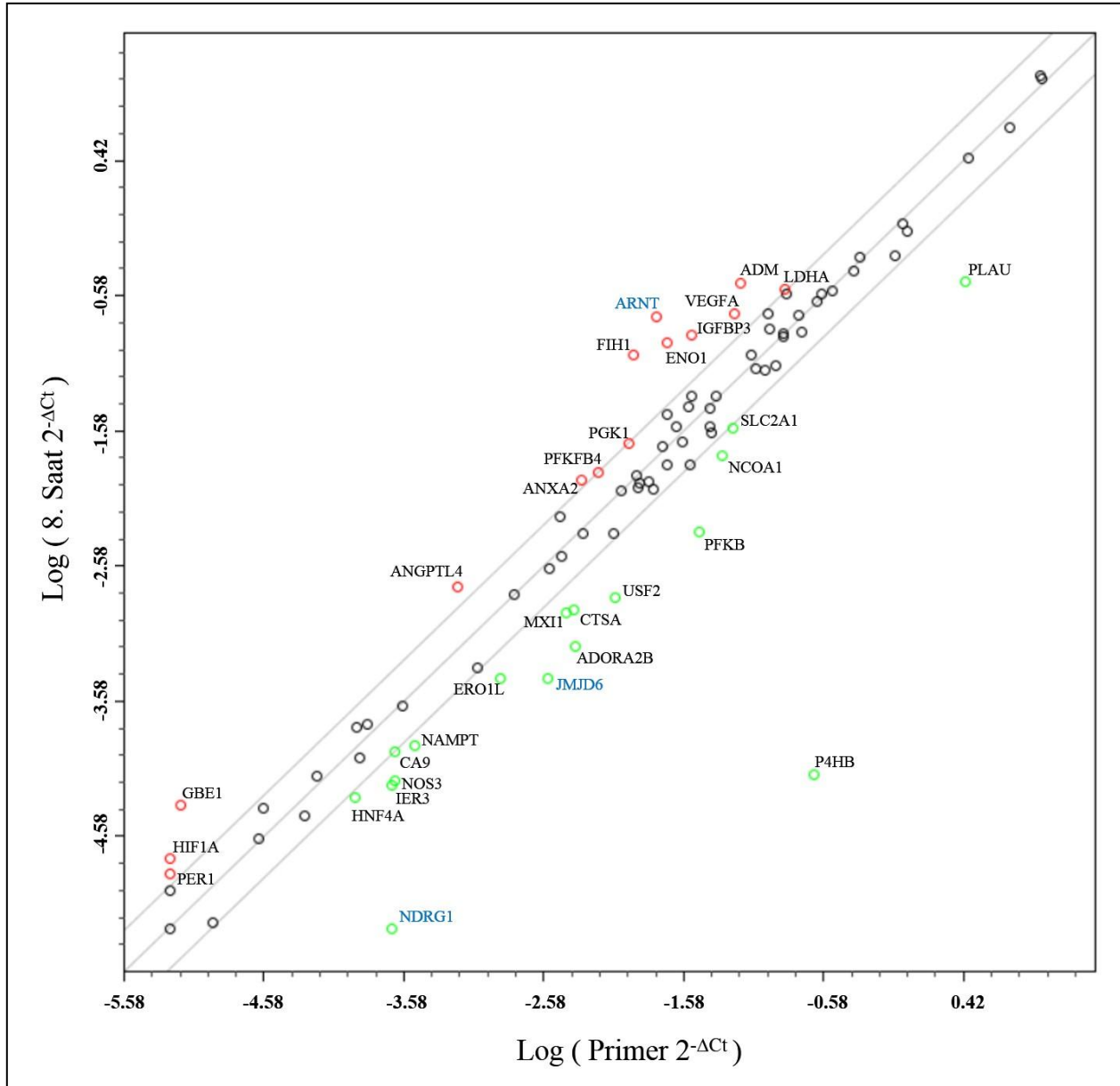
Hipoksi deneyimizde genlerin büyük bir kısmının 4 saatlik hipoksi sonrasında up-regüle olduğu görülmüştür. *HIF-1 Beta*, *JMJD6* ve *NDRG-1* 4 saatlik hipoksi sonrası up-regüle olurken, 8 saatlik hipoksizde *JMJD6* ve *NDRG-1*'in down-regüle olduğu görülmüştür.



**Şekil-16: 1 Saatlik Hipoksi Sonrası Hipoksi İle İlişkili Genlerin Saçılım Grafiği**



Şekil-17: 4 Saatlik Hipoksi Sonrası Hipoksi İle İlişkili Genlerin Saçılım Grafiği



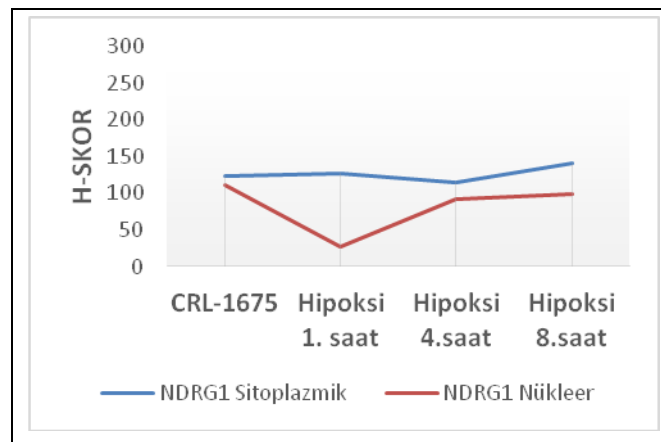
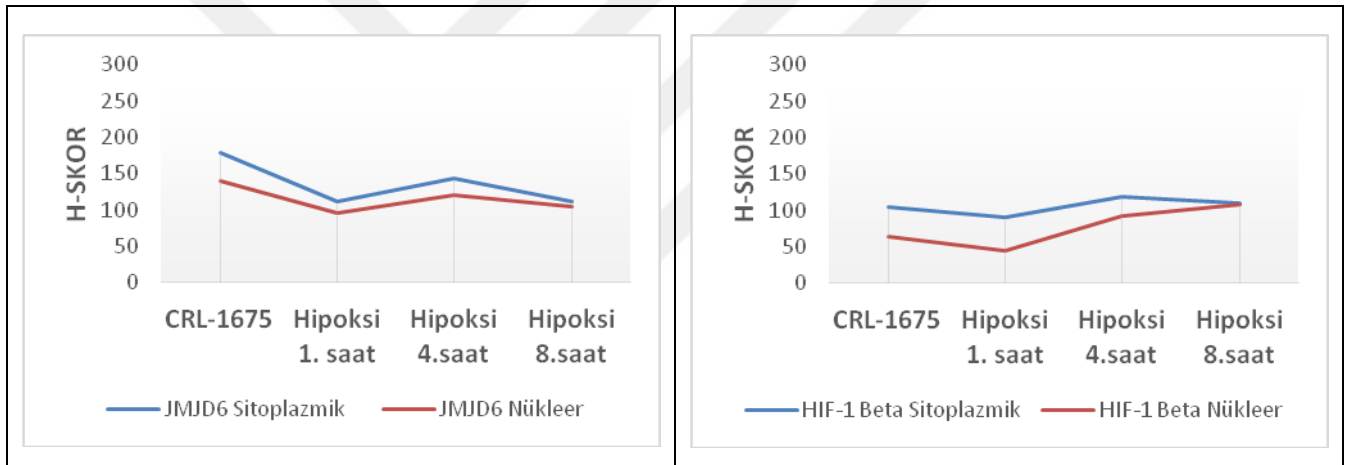
Şekil-18: 8 Saatlik Hipoksi Sonrası Hipoksi İle İlişkili Genlerin Saçılım Grafiği

### 4.3.İmmünohistokimya Bulguları:

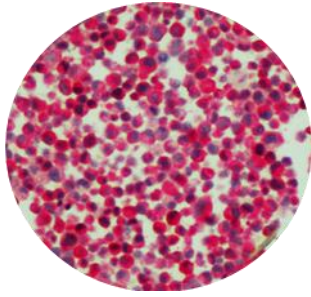
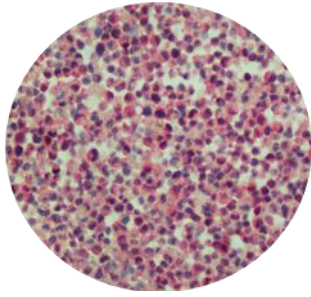
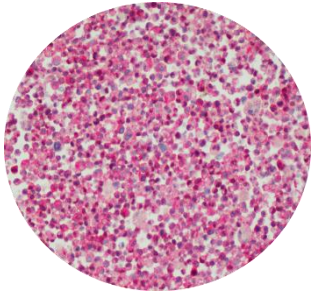
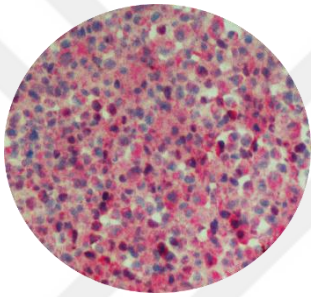
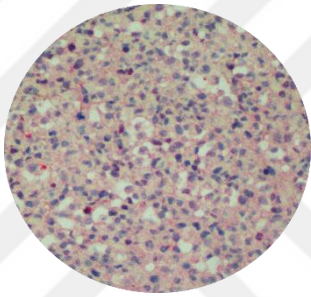
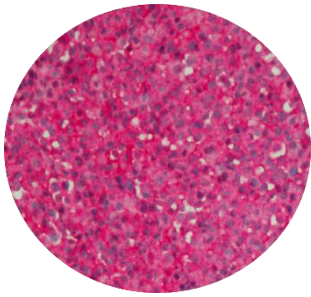
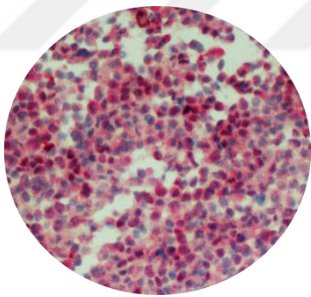
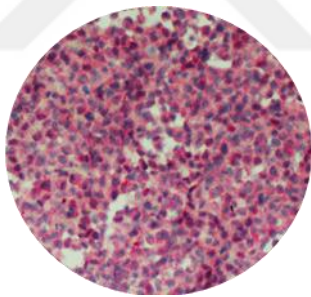
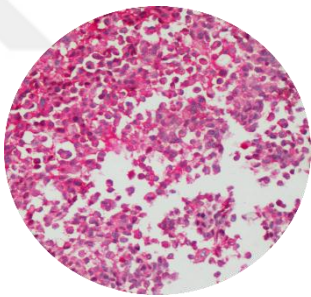
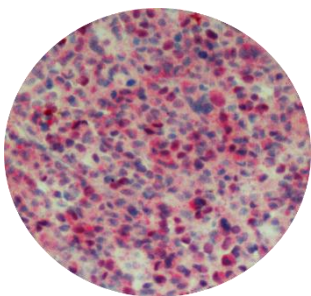
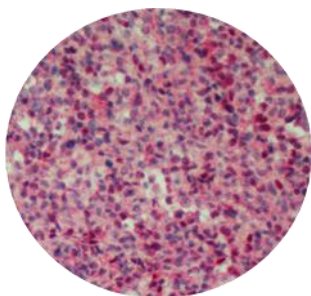
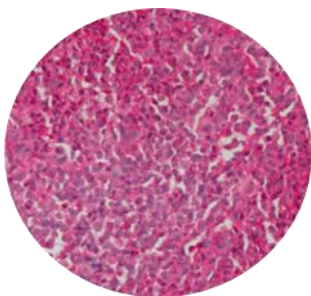
Metastatik melanom hücre hatlarında primer kutanöz melanoma hücre hatlarına göre *NDRG-1* nükleer ekspresyonunda azalma izlenirken, *JMJD6* sitoplazmik-nükleer, *HIF-1 Beta* sitoplazmik-nükleer ve *NDRG-1* sitoplazmik ekspresyonunda artış saptandı.

#### 4.3.1. Hipoksi Çalışması:

Primer kutanöz melanom hücre hatlarında 1,4 ve 8 saatlik hipoksi sonucunda *JMJD6* sitoplazmik, *JMJD6* nükleer ve *NDRG-1* nükleer ekspresyonunda azalma gözlenirken, *HIF-1 Beta* sitoplazmik, *HIF-1 Beta* nükleer ve *NDRG-1* sitoplazmik ekspresyonunda artış saptandı(Şekil 19, Tablo-10).



Şekil-19: Primer melanom hücre hatlarında hipoksi deneyi sonrası immünohistokimya skorlarının değişim grafikleri

Hücre Hattı	Tablo-10: Primer Melanom Hücre Hatlarının <i>JMJD6</i> , <i>HIF-1 Beta</i> ve <i>NDRG-1</i> Antikorları İle Boyanması		
	<i>JMJD6</i>	<i>HIF-1 BETA</i>	<i>NDRG-1</i>
CRL-1675			
HİPOKSİ 1. SAAT			
HİPOKSİ 4. SAAT			
HİPOKSİ 8. SAAT			



#### 4.3.2. Çalışma grubu:

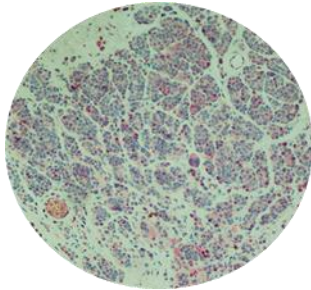
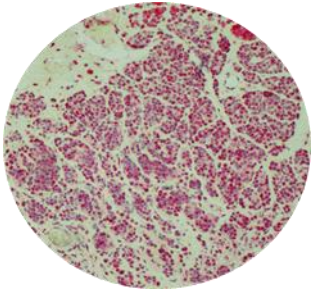
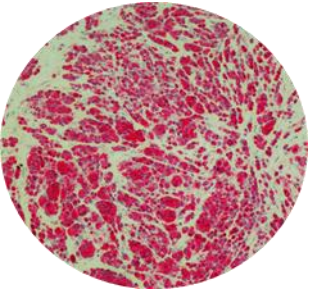
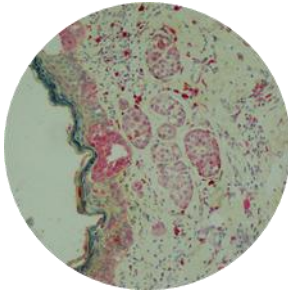
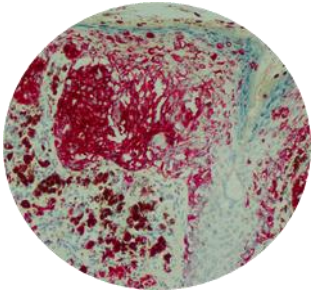
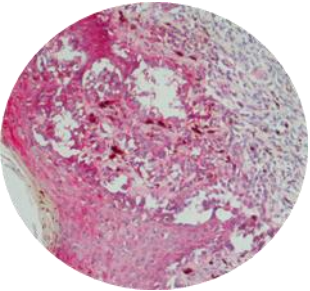
Tablo 11 'de çalışma gruplarındaki pozitif immünohistokimyasal boyanma sonuçlarının dağılımı özetlenmiştir.

**Tablo-11: Çalışma Gruplarında İmmünohistokimyasal (Pozitif Boyanma/Yüzdesi) Sonuçlarının Dağılımı**

Antikor	İntradermal Nevüs n=10	Primer Kutanöz Melanom n=74	Mukozal Melanom n=40	Oküler Melanom n=14	Diğer Melanom n=11	Metastatik Melanom n=66
<i>JMJD6</i> sit.	10 (100%)	50 (67,5%)	24 (60%)	7 (50%)	10(90,9%)	38(57,6%)
<i>JMJD6</i> nük.	10 (100%)	64 (86,5%)	33 (82,5%)	7 (50%)	11(100%)	53(80,3%)
<i>HIF-1 Beta</i> sit.	10 (100%)	67 (90,5%)	32 (80%)	10 (71,4%)	8(72,7%)	51(77,2%)
<i>HIF-1 Beta</i> nük.	10 (100%)	66 (89,1%)	38 (95%)	12 (85,7%)	11(100%)	57(86,3%)
<i>NDRG1</i> sit.	10 (100%)	51 (68,9%)	23 (57,5%)	12 (85,7%)	10(90,9%)	44(66,6%)
<i>NDRG1</i> nük.	10 (100%)	56 (75,7%)	33 (82,5%)	9 (64,2%)	5(45,5%)	36(54,5%)

Sonuçlar ortalama skorlar olarak sıralanmıştır.

**Tablo-12: Primer Kutanöz Melanom İle İntradermal Nevüsün JMJD6, HIF-1 Beta ve NDRG-1 Antikorları ile Boyanması (x100)**

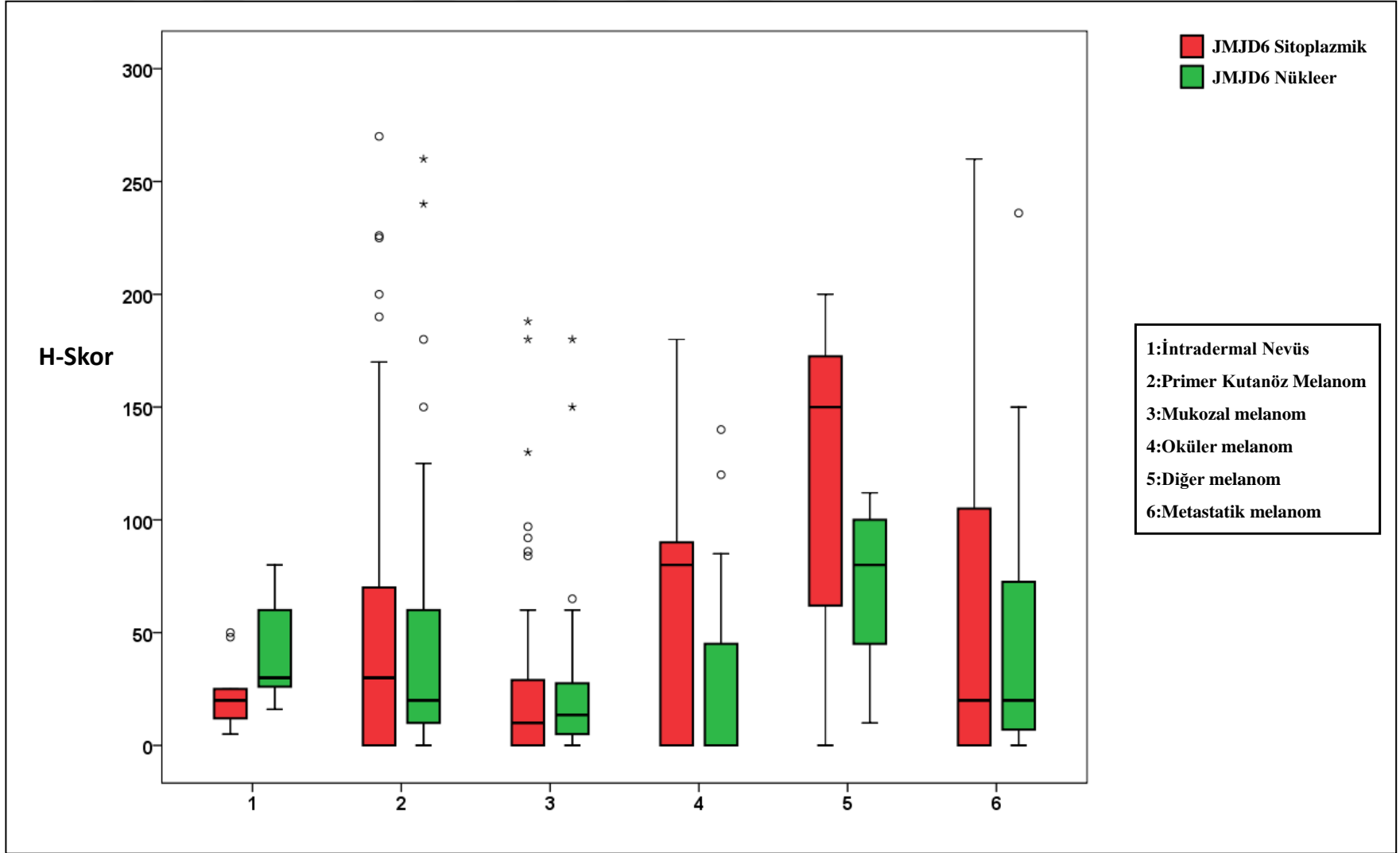
Çalışma Grubu	<i>JMJD6</i>	<i>HIF-1 BETA</i>	<i>NDRG-1</i>
İntradermal Nevüs			
Primer Kutanöz Melanom			



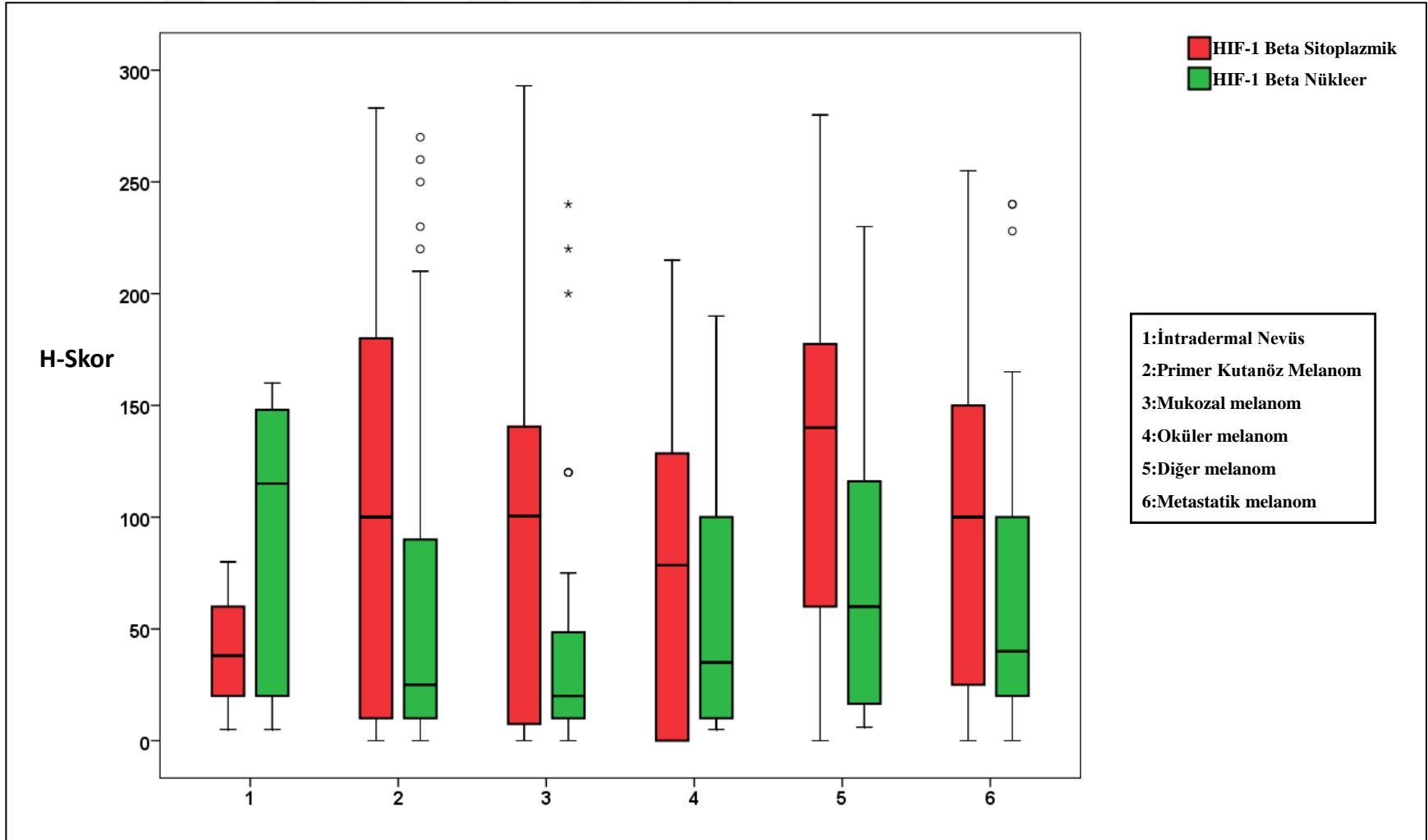
### 4.3.3. H-Skor Bulguları:

H-Skor bulguları box-plot grafiklerde özetlenmiştir.(Şekil-20-22)

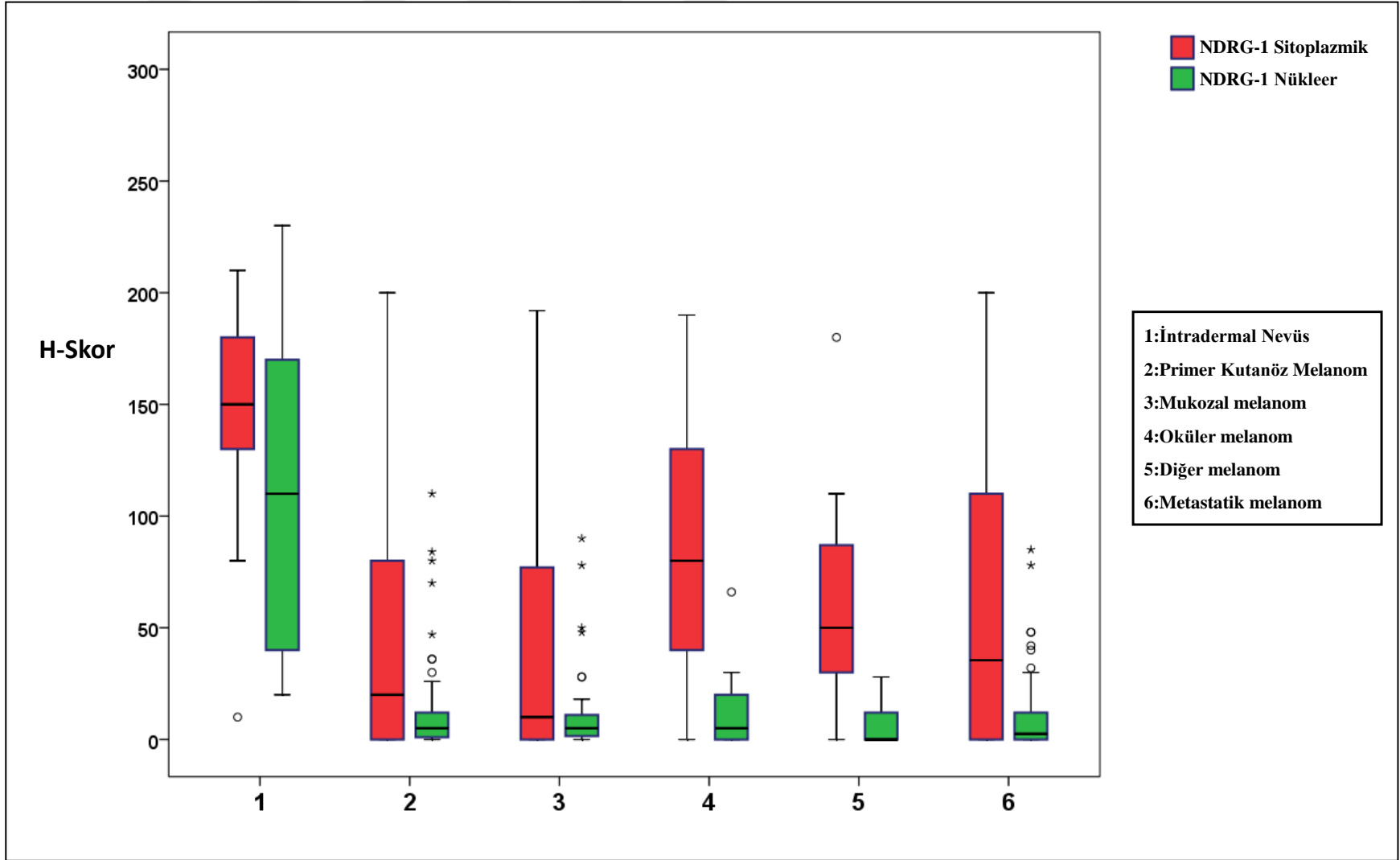




Şekil-20: Gruplar arasında *JMJD6* Sitoplazmik-Nükleer H-Skor Değerlerinin Box-Plot Grafikleri



Şekil-21: Gruplar Arasında *HIF-1 Beta* Sitoplazmik-Nükleer H-Skor Değerlerinin Box-Plot Grafikleri



Şekil-22: Gruplar Arasında *NDRG-1* Sitoplazmik-Nükleer H-Skor Değerlerinin Box-Plot Grafikleri

#### 4.4.İstatiksel Bulgular:

Melanom doku "array" ve arşiv vakalarından oluşan toplam 218 vakayı kontrol grubu olarak intradermal nevüs grubunu seçip primer kutanöz melanom, mukozal melanom, okuler melanom, metastatik melanom ve yumuşak dokuda lokalize melanom grubu olacak şekilde 6 gruba ayırarak inceledik.

Primer kutanöz melanomlarda intradermal nevüslere göre *NDRG-1* sitoplazmik ( $p=0.001$ ) ve *NDRG-1* nükleer ( $p=0.001$ ) ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı. *HIF-1 Beta* sitoplazmik primer kutanöz melanomlarda intradermal nevüslere göre ekspresyonunda artma saptandı. ( $p=0.032$ )

Yumuşak dokuda lokalize melanomlarda primer kutanöz melanomlara göre *JMJD6* sitoplazmik ekspresyonunda artma saptandı. ( $p=0.007$ )

Yumuşak dokuda lokalize melanomlarda mukozal melanomlara göre *JMJD6* sitoplazmik ( $p=0.001$ ) ve *JMJD6* nükleer ( $p=0.002$ ) ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı artma gözlemlendi.

Intradermal nevüslerde *NDRG-1* nükleer ile *HIF-1 Beta* nükleer ( $r=0.758$   $p=0.011$ ), *HIF-1 Beta* sitoplazmik ile *HIF-1 Beta* nükleer ( $r=0,750$   $p=0,012$ ), *NDRG-1* sitoplazmik ile *NDRG-1* nükleer ( $r=0,650$ ,  $p=0,042$ ) arasında pozitif ilişki saptandı.

Primer kutanöz melanomlarda *JMJD6* sitoplazmik ile *HIF-1 Beta* sitoplazmik ( $r=0.485$   $p=0.001$ ), *HIF-1 Beta* sitoplazmik ile *HIF-1 Beta* nükleer ( $r=0.731$   $p=0.001$ ), *NDRG1* sitoplazmik ile *NDRG1* nükleer ( $r=0,769$   $p=0.001$ ), *JMJD6* sitoplazmik ile *NDRG1* sitoplazmik ( $r=0.307$   $p=0.008$ ), *JMJD6* sitoplazmik ile *HIF-1 Beta* nükleer ( $r=0,671$   $p=0.001$ ), *JMJD6* sitoplazmik ile *JMJD6* nükleer ( $r=0,749$   $p=0.001$ ), *HIF-1 Beta* sitoplazmik ile *JMJD6* nükleer ( $r=0.409$   $p=0.001$ ), *NDRG1* sitoplazmik ile *JMJD6* nükleer ( $r=0.276$   $p=0.017$ ), *JMJD6* nükleer ile *HIF-1 Beta* nükleer ( $r=0,560$   $p=0.000$ ), *JMJD6* nükleer ile *NDRG1* nükleer ( $r=0.273$   $p=0.019$ ) arasında pozitif ilişki ve Yaş ile *HIF-1 Beta* nükleer ( $r=-0.275$   $p=0.018$ ) arasında negatif ilişki saptandı.

Mukozal melanomlarda *JMJD6* sitoplazmik ile *HIF-1 Beta* sitoplazmik ( $r=0.454$   $p=0.003$ ), *JMJD6* Sitoplazmik ile *HIF-1 Beta* nükleer ( $r=0.576$   $p=0.001$ ), *JMJD6* nükleer ile *HIF-*

*1 Beta* nükleer ( $r=0.505$   $p=0.001$ ), *JMJD6* nükleer ile *NDRG1* nükleer ( $r=0.333$   $p=0.036$ ), *JMJD6* sitoplazmik ile *JMJD6* nükleer ( $r=0.709$   $p=0.000$ ), *HIF-1 Beta* sitoplazmik ile *HIF-1 Beta* nükleer. ( $r=0.691$   $p=0.001$ ), *NDRG1* sitoplazmik ile *NDRG1* sitoplazmik ( $r=0.637$   $p=0.001$ ) arasında pozitif ilişki izlendi.

Oküler melanomlarda Evre ile *JMJD6* nükleer ( $r=0.597$   $p=0.031$ ), *JMJD6* sitoplazmik ile *JMJD6* nükleer ( $r=0.785$   $p=0.001$ ), *HIF-1 Beta* sitoplazmik ile *HIF-1 Beta* nükleer ( $r=0.617$   $p=0.033$ ) arasında pozitif ilişki ve *NDRG1* sitoplazmik ile *JMJD6* nükleer ( $r=-0.593$   $p=0.033$ ) arasında negatif ilişki saptandı.

Yumuşak dokuda lokalize melanomlarda *JMJD6* sitoplazmik ile *HIF-1 Beta* sitoplazmik ( $r=0.828$   $p=0.002$ ), *JMJD6* sitoplazmik ile *HIF-1 Beta* nükleer ( $r=0.854$   $p=0.001$ ), *HIF-1 Beta* sitoplazmik ile *HIF-1 Beta* nükleer ( $r=0.708$   $p=0.015$ ), *NDRG1* sitoplazmik ile *NDRG1* sitoplazmik ( $r=0.798$   $p=0.003$ ) arasında pozitif ilişki görüldü.

Metastatik melanomlarda *JMJD6* sitoplazmik ile *HIF-1 Beta* sitoplazmik ( $r=0.498$   $p=0.001$ ), *JMJD6* sitoplazmik ile *HIF-1 Beta* nükleer ( $r=0.558$   $p=0.001$ ), *JMJD6* nükleer ile *HIF-1 Beta* sitoplazmik ( $r=0.348$   $p=0.005$ ), *JMJD6* nükleer ile *HIF-1 Beta* nükleer ( $r=0.489$   $p=0.001$ ), *JMJD6* sitoplazmik ile *JMJD6* nükleer ( $r=0,698$   $p=0,001$ ), *HIF-1 Beta* sitoplazmik ile *HIF-1 Beta* nükleer ( $r=0,709$   $p=0,001$ ), *NDRG1* sitoplazmik ile *NDRG1* nükleer ( $r=0,823$   $p=0,001$ ) arasında pozitif ilişki saptandı.

## TARTIŞMA

Malign melanom, nöral krestten köken alan pigment üreten hücrelerin agresif seyirli tümörüdür.(127) Deri kanserlerinin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır ancak deri kanserlerine bağlı ölümün %80'inden sorumludur.(128) Radyoterapi ve kemoterapi direncine ve kötü prognoza sahip olan bu agresif tümörün karsinogenez basamakları, bu basamaklarda ve invazyon-metastazda kullandığı yollar üzerine yapılan moleküler düzeydeki çalışmalar, hedefe yönelik kanser tedavisinin gelişmesine ve yeni moleküllerin bulunmasına neden olmuştur.(129)

Sınırsız çoğalma kapasitesi sonucu artan oksijen tüketiminin meydana getirdiği hipoksik ortam solid tümör mikroçevresinin önemli bir özelliğidir ve malign melanomda invazyon metastazda kritik öneme sahip mikroçevresel faktörlerden birisidir. (130, 131) İnsan derisinin %1,5-5 oksijen düzeyi aralığında hafif hipoksik olduğu gösterilmiş ve bunun hücrelerin hipoksik koşullarda yaşamlarını sürdürebilecekleri programları aktive etmeleri için gerekli olduğu öne sürülmüştür.(132)

Tümör hücresi, yer aldığı mikroçevredeki hipoksik değişimin, nükleusa haber verilmesi ve gereken adaptasyonun sağlanması için aracı olarak hipoksi indüklenebilir faktörü (*HIF-1*) kullanır. (133, 134) *HIF-1 alfa*, hipoksik koşullarda nükleusa translokasyonu ile ARNT ile birleşerek *HIF-1* kompleksini oluşturur.(135) Oluşan *HIF-1* DNA'daki hipoksi cevap elementine bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu artırır. Hedef genler başlıca anjiogenez (*VEGF*, *ANG-2*), metastaz (*TWIST1*, *AMF*, *CXCR4*, *LOX*, *MMP2*, *uPAR*), pH regülasyonu (*CA IX*), hücre sağ kalımı (*BNIP3*), hücre metabolizmasından (*LDH-A*, *PDK1*) sorumludur.(136) Hipoksik ortam böylece *HIF-1* yardımı ile neoplastik hücrelerin sağkalımına yardımcı olabilecek çeşitli genlerin ekspresyonunu artırır.

Bu araştırma kapsamında primer ve metastatik melanom hücre hatlarında ilk olarak hipoksi ile ilişkili gen ekspresyonlarını araştırdık ve 37 adet gende ekspresyonlarında farklılık bulduk. Bu bulgular hipoksik ortamla ilişkili genlerin metastatik ortamda farklı ifade bulabileceğini öncelikle düşündürmüştür. Benzer bulguları Koh ve ark. yaptıkları çalışmada

primer kutanöz ve metastatik melanom arasında 576 genin anlamlı farklılık gösterdiği ve bunların 402'sinin metastatik melanomlarda azaldığını bulmuşlardır. Bu azalan genler hücre siklusunun düzenlenmesi, hücre adezyonu, proteaz inhibitör aktivitesi ve keratinosit ilişkili fonksiyonlarla ilişkilidir.(137) Riker ve ark. primer kutanöz melanomlar ile metastatik melanomlar arasında gen ekspresyon farklılıkları bulmuşlardır.(138) Bertucci ve ark. metastatik melanoma hücre hatlarında anjiogenez, invazyon, büyüme ve apoptoz ile ilişkili genlerin up-regüle olduğunu ve tümör baskılayıcı genlerin down-regüle olduğunu bulmuşlardır. Hipoksi ilişkili genlerin arttığını ve hipoksinin melanom progresyonunda önemli yeri olduğunu vurgulamışlardır.(139) Jeffs ve ark. yaptıkları çalışmada metastatik melanomlardaki farklı gen ekspresyonlarının diferansiasyon, hücre klonunun seçilmesi ve tümör mikroçevresine cevapla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Hipoksinin melanoma progresyonunda önemli bir çevresel faktör olduğunu ve *PLAUR/HIF-1 $\alpha$*  up-regülasyonu ile *HIF/ARNT* yolağının aktivasyonu ile lenf nodu metastazına neden olabileceğini bildirmişlerdir.(140) Makhzami ve arkadaşları 27 geni içeren analizde primer melanom dokularında 5 genin (*M-MITF*, *TYR*, *STAT3*, *CCDN1* ve *PAX3*) metastatik melanomlara göre anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir. (141)

Çalışmamızda metastatik melanom hücre hattında *JMJD6* sitoplazmik-nükleer ekspresyonunda primer melanom hücre hattına göre artma saptandı. Literatürde *JMJD6*'nin meme kanseri hücrelerinde ekspresyonunun artmasının tümör hücrelerinin proliferasyonunu artırdığını ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur.(142) Kanser progresyonu ve metastazda önemli rolü olan *Brd4* proteini ile *JMJD6*'nin etkileşimde olduğu bilinmektedir. (143) Bulgularımız *JMJD6*'nin tümör invazyonu ile metastaz ile ilişkili olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızda metastatik melanom hücre hattında *NDRG-1* sitoplazmik ekspresyonunda primer melanom hücre hattına göre artma saptanırken, *NDRG-1* nükleer ekspresyonunda belirgin azalma görüldü. Literatürde *NDRG-1*'in tümör baskılayıcı ve daha spesifik olarak metastaz baskılayıcı bir protein olabileceğini iddia edilmektedir.(144) Paradoksik olarak ekspresyonunun çoğu kanser dokusunda normal dokuya göre daha yüksek bulunması ekspresyonunun doku veya hücreye spesifik düzenlendiği fikrini doğurmuştur. (145) Prostat ve kolon kanserinde *NDRG-1*'in metastaz baskılayıcı olarak görevli olduğu



düşünülmektedir.(146, 147) Primer ve metastatik tiroid karsinomunda ekspresyonun arttığı gösterilmiştir. (148) Meme kanserinde sitoplazmik *NDRG-1* ekspresyonunun normal meme epitel hücrelerine göre azaldığı bulunmuştur. (149) Bulgularımız metastatik melanomda *NDRG-1* nükleer ekspresyonunun belirgin azalmasının literatürdeki *NDRG-1*'in metastaz baskılayıcı bir protein olduğu görüşü ile uyumludur. Ancak sitoplazmik ekspresyonunun artması nükleustan sitoplazmaya translokasyonu sonucunda oluşup oluşmadığını göstermek için ileri deneysel çalışmalara gereksinim vardır.

Çalışmamızda metastatik melanom hücre hattında primer melanom hücre hatlarına göre daha fazla *HIF-1 Beta* sitoplazmik ekspresyonu görüldü. Literatürde *ARNT<sup>-/-</sup>* trofoblast kök hücrelerinde  $\alpha\beta3$  integrin-aracılı adhezyonda ve migrasyonda azalma görülmüştür. Melanom metastazlarında hipoksik bölgeler bulunmakta ve metastatik progresyon artmış  $\alpha\beta3$  integrin ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. B16-F0 (CRL-6322) metastatik melanom hücre hattında hipoksi, yüzeyde  $\alpha\beta3$  integrin ekspresyonunu uyararak vitronektine adhezyonu ve migrasyonu arttırdığı gösterilmiştir. Melanom, hepatosellüler karsinom, meme ve over kanserlerinde  $\alpha\beta3$  artmış invaziv fenotiple veya metastazla korele bulunmuştur.(150) Tümör hipoksisi direkt veya indirekt *TWIST*, *SNAIL*, *SIP1* regülasyonu ile E-Kadherinin down regülasyonuna neden olur.(151) Ayrıca hipoksi *HIF-1* aracılığıyla *uPAR* ile *MMP2* gibi genlerin düzenlenmesi sonucunda invazyonu arttırır.(152) *HIF-1*; *MMP1*, *MMP3*, *c-Met*, *Notch*, *CD151*, *CD44*, *CXCR4*, *SMAD7* gibi invazyon ve metastaz patofizyolojisinde rol alan proteinlerin sentezinde görevli genleri düzenler. Bulgularımız *HIF-1 Beta*'nın malign melanomun invazyon ve metastazında rolü olduğunu ve metastazda arttığı yönündeki çalışmaları destekler niteliktedir.

*Katepsin A*, malign transformasyonda ve metastazda rolü olduğu düşünülen serin karboksi peptidazdır.(153) Çalışmamızda *Katepsin A*'nın metastatik melanoma hücre hattında up-regüle olduğu (FR:9,4) görülmüştür. Benzer bulguları Kozlowski ve ark. metastatik melanom lizatlarında primer melanom lizatlarına göre *Katepsin A* düzeyini yüksek bulmuşlardır.(154) Bulgularımız metastatik melanomda *Katepsin A*'nın artmasını desteklemektedir.

Çalışmamızda *ANGPTL-4*'ün metastatik melanoma hücre hattında up-regüle olduğu (FR:9,4) görülmüştür. Benzer bulguları Izraely ve ark. yaptıkları çalışmada melanom hücre hatlarının beyin metastazlarında kutanöz forma göre *ANGPTL-4*'ün up-regüle olduğunu bulmuşlardır.(155) Zhang ve ark. *HIF-1* bağımlı *ANGPTL-4* aktivasyonunun meme kanseri hücrelerinin akciğere vasküler metastazını arttırdığını göstermişlerdir.(156) Bulgularımız *ANGPTL-4* metastazda up-regüle olmasını desteklemektedir.

*COPS5 (JAB1)* hücre proliferasyonunun ve apoptozisin kontrolü ile DNA hasarı tamirinde sorumlu proteindir.(157) Çalışmamızda *COPS5*'in metastatik melanoma hücre hattında upregüle olduğu (FR:3) görülmüştür. Benzer bulguları Ivan ve ark. metastatik hücre hatlarında *JAB-1*'in arttığını göstermişlerdir. (158)Shintani ve ark. yaptıkları çalışmada oral skuamoz hücreli karsinomada *COPS5*'in artmış ekspresyonunun servikal lenf nodu metastazı ile ilişkisi olduğunu bulmuşlardır. (159) Bulgularımız literatür bilgilerini desteklemektedir.

*BTG-1* (B-Hücre Translokasyon Geni-1) antiproliferatif gen ailesinin üyesidir ve ekspresyonu en fazla  $G_0/G_1$  fazında olurken  $G_1$  fazında down regüle olur.(160) Çalışmamızda *BTG-1*'in metastatik melanoma hücre hattında down-regüle olduğu (FR:-5,15) görülmüştür. Benzer bulguları Chen ve ark. oldukça agresif ve metastatik olan androjen bağımsız (AI) C4-2 prostat adenokarsinomu hücre hattında *BTG-1*'in mRNA ve protein düzeyinde azaldığını göstermişlerdir.(161) Bulgularımız literatür ile uyumludur.

Çalışmamızda tanımlanmış 84 adet hipoksi ile ilişkili genin kısa ve orta zaman aralığında primer melanoma hatlarında nasıl tepki verdiği de araştırılmıştır. 1 saatlik hipoksi sonrası toplam 18 gen, 4 saatlik hipoksi sonrası toplam 74 gen, 8 saatlik hipoksi sonrası 31 genin ekspresyonlarında farklılık saptanmıştır. *HIF-1 Beta* nükleer ekspresyonunun kademeli olarak arttığı ve 8 saatlik hipoksizde en yüksek düzeye ulaştığı, *HIF-1 Beta* sitoplazmik ekspresyonunun ise 4 saatlik hipoksizde en yüksek düzeye ulaştığı ve 8 saatlik hipoksizde ekspresyonunun düştüğü görüldü. Benzer bulguları Semenza ve ark. hücresel  $O_2$  düzeylerinin düşmesi ile eksponensiyal olarak *HIF-1 Beta* proteinin arttığını ve % 0,5  $O_2$  düzeyinde maksimum düzeyine ulaştığını bildirmişlerdir. (162) Chilov ve ark. değişik hücre hatlarında yaptıkları hipoksi deneyinde (%1  $O_2$ ) hücre hatlarına ait nükleer ekstraktlarda *ARNT* protein düzeyinin arttığı ancak sitoplazmik ekstraktlarda *ARNT* proteinin olmadığı görülmüştür. Hipoksizde nükleer *ARNT* birikiminin artmış hücresel *ARNT* protein

konsantrasyonuna bağlı olup olmadığını anlamak amacıyla total hücre lizatlarındaki *ARNT* konsantrasyonlarına bakıldığında ise hipoksi ile total hücre lizatlarında *ARNT* protein düzeyinin değişmediği bulunmuştur. Bu durum hipokside *HIF-1 Beta* düzeyinin nükleusta birikiminin sitoplazmadan nükleusa translokasyonu sonucunda olduğu görüşünü ortaya çıkarmıştır. (163) Bulgularımız hipoksi ile *HIF-1 Beta*'nın upregüle olduğu görüşünü desteklemektedir. Ayrıca hipoksi sürecinin artması ile *HIF-1 Beta*'nın sitoplazmik düzeyinin azalması ve nükleer düzeyinin artması, *HIF-1 alfa* gibi hipoksi durumunda sitoplazmadan nükleusa yer değiştirdiğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda *NDRG1* ekspresyonu 4 saatlik hipoksi sonrasında artmış ancak 8 saatlik hipokside ekspresyonu azalmıştır. Benzer bulguları Cangül ve ark. yaptıkları çalışmada A549 hücre hattında 2,4,8 ve 18 saatlik hipokside (%0,5) *NDRG1* RNA transkriptlerini giderek arttığını göstermişlerdir.(145)

*GBE1* geni glikojen sentezinde görevli 1,4- $\alpha$  glukoz dal yapıcı enzimi kodlar. Çalışmamızda 1, 4 ve 8 saatlik hipoksi sonrasında *GBE1*'in upregüle olduğu (sırasıyla FR: 14.2, 85.8, 6.6) görülmüştür. Literatürde benzer bulguları Pescador ve ark. hipoksi ile *GBE1*'in ekspresyonunun up-regüle olduğunu göstermişlerdir.(164) Zhao ve ark. direkt hipoksi ile veya nikel/kobalt kloride maruziyet ile *GBE1*'in upregüle oldunu bulmuşlardır.(165) Bulgularımız literatür ile uyumludur.

*CCNG2 (Siklin G2) hücre siklus inhibitörüdür.* Çalışmamızda 1 ve 4 saatlik hipoksi sonrasında *CCNG2*'in upregüle olduğu (sırasıyla FR: 3.2, 6.1) görülmüştür. Literatürde benzer bulguları Choi ve ark. hipoksi ile *CCNG2*'nin upregüle olduğunu göstermişlerdir.(166) Méndez ve ark. GL261 glioma hücre hatlarında hipoksinin *CCNG2* düzeyini upregüle ettiğini göstermişlerdir.(167) Bulgularımız literatür ile uyumludur.

Çalışmamızda hipoksi deneylerinde anjiogenezis (*VEGFA*), glukoz metabolizması (*PGAM1, ENO1, LDHA, ALDOA, TPI1*) ve hücre siklusunda (*CCNG2*) rolü olan genlerin hipoksi ile upregüle olduğu görülmüştür. Benzer bulguları Buffa ve ark. anjiogenezis (*VEGFA*), glukoz metabolizması (*PGAM1, ENO1, LDHA, ALDOA*) ve hücre siklusunda (*CDKN3*) rolü olan genlerin hipoksik baş-boyun skuamöz hücreli karsinomunda ve meme kanserinde upregüle

olduğunu göstermişlerdir.(168) Bulgularımız Buffa ve ark.'nın sonuçları ile uyumluluk göstermektedir.

İmmünohistokimyasal çalışmada primer kutanöz melanomlarda intradermal nevüslere göre NDRG-1 sitoplazmik ( $p=0,001$ ) ve NDRG-1 nükleer ( $p=0,001$ ) ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı. Literatürde kolon kanseri dışındaki birçok tümörde hem sitoplazmik hem de nükleer ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir.(122) Hepatosellüler karsinomda NDRG-1'in sitoplazmada ve membranda upregüle olduğu bulunmuştur. (169) Aksine meme kanserinde sitoplazmik NDRG-1 ekspresyonunun normal meme epitel hücrelerine göre azaldığı bulunmuştur. (149) Literatürde farklı bilgiler olduğundan dolayı NDRG1'in ekspresyonunun farklı kanser türlerinde tümör türüne özgü ekspresyon farklılığı gösterip göstermediği bulmak amacıyla ileri çalışmaların yapılması gereklidir. Çalışmamızda ayrıca primer kutanöz melanomlarda intradermal nevüslere göre HIF-1 Beta sitoplazmik ekspresyonunda artma saptandı ( $p=0,032$ ). Bu bulgu hipoksik çevreyle karşılaşan tümörlerde beklenmekle birlikte literatürde tanımlanmamıştır.

Malign melanom en sık deride görülmekle birlikte oküler, mukozal ve leptomeningeal olarak vücudun diğer alanlarında görülebilmektedir. Yapılan moleküler çalışmalar primer kutanöz melanom alt tiplerinde, mukozal, uveal ve diğer bölgelerde görülen melanomların karsinogenez sürecinde farklı mutasyonların yer aldığını göstermiştir. Bu nedenle çalışmamızdaki olguları bu farklılar göz önüne alarak karşılaştırdık. Çalışmamızda arrayi sağlayan firmanın verilerine dayanarak yumuşak dokuda yer aldığı belirtilen melanomlarda primer kutanöz melanomlara göre JMJD6 sitoplazmik ekspresyonunda artma ( $p=0,007$ ), mukozal melanomlara göre JMJD6 sitoplazmik ( $p=0,001$ ) ve JMJD6 nükleer ( $p=0,002$ ) ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı artma gözlemlendi. Literatürde özellikle histon demetilasyonda yer alan Jmjc-bölgesi içeren enzimleri (JMJD1A, JMJD2B) hipoksinin upregüle ettiği gösterilmiştir.(170, 171) Diğer melanoma grubundaki farklılığın olasılıkla yumuşak doku içerisinde yetersiz oksijenasyonuna bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda primer kutanöz melanomlar ile mukozal melanomlarda *JMJD6* ile *NDRG-1* arasında pozitif korelasyon mevcut iken oküler melanomda *JMJD6* ile *NDRG-1* arasında negatif ilişki görüldü. Oküler melanomlarda kutanöz ve mukozal melanomlardan farklı olarak *GNAQ-GNA11* mutasyonu daha sık görülmektedir.(76) Normal retina pigment epitelinin ve irisin gelişimi ile oküler büyüme ve vasküler gelişimi için *HIF-1 alfa'*nın *vHL* proteini ile uygun bir şekilde regülasyonunun gerekli olduğu gösterilmiştir.(172) *vHL* proteini *Sp1* aktivitesini bloke ederek *NDRG-1*'i inhibe eder.(173) *vHL* geni 3. kromozomda yer almaktadır ve uveal melanomda 3. Kromozom kaybı mevcuttur.(174) Sekans analizleri ile *JMJD6*'nın *HIF-1 asparajinil hidroksilaz (HIF 1 inhibe edici faktör, FIH-1)* olduğu gösterilmiştir. *FIH-1*, *vHL*'ye bağlanarak *HIF-1* transkripsiyonel aktivitesini baskılamaktadır. (175) Bu ilişkinin primer kutanöz ve mukozal melanomlardan farklı olarak uveal melanomlarda daha sık görülen *GNAQ-GNA11* mutasyonu veya olası *vHL* protein defekti/kaybına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

- Primer ve metastatik melanom hücre hatlarında farklı ekspresyon profillerinin saptanması metastatik tümör klonlarında hipoksiye verdikleri yanıtın farklı olduğunu düşündürmüştür.
- Hipoksi deneylerinde primer melanom hücre hatlarında gen ekspresyonlarında farklılıkların görülmesi tümörün içerisinde bulunduğu mikroçevrenin karsinogenez sürecinde önemli olduğunu ve hipoksinin glukoz metabolizması, hücre siklusu, anjiogenez gibi tümörögenezise katkıda bulunacak önemli olayları indüklediği görülmüştür.
- Çalışmamızda hipoksi ile *HIF-1 Beta*'nın arttığı saptandı. *HIF-1 Beta*'nın metastatik melanomlarda arttığı görüldü.
- Çalışmamızda primer kutanöz melanomlarda *NDRG-1*'in sitoplazmik-nükleer ekspresyonunda azalma saptandı. Hipoksi ile *NDRG-1* sitoplazmik ekspresyonunda artış saptanırken, nükleer ekspresyonunda azalma saptandı. Hücre içerisindeki yerleşimi ile hipoksi arasındaki ilişkinin araştırabileceğini düşünmekteyiz. Metastatik melanomda *NDRG-1* nükleer ekspresyonda azalma saptanırken, sitoplazmik ekspresyonunda artış saptandı.
- Çalışmamızda *JMJD6*'nın hipoksi ile sitoplazmik-nükleer ekspresyonunun azaldığı görüldü. Metastatik melanomda *JMJD6*'nın sitoplazmik-nükleer ekspresyonunun arttığı saptandı.
- *JMJD6*'nın melanomlar arasında farklı ekspresyon patternine sahip olduğu görüldü. Melanomların etyopatogenezinde yer alan mutasyonlarla ilişkisinin olabileceği ve bu ilişkiyi açıklayabilmek için ileri deneysel çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünüldü.
- Oküler melanomda *JMJD6* ile *NDRG-1* arasında negatif ilişkinin bulunması diğer melanomlardan farklı olarak *GNAQ/GNA11* mutasyonu ile ilişkisinin olabileceği düşünülmüştür ve *vHL* protein kaybının uveal melanomlarda 3. kromozomdaki delesyona bağlı olup olmadığını araştırmak için ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.
- Melanomlarda *NDRG-1* ve *HIF-1 β* ekspresyonunun benign nevüs hücrelerinden farklı olduğu da ortaya konmuştur.

## KAYNAKLAR

1. Bandarchi B, Jabbari CA, Vedadi A, Navab R. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. *Journal of Clinical Pathology*. 2013;66(8):644-8.
2. Bishop KD, Olszewski AJ. Epidemiology and survival outcomes of ocular and mucosal melanomas: A population-based analysis. *International Journal of Cancer*. 2013.
3. Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes & Development*. 2006;20(16):2149-82.
4. Paszkowska-Szczur K, Scott RJ, Serrano-Fernandez P, Mirecka A, Gapska P, Gorski B, et al. Xeroderma pigmentosum genes and melanoma risk. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013;133(5):1094-100.
5. Njauw C-NJ, Kim I, Piris A, Gabree M, Taylor M, Lane AM, et al. Germline *BAP1* Inactivation Is Preferentially Associated with Metastatic Ocular Melanoma and Cutaneous-Ocular Melanoma Families. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e35295.
6. Sekulic A, Haluska P, Jr., Miller AJ, Genebriera De Lamo J, Ejadi S, Pulido JS, et al. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clinic Proceedings*. 2008;83(7):825-46.
7. Yun J, Lee J, Jang J, Lee EJ, Jang KT, Kim JH, et al. KIT amplification and gene mutations in acral/mucosal melanoma in Korea. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2011;119(6):330-5.
8. Onken MD, Worley LA, Long MD, Duan S, Council ML, Bowcock AM, et al. Oncogenic Mutations in *GNAQ* Occur Early in Uveal Melanoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2008;49(12):5230-4.
9. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, et al. Mutations in *GNA11* in Uveal Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(23):2191-9.
10. Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Brocker EB, Pinkel D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*. 1998;58(10):2170-5.
11. Pirker C, Holzmann K, Spiegl-Kreinecker S, Elbling L, Thallinger C, Pehamberger H, et al. Chromosomal imbalances in primary and metastatic melanomas: over-representation of essential telomerase genes. *Melanoma Research*. 2003;13(5):483-92.

12. Bailey KM, Wojtkowiak JW, Hashim AI, Gillies RJ. Targeting the metabolic microenvironment of tumors. *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif). 2012;65:63-107.
13. Pakravan N. Tumorigenesis: cell defense against hypoxia? *Oncology Reviews*. 2013;7(1):1-6.
14. Favaro E, Lord S, Harris AL, Buffa FM. Gene expression and hypoxia in breast cancer. *Genome medicine*. 2011;3(8):55.
15. Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, et al. Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  Is a Positive Factor in Solid Tumor Growth. *Cancer Research*. 2000;60(15):4010-5.
16. Bedogni B, Powell MB. Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment cell & melanoma research*. 2009;22(2):166-74.
17. Semenza GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013;123(9):3664-71.
18. Mandl M, Kapeller B, Lieber R, Macfelda K. Hypoxia-inducible factor-1 $\beta$  (HIF-1 $\beta$ ) is upregulated in a HIF-1 $\alpha$ -dependent manner in 518A2 human melanoma cells under hypoxic conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013;434(1):166-72.
19. Smith TG, Robbins PA, Ratcliffe PJ. The human side of hypoxia-inducible factor. *British Journal of Haematology*. 2008;141(3):325-34.
20. Tsai YP, Wu KJ. Hypoxia-regulated target genes implicated in tumor metastasis. *J Biomed Sci*. 2012;19(1):102.
21. Bonazzi VF, Stark MS, Hayward NK. MicroRNA regulation of melanoma progression 2012.
22. Simon MC, Keith B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(4):285-96.
23. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Molecular Pharmacology*. 2006;70(5):1469-80.
24. Hahn P, Wegener I, Burrells A, Böse J, Wolf A, Erck C, et al. Analysis of Jmjd6 Cellular Localization and Testing for Its Involvement in Histone Demethylation. *PLoS ONE*. 2010;5(10):e13769.



25. Sven W, Maxi B, Andrea Z, Karl S, Marion F, Holger KE, et al. Hypoxia upregulates the histone demethylase JMJD1A via HIF-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;372:892-7.
26. Beyer S, Kristensen MM, Jensen KS, Johansen JV, Staller P. The Histone Demethylases JMJD1A and JMJD2B Are Transcriptional Targets of Hypoxia-inducible Factor HIF. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(52):36542-52.
27. Echaniz-Laguna A, Degos B, Bonnet C, Latour P, Hamadouche T, Lévy N, et al. NDRG1-linked Charcot-Marie-Tooth disease (CMT4D) with central nervous system involvement. *Neuromuscular Disorders*. 2007;17(2):163-8.
28. Sahni S, Bae D-H, Lane DJR, Kovacevic Z, Kalinowski DS, Jansson PJ, et al. The Metastasis Suppressor, N-myc Downstream Regulated Gene 1 (NDRG1), Inhibits Stress-Induced Autophagy in Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2014.
29. Sommer L. Generation of melanocytes from neural crest cells. *Pigment cell & melanoma research*. 2011;24(3):411-21.
30. Tachibana M. Sound needs sound melanocytes to be heard. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society*. 1999;12(6):344-54.
31. Brito FC, Kos L. Timeline and distribution of melanocyte precursors in the mouse heart. *Pigment cell & melanoma research*. 2008;21(4):464-70.
32. Thingnes J, Lavelle TJ, Hovig E, Omholt SW. Understanding the Melanocyte Distribution in Human Epidermis: An Agent-Based Computational Model Approach. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e40377.
33. Van Den Bossche K, Naeyaert J-M, Lambert J. The Quest for the Mechanism of Melanin Transfer. *Traffic*. 2006;7(7):769-78.
34. Brenner M, Hearing VJ. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin†. *Photochemistry and Photobiology*. 2008;84(3):539-49.
35. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy dermatologii i alergologii*. 2013;30(1):30-41.
36. Uong A, Zon LI. Melanocytes in development and cancer. *Journal of cellular physiology*. 2010;222(1):38-41.
37. Urteaga B O, Pack GT. On the antiquity of melanoma. *Cancer*. 1966;19(5):607-10.

38. Rebecca VW, Sondak VK, Smalley KS. A brief history of melanoma: from mummies to mutations. *Melanoma Res.* 2012;22(2):114-22.
39. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2013;63(1):11-30.
40. Cormier JN, Xing Y, Ding M, Lee JE, Mansfield PF, Gershenwald JE, et al. Ethnic differences among patients with cutaneous melanoma. *Archives of internal medicine.* 2006;166(17):1907-14.
41. Sneyd MJ, Cox B. A comparison of trends in melanoma mortality in New Zealand and Australia: the two countries with the highest melanoma incidence and mortality in the world. *BMC cancer.* 2013;13(1):372.
42. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in dermatology.* 2009;27(1):3-9.
43. Tas F. Age-specific incidence ratios in malignant melanoma in Turkey: melanoma in older people is increasing. *Acta dermato-venereologica.* 2011;91(3):353-4.
44. Kabigting FD, Nelson FP, Kauffman CL, Popoveniuc G, Dasanu CA, Alexandrescu DT. Malignant melanoma in African-Americans. *Dermatology Online Journal.* 2009;15(2):3.
45. Hodi FS, Corless CL, Giobbie-Hurder A, Fletcher JA, Zhu M, Marino-Enriquez A, et al. Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2013;31(26):3182-90.
46. Jarell AD, Lawrence D, Tsao H. The RAS/mitogen activated protein (MAP) kinase pathway in melanoma biology and therapeutics. *Biologics : targets & therapy.* 2007;1(4):407-14.
47. Kumar SM, Yu H, Edwards R, Chen L, Kazianis S, Brafford P, et al. Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1alpha expression in melanoma. *Cancer Res.* 2007;67(7):3177-84.
48. DeLuca AM, Srinivas A, Alani RM. BRAF kinase in melanoma development and progression. *Expert reviews in molecular medicine.* 2008;10:e6.
49. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature genetics.* 2003;33(1):19-20.

50. Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE, Jr., et al. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature genetics*. 2009;41(5):544-52.
51. Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD, et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Current biology : CB*. 2005;15(3):249-54.
52. Tsianakas A, Böhm MRR, Getova V, Metze D, Eter N, Spiekler T, et al. Skin metastases in metastatic uveal melanoma: GNAQ/GNA11 mutational analysis as a valuable tool. *British Journal of Dermatology*. 2013;169(1):160-3.
53. Marquette A, Bagot M, Bensussan A, Dumaz N. Recent discoveries in the genetics of melanoma and their therapeutic implications. *Arch Immunol Ther Exp*. 2007;55(6):363-72.
54. Robertson GP. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer metastasis reviews*. 2005;24(2):273-85.
55. Li D-M, Sun H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(26):15406-11.
56. Birck A, Ahrenkiel V, Zeuthen J, Hou-Jensen K, Guldberg P. Mutation and Allelic Loss of the PTEN//MMAC1 gene in Primary and Metastatic Melanoma Biopsies. 2000;114(2):277-80.
57. Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, Hassan M, Tannapfel A, Ruzicka T, et al. Epigenetic Silencing of the PTEN Gene in Melanoma. *Cancer Research*. 2006;66(13):6546-52.
58. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol*. 2004;122(2):337-41.
59. Karbowniczek M, Spittle CS, Morrison T, Wu H, Henske EP. mTOR Is Activated in the Majority of Malignant Melanomas. *J Invest Dermatol*. 2007;128(4):980-7.
60. Vidwans SJ, Flaherty KT, Fisher DE, Tenenbaum JM, Travers MD, Shrager J. A Melanoma Molecular Disease Model. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e18257.
61. Forman SB, Ferringer TC, Peckham SJ, Dalton SR, Sasaki GT, Libow LF, et al. Is superficial spreading melanoma still the most common form of malignant melanoma? *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2008;58(6):1013-20.

62. Erkurt MA, Aydogdu I, Kuku I, Kaya E, Basaran Y. Nodular melanoma presenting with rapid progression and widespread metastases: a case report. *Journal of medical case reports*. 2009;3:50.
63. Simionescu O, Costache M, Testori A. Cutaneous melanoma: digital dermoscopy-essential tool for positive diagnosis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006;10(4):991-4.
64. Kim JY, Choi M, Jo SJ, Min HS, Cho KH. Acral lentiginous melanoma: indolent subtype with long radial growth phase. *The American Journal of dermatopathology*. 2014;36(2):142-7.
65. Chorny JA, Barr RJ. S100-positive spindle cells in scars: a diagnostic pitfall in the re-excision of desmoplastic melanoma. *The American Journal of dermatopathology*. 2002;24(4):309-12.
66. Busam KJ, Mujumdar U, Hummer AJ, Nobrega J, Hawkins WG, Coit DG, et al. Cutaneous desmoplastic melanoma: reappraisal of morphologic heterogeneity and prognostic factors. *The American journal of surgical pathology*. 2004;28(11):1518-25.
67. Ratnam B. Desmoplastic melanoma presenting as pyogenic granuloma: Report of a case with review of literature. 2010 July 1, 2010. Report No.: Contract No.: 3.
68. Kanik AB, Yaar M, Bhawan J. p75 nerve growth factor receptor staining helps identify desmoplastic and neurotropic melanoma. *Journal of cutaneous pathology*. 1996;23(3):205-10.
69. Hilliard NJ, Krahl D, Sellheyer K. p16 expression differentiates between desmoplastic Spitz nevus and desmoplastic melanoma. *Journal of cutaneous pathology*. 2009;36(7):753-9.
70. Ariyanayagam-Baksh SM, Baksh FK, Finkelstein SD, Swalsky PA, Abernethy J, Barnes EL. Malignant Blue Nevus: A Case Report and Molecular Analysis. *The American Journal of dermatopathology*. 2003;25(1):21-7.
71. Paradela S, Fonseca E, Prieto VG. Melanoma in Children. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2011;135(3):307-16.
72. Silverberg NB, McCuaig CC. Melanoma in childhood: changing our mind-set. *Cutis*. 2013;92(5):217-8.
73. Cordoro KM, Gupta D, Frieden IJ, McCalmont T, Kashani-Sabet M. Pediatric melanoma: Results of a large cohort study and proposal for modified ABCD detection criteria for children. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2013;68(6):913-25.

74. Wong TY, Suster S, Duncan LM, Mihm MC, Jr. Nevroid melanoma: a clinicopathological study of seven cases of malignant melanoma mimicking spindle and epithelioid cell nevus and verrucous dermal nevus. *Human pathology*. 1995;26(2):171-9.
75. Bakalian S, Marshall J-C, Logan P, Faingold D, Maloney S, Di Cesare S, et al. Molecular Pathways Mediating Liver Metastasis in Patients with Uveal Melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(4):951-6.
76. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature*. 2009;457(7229):599-602.
77. Jovanovic P, Mihajlovic M, Djordjevic-Jocic J, Vlajkovic S, Cekic S, Stefanovic V. Ocular melanoma: an overview of the current status. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(7):1230-44.
78. Musi E, Ambrosini G, De Stanchina E, Schwartz GK. The Phosphoinositide 3-Kinase $\alpha$  Selective Inhibitor, BYL19, Enhances the Effect of the Protein Kinase C Inhibitor, AEB071, in GNAQ/GNA11 Mutant Uveal Melanoma Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2014.
79. Khalili JS, Yu X, Wang J, Hayes BC, Davies MA, Lizee G, et al. Combination small molecule MEK and PI3K inhibition enhances uveal melanoma cell death in a mutant GNAQ- and GNA11-dependent manner. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(16):4345-55.
80. Chattopadhyay C, Grimm EA, Woodman SE. Simultaneous Inhibition of the HGF/MET and Erk1/2 Pathways Affect Uveal Melanoma Cell Growth and Migration. *PLoS One*. 2014;9(2):e83957.
81. Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, Duan S, Cao L, Worley LA, et al. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science (New York, NY)*. 2010;330(6009):1410-3.
82. Chang AE, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer*. 1998;83(8):1664-78.
83. Meleti M, Leemans CR, de Bree R, Vescovi P, Sesenna E, van der Waal I. Head and neck mucosal melanoma: Experience with 42 patients, with emphasis on the role of postoperative radiotherapy. *Head & Neck*. 2008;30(12):1543-51.

84. Cress RD, Holly EA. Incidence of cutaneous melanoma among non-Hispanic whites, Hispanics, Asians, and blacks: an analysis of California cancer registry data, 1988-93. *Cancer causes & control : CCC*. 1997;8(2):246-52.
85. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(26):4340-6.
86. Massi G, LeBoit P. Criteria for the Diagnosis of Malignant Melanoma. *Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma*: Springer Verlag; 2004. p. 385-402.
87. Demir G. MELANOM Tanı-Tedavi-Takip: Nobel Tıp Kitabevi; 2009. 150 p.
88. Marsden JR, Newton-Bishop JA, Burrows L, Cook M, Corrie PG, Cox NH, et al. Revised U.K. guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. *British Journal of Dermatology*. 2010;163(2):238-56.
89. Scolyer RA, Thompson JF, Judge MJ, Evans A, Frishberg DP, Prieto VG, et al. Data set for pathology reporting of cutaneous invasive melanoma: Recommendations from the international collaboration on cancer reporting (ICCR). *American Journal of Surgical Pathology*. 2013;37(12):1797-814.
90. Walters RF, Groben PA, Busam K, Millikan RC, Rabinovitz H, Cognetta A, et al. Consumption of the epidermis: a criterion in the differential diagnosis of melanoma and dysplastic nevi that is associated with increasing breslow depth and ulceration. *The American Journal of dermatopathology*. 2007;29(6):527-33.
91. McCardle TW, Messina JL, Santillan AA, Zager JS. A Review of the 7th Edition of the AJCC Staging Manual With Particular Respect to Thin Melanoma, the Importance of an Expert Dermatopathological Review and Accurate Microstaging Implications. *European Journal of Clinical & Medical Oncology*. 2011;3(4):98-102.
92. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(16):3622-34.
93. In 't Hout FE, Haydu LE, Murali R, Bonenkamp JJ, Thompson JF, Scolyer RA. Prognostic importance of the extent of ulceration in patients with clinically localized cutaneous melanoma. *Annals of surgery*. 2012;255(6):1165-70.

94. Thompson JF, Soong S-J, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, et al. Prognostic Significance of Mitotic Rate in Localized Primary Cutaneous Melanoma: An Analysis of Patients in the Multi-Institutional American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging Database. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(16):2199-205.
95. Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR, 3rd. Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma. *Archives of dermatology*. 2001;137(9):1169-73.
96. Lee DS, Anderson SF, Perez EM, Townsend JC. Amelanotic choroidal nevus and melanoma: cytology, tumor size, and pigmentation as prognostic indicators. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry*. 2001;78(7):483-91.
97. Bartlett EK, Gupta M, Datta J, Gimotty PA, Guerry D, Xu X, et al. Prognosis of patients with melanoma and microsatellitosis undergoing sentinel lymph node biopsy. *Annals of surgical oncology*. 2014;21(3):1016-23.
98. Murali R, Shaw HM, Lai K, McCarthy SW, Quinn MJ, Stretch JR, et al. Prognostic factors in cutaneous desmoplastic melanoma. *Cancer*. 2010;116(17):4130-8.
99. Quinn MJ, Thompson JF, Coates AS, O'Brien CJ, McCarthy WH, Crotty KA. Desmoplastic and desmoplastic neurotropic melanoma: Experience with 280 patients. *Cancer*. 1998;83(6):1128-35.
100. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature medicine*. 2006;12(8):895-904.
101. Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D, Crothers J, Khodabakhsh D, Pulliam BL, et al. The gene expression signatures of melanoma progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(17):6092-7.
102. Vaupel P, Harrison L. Tumor Hypoxia: Causative Factors, Compensatory Mechanisms, and Cellular Response. *The Oncologist*. 2004;9(suppl 5):4-9.
103. Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Molecular cell*. 2007;25(2):207-17.
104. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Molecules and cells*. 2010;29(5):435-42.

105. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological Reviews*. 2004;56(4):549-80.
106. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in molecular medicine*. 2002;8(4 Suppl):S62-7.
107. Vaupel P. Hypoxia and aggressive tumor phenotype: implications for therapy and prognosis. *Oncologist*. 2008;13 Suppl 3:21-6.
108. Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic acids research*. 2009;37(14):4587-602.
109. Lu X, Kang Y. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Metastasis. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(24):5928-35.
110. Chowdhury R, Hardy A, Schofield CJ. The human oxygen sensing machinery and its manipulation. *Chemical Society Reviews*. 2008;37(7):1308-19.
111. Duffy JP, Eibl G, Reber HA, Hines OJ. Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Molecular cancer*. 2003;2:12-.
112. Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK. JMJD6 Is a Histone Arginine Demethylase. *Science (New York, NY)*. 2007;318(5849):444-7.
113. Hahn P, Böse J, Edler S, Lengeling A. Genomic structure and expression of Jmjd6 and evolutionary analysis in the context of related JmjC domain containing proteins. *BMC Genomics*. 2008;9(1):1-26.
114. McHugh JB, Fullen DR, Ma L, Kleer CG, Su LD. Expression of polycomb group protein EZH2 in nevi and melanoma. *Journal of cutaneous pathology*. 2007;34(8):597-600.
115. Richards HW, Medrano EE. Epigenetic marks in melanoma. *Pigment cell & melanoma research*. 2009;22(1):14-29.
116. Roesch A, Becker B, Landthaler M, Vogt T, Schneider-Brachert W, Hagen I. Re-expression of the retinoblastoma-binding protein 2-homolog 1 reveals tumor-suppressive functions in highly metastatic melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006;126(8):1850-9.
117. Feil R. Epigenetics: Ready for the marks. *Nature*. 2009;461(7262):359-60.



118. Hunter M, Bernard R, Freitas E, Boyer A, Morar B, Martins IJ, et al. Mutation screening of the N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1) in patients with Charcot-Marie-Tooth Disease. *Human Mutation*. 2003;22(2):129-35.
119. Song Y, Cao L. N-myc downstream-regulated gene 1: Diverse and complicated functions in human hepatocellular carcinoma (Review). *Oncology letters*. 2013;6(6):1539-42.
120. Kovacevic Z, Richardson DR. The metastasis suppressor, NdrG-1: a new ally in the fight against cancer. *Carcinogenesis*. 2006;27(12):2355-66.
121. Wang Z, Wang F, Wang WQ, Gao Q, Wei WL, Yang Y, et al. Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 overexpression with progressive growth of colorectal neoplasm. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2004;10(4):550-4.
122. Cangul H. Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various human cancers. *BMC genetics*. 2004;5:27.
123. Bae D-H, Jansson PJ, Huang ML, Kovacevic Z, Kalinowski D, Lee CS, et al. The role of NDRG1 in the pathology and potential treatment of human cancers. *Journal of Clinical Pathology*. 2013;66(11):911-7.
124. Hu Y, Liu J, Huang H. Recent agents targeting HIF-1 $\alpha$  for cancer therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013;114(3):498-509.
125. Rotili D, Tomassi S, Conte M, Benedetti R, Tortorici M, Ciossani G, et al. Pan-Histone Demethylase Inhibitors Simultaneously Targeting Jumonji C and Lysine-Specific Demethylases Display High Anticancer Activities. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;57(1):42-55.
126. McCarty KS, Jr., Szabo E, Flowers JL, Cox EB, Leight GS, Miller L, et al. Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. *Cancer Res*. 1986;46(8 Suppl):4244s-8s.
127. Eccles MR, He S, Ahn A, Slobbe L, Jeffs AR, Yoon H-S, et al. MITF and PAX3 play distinct roles in melanoma cell migration; outline of a "genetic switch" theory involving MITF and PAX3 in proliferative and invasive phenotypes of melanoma. *Frontiers in Oncology*. 2013;3.
128. Postovit LM, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ. Influence of the microenvironment on melanoma cell fate determination and phenotype. *Cancer Res*. 2006;66(16):7833-6.
129. Xia Y, Choi HK, Lee K. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*. 2012;49:24-40.

130. Michaylira CZ, Nakagawa H. Hypoxic microenvironment as a cradle for melanoma development and progression. *Cancer biology & therapy*. 2006;5(5):476-9.
131. Liu J, Qu R, Ogura M, Shibata T, Harada H, Hiraoka M. Real-time Imaging of Hypoxia-inducible Factor-1 Activity in Tumor Xenografts. *Journal of Radiation Research*. 2005;46(1):93-102.
132. Bedogni B, Welford SM, Cassarino DS, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, Powell MB. The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer cell*. 2005;8(6):443-54.
133. Busca R, Berra E, Gaggioli C, Khaled M, Bille K, Marchetti B, et al. Hypoxia-inducible factor 1{alpha} is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. *The Journal of cell biology*. 2005;170(1):49-59.
134. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(10):721-32.
135. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(14):7987-92.
136. Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2007;85(12):1301-7.
137. Koh SS, Wei JP, Li X, Huang RR, Doan NB, Scolyer RA, et al. Differential gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and sentinel lymph node metastases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2012;25(6):828-37.
138. Riker AI, Enkemann SA, Fodstad O, Liu S, Ren S, Morris C, et al. The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis. *BMC medical genomics*. 2008;1:13.
139. Bertucci F, Pages C, Finetti P, Rochaix P, Lamant L, Devilard E, et al. Gene expression profiling of human melanoma cell lines with distinct metastatic potential identifies new progression markers. *Anticancer research*. 2007;27(5a):3441-9.
140. Jeffs AR, Glover AC, Slobbe LJ, Wang L, He S, Hazlett JA, et al. A Gene Expression Signature of Invasive Potential in Metastatic Melanoma Cells. *PLoS ONE*. 2009;4(12):e8461.

141. Makhzami S, Rambow F, Delmas V, Larue L. Efficient gene expression profiling of laser-microdissected melanoma metastases. *Pigment cell & melanoma research*. 2012;25(6):783-91.
142. Lee YF, Miller LD, Chan XB, Black MA, Pang B, Ong CW, et al. JMJD6 is a driver of cellular proliferation and motility and a marker of poor prognosis in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2012;14(3):R85.
143. Rahman S, Sowa ME, Ottinger M, Smith JA, Shi Y, Harper JW, et al. The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3. *Molecular and cellular biology*. 2011;31(13):2641-52.
144. Maruyama Y, Ono M, Kawahara A, Yokoyama T, Basaki Y, Kage M, et al. Tumor growth suppression in pancreatic cancer by a putative metastasis suppressor gene Cap43/NDRG1/Drg-1 through modulation of angiogenesis. *Cancer Res*. 2006;66(12):6233-42.
145. Cangul H, Salnikow K, Yee H, Zagzag D, Commes T, Costa M. Enhanced overexpression of an HIF-1/hypoxia-related protein in cancer cells. *Environmental health perspectives*. 2002;110 Suppl 5:783-8.
146. Bandyopadhyay S, Wang Y, Zhan R, Pai SK, Watabe M, Iizumi M, et al. The tumor metastasis suppressor gene Drg-1 down-regulates the expression of activating transcription factor 3 in prostate cancer. *Cancer Res*. 2006;66(24):11983-90.
147. Guan RJ, Ford HL, Fu Y, Li Y, Shaw LM, Pardee AB. Drg-1 as a differentiation-related, putative metastatic suppressor gene in human colon cancer. *Cancer Res*. 2000;60(3):749-55.
148. Gerhard R, Nonogaki S, Fregnani JH, Soares FA, Nagai MA. NDRG1 protein overexpression in malignant thyroid neoplasms. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*. 2010;65(8):757-62.
149. Bandyopadhyay S, Pai SK, Hirota S, Hosobe S, Takano Y, Saito K, et al. Role of the putative tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in breast cancer progression. *Oncogene*. 2004;23(33):5675-81.
150. Cowden Dahl KD, Robertson SE, Weaver VM, Simon MC. Hypoxia-inducible Factor Regulates  $\alpha\beta 3$  Integrin Cell Surface Expression. *Molecular Biology of the Cell*. 2005;16(4):1901-12.
151. Yang MH, Wu KJ. TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development. *Cell Cycle*. 2008;7(14):2090-6.

152. Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* 2003;63(5):1138-43.
153. Tan GJ, Peng ZK, Lu JP, Tang FQ. Cathepsins mediate tumor metastasis. *World journal of biological chemistry.* 2013;4(4):91-101.
154. Kozlowski L, Wojtukiewicz MZ, Ostrowska H. Cathepsin A activity in primary and metastatic human melanocytic tumors. *Arch Dermatol Res.* 2000;292(2-3):68-71.
155. Izraely S, Sagi-Assif O, Klein A, Meshel T, Tsarfaty G, Pasmanik-Chor M, et al. The metastatic microenvironment: brain-residing melanoma metastasis and dormant micrometastasis. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2012;131(5):1071-82.
156. Zhang H, Wong CC, Wei H, Gilkes DM, Korangath P, Chaturvedi P, et al. HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. *Oncogene.* 2012;31(14):1757-70.
157. Pan Y, Claret FX. Targeting Jab1/CSN5 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer letters.* 2012;326(2):155-60.
158. Ivan D, Diwan AH, Esteva FJ, Prieto VG. Expression of cell cycle inhibitor p27Kip1 and its inactivator Jab1 in melanocytic lesions. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2004;17(7):811-8.
159. Shintani S, Li C, Mihara M, Hino S, Nakashiro K, Hamakawa H. Skp2 and Jab1 Expression Are Associated with Inverse Expression of p27<sup>KIP1</sup> and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinomas. *Oncology.* 2003;65(4):355-62.
160. Zhao Y, Gou W-F, Chen S, Takano Y, Xiu Y-L, Zheng H-C. BTG1 Expression Correlates with the Pathogenesis and Progression of Ovarian Carcinomas. *International Journal of Molecular Sciences.* 2013;14(10):19670-80.
161. Chen Q, Watson JT, Marengo SR, Decker KS, Coleman I, Nelson PS, et al. Gene expression in the LNCaP human prostate cancer progression model: progression associated expression in vitro corresponds to expression changes associated with prostate cancer progression in vivo. *Cancer letters.* 2006;244(2):274-88.
162. Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, et al. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney international.* 1997;51(2):553-5.

163. Chilov D, Camenisch G, Kvietikova I, Ziegler U, Gassmann M, Wenger RH. Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1 $\alpha$ . *Journal of cell science*. 1999;112 ( Pt 8):1203-12.
164. Pescador N, Villar D, Cifuentes D, Garcia-Rocha M, Ortiz-Barahona A, Vazquez S, et al. Hypoxia Promotes Glycogen Accumulation through Hypoxia Inducible Factor (HIF)-Mediated Induction of Glycogen Synthase 1. *PLoS ONE*. 2010;5(3):e9644.
165. Zhao J, Chen H, Davidson T, Kluz T, Zhang Q, Costa M. Nickel-induced 1,4-alpha-glucan branching enzyme 1 up-regulation via the hypoxic signaling pathway. *Toxicology and applied pharmacology*. 2004;196(3):404-9.
166. Choi SM, Oh H, Park H. Microarray analyses of hypoxia-regulated genes in an aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt)-dependent manner. *The FEBS journal*. 2008;275(22):5618-34.
167. Mendez O, Zavadil J, Esencay M, Lukyanov Y, Santovasi D, Wang SC, et al. Knock down of HIF-1 $\alpha$  in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres. *Molecular cancer*. 2010;9:133.
168. Buffa FM, Harris AL, West CM, Miller CJ. Large meta-analysis of multiple cancers reveals a common, compact and highly prognostic hypoxia metagene. *British journal of cancer*. 2010;102(2):428-35.
169. Sibold S, Roh V, Keogh A, Studer P, Tiffon C, Angst E, et al. Hypoxia increases cytoplasmic expression of NDRG1, but is insufficient for its membrane localization in human hepatocellular carcinoma. *FEBS letters*. 2007;581(5):989-94.
170. Wellmann S, Bettkober M, Zelmer A, Seeger K, Faigle M, Eltzhig HK, et al. Hypoxia upregulates the histone demethylase JMJD1A via HIF-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;372(4):892-7.
171. Beyer S, Kristensen MM, Jensen KS, Johansen JV, Staller P. The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(52):36542-52.
172. Lange CA, Luhmann UF, Mowat FM, Georgiadis A, West EL, Abrahams S, et al. Von Hippel-Lindau protein in the RPE is essential for normal ocular growth and vascular development. *Development (Cambridge, England)*. 2012;139(13):2340-50.

173. Masuda K, Ono M, Okamoto M, Morikawa W, Otsubo M, Migita T, et al. Downregulation of Cap43 gene by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein in human renal cancer cells. *International Journal of Cancer*. 2003;105(6):803-10.
174. Scholes AGM, Liloglou T, Maloney P, Hagan S, Nunn J, Hiscott P, et al. Loss of Heterozygosity on Chromosomes 3, 9, 13, and 17, Including the Retinoblastoma Locus, in Uveal Melanoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2001;42(11):2472-7.
175. Webby CJ, Wolf A, Gromak N, Dreger M, Kramer H, Kessler B, et al. Jmjd6 catalyses lysyl-hydroxylation of U2AF65, a protein associated with RNA splicing. *Science (New York, NY)*. 2009;325(5936):90-3.



## EKLER

Ek1: Arşiv olgularının klinik ve histopatolojik özellikleri

Sayı	Cinsiyet	Yaş	Yerleşim	Tanı	Evre	TNM
1	K	19	Sağ İnfracorbital	İntradermal Nevüs		
2	K	48	Sol Mentum	İntradermal Nevüs		
3	K	22	Sol Mentum	İntradermal Nevüs		
4	K	33	Üst Dudak	İntradermal Nevüs		
5	K	51	Sağ Nazolabial Sulkus	İntradermal Nevüs		
6	K	23	Üst Dudak	İntradermal Nevüs		
7	K	43	Burun	İntradermal Nevüs		
8	E	33	Sağ Malar	İntradermal Nevüs		
9	K	43	Sağ Malar	İntradermal Nevüs		
10	K	28	Sol Mentum	İntradermal Nevüs		
11	E	63	Sol Ayak	Primer	II	
12	K	64	Sol Bacak	Primer	II	
13	E	61	Sol Dış Kulak Yolu	Primer	II	
14	K	56	Sağ Malar	Primer	I	T1aNxMx
15	E	43	Sol Ayak Tabanı	Primer	II	T4bNxMx
16	K	50	Sağ El Dorsumu	Primer	0	TisNxMx
17	E	53	Sol Omuz	Primer	1	T1NxMx
18	K	86	Dudak Üstü	Primer	II	T4NxMx
19	E	50	Parmak Amputasyon	Primer	1	T1NxMx
20	K	41	Sağ Ayak	Primer	II	T3NxMx
21	E	82	Sol Nazal Kavite	Primer		
22	K	76	Vagina	Primer		
23	E	48	Göz	Primer	IIIc	T4eNxMx
24	E	67	Sağ Uyluk	Metastaz		
25	K	54	Parotis Yüzeyel	Metastaz		
26	K	88	Sol Bacak	Metastaz		

**Ek2: Doku array olgularının klinik ve histopatolojik özellikleri**

Sayı	Cinsiyet	Yaş	Yerleşim	Tanı	Evre	TNM
1	E	40	Göğüs	Primer	II	T4N0M0
2	E	50	Özefagus	Primer	-	-
3	E	64	Özefagus	Primer	-	-
4	E	71	İnce barsak	Primer	-	-
5	K	70	Parotis glandı	Primer	-	-
6	K	38	Rektum	Primer	-	-
7	K	67	Rektum	Primer	-	-
8	K	70	Rektum	Primer	-	-
9	E	66	Rektum	Primer	-	-
10	K	54	Rektum	Primer	-	-
11	K	82	Rektum	Primer	-	-
12	K	52	Rektum	Primer	-	-
13	K	72	Rektum	Primer	-	-
14	K	69	Rektum	Primer	-	-
15	E	57	Rektum	Primer	-	-
16	K	52	Rektum	Primer	-	-
17	K	42	Rektum	Primer	-	-
18	E	47	Rektum	Primer	-	-
19	E	75	Rektum	Primer	-	-
20	E	67	Rektum	Primer	-	-
21	K	66	Rektum	Primer	-	-
22	E	55	Mide	Primer	-	-
23	E	55	Mide	Primer	-	-
24	K	44	Serviks	Primer	IIA	T2N0M0
25	K	57	Vulva	Primer	II	T4N0M0
26	K	45	Vulva	Primer	II	T4N0M0
27	K	72	Vulva	Primer	I	T1N0M0
28	K	15	Klitoris	Primer	II	T4N0M0
29	K	34	Vulva	Primer	II	T4N0M0



30	K	62	Vagina	Primer	II	T4N0M0
31	K	41	Vulva	Primer	II	T4N0M0
32	K	38	Vulva	Primer	II	T4N0M0
33	K	79	Vulva	Primer	III	T4N1M0
34	K	44	Vulva	Primer	II	T4N0M0
35	K	62	Deri	Primer	II	T4N0M0
36	K	46	Deri	Primer	II	T4N0M0
37	E	66	Deri	Primer	II	T4N0M0
38	E	62	Deri	Primer	II	T4N0M0
39	K	66	Deri	Primer	II	T4N0M0
40	E	56	Deri	Primer	II	T4N0M0
41	E	61	Deri	Primer	II	T4N0M0
42	E	52	Deri	Primer	II	T3N0M0
43	K	47	Deri	Primer	II	T2N0M0
44	E	57	Deri	Primer	II	T4N0M0
45	E	64	Deri	Primer	II	T2N0M0
46	E	53	Deri	Primer	II	T4N0M0
47	K	59	Deri	Primer	II	T4N0M0
48	E	48	Deri	Primer	II	T3N0M0
49	E	65	Deri	Primer	II	T4N0M0
50	E	75	Deri	Primer	II	T2N0M0
51	K	53	Deri	Primer	II	T4N0M0
52	E	79	Deri	Primer	II	T4N0M0
53	E	70	Deri	Primer	II	T4N0M0
54	E	65	Deri	Primer	II	T4N0M0
55	E	76	Deri	Primer	III	T4N1M0
56	K	54	Deri	Primer	II	T4N0M0
57	E	62	Deri	Primer	II	T2N0M0
58	E	55	Deri	Primer	II	T4N0M0
59	E	74	Deri	Primer	II	T4N0M0
60	E	65	Deri	Primer	II	T2N0M0

61	E	31	Deri	Primer	II	T4N0M0
62	K	41	Deri	Primer	II	T4N0M0
63	E	74	Deri	Primer	II	T4N0M0
64	K	16	Deri	Primer	II	T4N0M0
65	E	27	Deri	Primer	III	T3N1M0
66	K	63	Deri	Primer	II	T4N0M0
67	E	51	Deri	Primer	II	T4N0M0
68	K	80	Deri	Primer	III	T4N1M0
69	E	55	Deri	Primer	II	T4N0M0
70	E	52	Deri	Primer	II	T3N0M0
71	E	60	Deri	Primer	III	T4N1M0
72	E	40	Deri	Primer	II	T4N0M0
73	K	77	Deri	Primer	II	T4N0M0
74	K	56	Deri	Primer	II	T3N0M0
75	E	42	Deri	Primer	II	T2N0M0
76	E	51	Deri	Primer	II	T4N0M0
77	E	55	Deri	Primer	II	T4N0M0
78	E	61	Deri	Primer	IV	T4bN0M1
79	E	78	Deri	Primer	II	T4bN0M0
80	K	46	Deri	Primer	II	T4N0M0
81	E	80	Deri	Primer	II	T4N0M0
82	K	74	Deri	Primer	II	T2N0M0
83	E	41	Deri	Primer	II	T3N0M0
84	E	57	Deri	Primer	II	T3N0M0
85	E	51	Deri	Primer	II	T4N0M0
86	E	51	Deri	Primer	III	T4N1M0
87	E	52	Deri	Primer	II	T4N0M0
88	K	52	Deri	Primer	II	T3N0M0
89	E	61	Deri	Primer	III	T4N2M0
90	K	61	Deri	Primer	II	T4N0M0
91	K	59	Deri	Primer	II	T4N0M0

92	E	49	Deri	Primer	III	T4N2M0
93	E	40	Deri	Primer	II	T4N0M0
94	E	45	Deri	Primer	II	T3aN0M0
95	E	46	Skrotum	Primer	–	–
96	E	55	Skrotum	Primer	–	–
97	E	78	Burun	Primer	–	–
98	E	50	Burun	Primer	–	–
99	K	40	Burun	Primer	–	–
100	K	38	Burun	Primer	–	–
101	K	65	Burun	Primer	–	–
102	E	63	Burun	Primer	–	–
103	E	56	Burun	Primer	–	–
104	K	43	Fibröz Doku	Primer	II	T4N0M0
105	K	46	Yağ Dokusu	Primer	II	T4N0M0
106	K	42	Deri	Primer	II	T4N0M0
107	K	58	Deri	Primer	II	T4N0M0
108	K	88	Deri	Primer	II	T4N0M0
109	E	7	Çizgili Kas	Primer	II	T4N0M0
110	E	50	Çizgili Kas	Primer	II	T4N0M0
111	E	71	Fibröz Doku	Primer	II	T4N0M0
112	K	45	Fibröz Doku	Primer	II	T2N0M0
113	E	49	Yumuşak Doku	Primer	II	T4N0M0
114	K	42	Yumuşak Doku	Primer	II	T4N0M0
115	K	67	Yumuşak Doku	Primer	–	–
116	K	45	Göz	Primer	II	T2N0M0
117	K	46	Göz	Primer	III	T4N0M0
118	K	49	Göz	Primer	II	T2N0M0
119	E	52	Göz	Primer	II	T2N0M0
120	E	44	Orbita	Primer	III	T4N0M0
121	E	57	Göz	Primer	III	T4N0M0
122	K	35	Göz	Primer	II	T2N0M0

123	K	62	Göz	Primer	II	T2N0M0
124	E	67	Göz	Primer	II	T2N0M0
125	K	76	Göz	Primer	III	T4N0M0
126	E	41	Göz	Primer	II	T2N0M0
127	K	37	Göz	Primer	II	T2N0M0
128	E	57	Göz	Primer	II	T2N0M0
129	E	71	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
130	E	46	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
131	E	44	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
132	E	65	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
133	E	38	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
134	E	55	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
135	K	40	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
136	E	70	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
137	E	68	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
138	K	41	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
139	E	65	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
140	K	61	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
141	K	42	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
142	K	43	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
143	K	56	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
144	K	56	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
145	K	49	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
146	E	49	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
147	E	45	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
148	K	60	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
149	K	43	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
150	K	29	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
151	K	31	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
152	K	68	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
153	K	63	Lenf Nodu	Metastaz	–	–

154	K	61	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
155	E	68	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
156	E	40	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
157	E	52	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
158	K	53	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
159	K	68	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
160	E	62	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
161	E	55	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
162	K	58	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
163	K	38	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
164	E	49	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
165	K	46	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
166	K	60	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
167	E	50	Parotis glandı	Metastaz	-	-
168	K	47	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
169	E	38	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
170	K	45	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
171	K	41	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
172	K	38	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
173	E	58	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
174	E	50	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
175	K	52	Dalak	Metastaz	-	-
176	K	45	Dalak	Metastaz	-	-
177	E	39	Kemik	Metastaz	-	-
178	E	62	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
179	K	55	Beyin	Metastaz	-	-
180	E	63	Yumuşak Doku	Metastaz	-	-
181	E	48	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
182	K	55	Lenf Nodu	Metastaz	-	-
183	E	49	Pelvik Kavite	Metastaz	-	-
184	E	72	Lenf Nodu	Metastaz	-	-

185	E	62	Yumuşak Doku	Metastaz	–	–
186	K	35	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
187	K	61	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
188	K	80	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
189	E	56	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
190	K	72	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
191	K	41	Lenf Nodu	Metastaz	–	–
192	E	62	Lenf Nodu	Metastaz	–	–



**EK3: Çalışılan gen profili**

Sıra no	Unigen	Gen Bankası	Sembol	Açıklama	İsim
1	Hs.441047	NM_001124	ADM	Adrenomedullin	AM
2	Hs.320151	NM_006412	AGPAT2	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (lysophosphatidic acid acyltransferase, beta)	1-AGPAT2, BSCL, BSCL1, LPAAB, LPAAT-beta
3	Hs.494321	NM_015239	AGTPBP1	ATP/GTP binding protein 1	DKFZp686M20191, KIAA1035, NNA1
4	Hs.9613	NM_001039667	ANGPTL4	Angiopoietin-like 4	ANGPTL2, ARP4, FIAF, HFARP, NL2, PGAR, pp1158
5	Hs.433291	NM_003491	NAA10	N(alpha)-acetyltransferase 10, NatA catalytic subunit	ARD1, ARD1A, DXS707, MGC71248, TE2
6	Hs.459070	NM_014862	ARNT2	Aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	KIAA0307, bHLHe1
7	Hs.624291	NM_004324	BAX	BCL2-associated X protein	BCL2L4
8	Hs.728782	NM_003670	BHLHE40	Basic helix-loop-helix family, member e40	BHLHB2, DEC1, FLJ99214, HLHB2, SHARP-2, STRA13, Stra14
9	Hs.728893	NM_001168	BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5	API4, EPR-1
10	Hs.23118	NM_001738	CA1	Carbonic anhydrase I	CA-I, CAB, Car1
11	Hs.2490	NM_033292	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	ICE, IL1BC, P45
12	Hs.502302	NM_001752	CAT	Catalase	MGC138422, MGC138424
13	Hs.690198	NM_001791	CDC42	Cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	CDC42Hs, G25K
14	Hs.150793	NM_001275	CHGA	Chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)	CGA
15	Hs.172928	NM_000088	COL1A1	Collagen, type I, alpha 1	OI4
16	Hs.459759	NM_004380	CREBBP	CREB binding protein	CBP, KAT3A, RSTS
17	Hs.695	NM_000100	CSTB	Cystatin B (stefin B)	CST6, EPM1, PME, STFB
18	Hs.95120	NM_134268	CYGB	Cytoglobin	HGB, STAP
19	Hs.631844	NM_001348	DAPK3	Death-associated protein kinase 3	FLJ36473, ZIP, ZIPK
20	Hs.289123	NM_006400	DCTN2	Dynactin 2 (p50)	DCTN50, DYNAMITIN, RBP50
21	Hs.348418	NM_001938	DR1	Down-regulator of transcription 1, TBP-binding (negative cofactor 2)	NC2, NC2-BETA
22	Hs.195080	NM_001397	ECE1	Endothelin converting enzyme 1	ECE
23	Hs.520703	NM_001402	EEF1A1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	CCS-3, CCS3, EE1A1, EEF-1, EEF1A, EF-Tu, EF1A, FLJ25721, GRAF-1EF, HNGC:16303, LENG7, MGC102687, MGC131894,

					MGC16224, PTI1, eEF1A-1
24	Hs.517145	NM_001428	ENO1	Enolase 1, (alpha)	ENO1L1, MPB1, NNE, PPH
25	Hs.517517	NM_001429	EP300	E1A binding protein p300	KAT3B, RSTS2, p300
26	Hs.468410	NM_001430	EPAS1	Endothelial PAS domain protein 1	ECYT4, HIF2A, HLF, MOP2, PASD2, bHLHe73
27	Hs.2303	NM_000799	EPO	Erythropoietin	EP, MGC138142, MVCD2
28	Hs.643580	NM_017892	PRPF40A	PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A (S. cerevisiae)	FBP-11, FBP11, FLAF1, FLJ20585, FNBP3, HIP-10, HIP10, HYP A, NY-REN-6, Prp40
29	Hs.654784	NM_002067	GNA11	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)	GNA-11
30	Hs.466471	NM_000175	GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	AMF, DKFZp686C13233, GNPI, NLK, PGI, PHI, SA-36, SA36
31	Hs.76686	NM_000581	GPX1	Glutathione peroxidase 1	GSHPX1, MGC14399, MGC88245
32	Hs.523443	NM_000518	HBB	Hemoglobin, beta	CD113t-C, beta-globin
33	Hs.597216	NM_001530	HIF1A	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	HIF-1alpha, HIF1, HIF1-ALPHA, MOP1, PASD8, bHLHe78
34	Hs.500788	NM_017902	HIF1AN	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit inhibitor	DKFZp762F1811, FIH1, FLJ20615, FLJ22027
35	Hs.420830	NM_152794	HIF3A	Hypoxia inducible factor 3, alpha subunit	HIF-3A, IPAS, MOP7, PASD7, bHLHe17
36	Hs.406266	NM_000189	HK2	Hexokinase 2	DKFZp686M1669, HKII, HXK2
37	Hs.517581	NM_002133	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1	HO-1, HSP32, bK286B10
38	Hs.528299	NM_006388	KAT5	K(lysine) acetyltransferase 5	ESA1, HTATIP, HTATIP1, PLIP, TIP, TIP60, cPLA2
39	Hs.277704	NM_006389	HYOU1	Hypoxia up-regulated 1	DKFZp686N08236, FLJ94899, FLJ97572, Grp170, HSP12A, ORP150
40	Hs.523414	NM_000612	IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	C11orf43, FLJ22066, FLJ44734, IGF-II, PP9974
41	Hs.642938	NM_000596	IGFBP1	Insulin-like growth factor binding protein 1	AFBP, IBP1, IGF-BP25, PP12, hIGFBP-1
42	Hs.1722	NM_000575	IL1A	Interleukin 1, alpha	IL-1A, IL1, IL1-ALPHA, IL1F1
43	Hs.654458	NM_000600	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	BSF2, HGF, HSF, IFNB2, IL-6
44	Hs.532082	NM_002184	IL6ST	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	CD130, CDW130, DKFZp564F053, GP130, IL-6RB
45	Hs.430551	NM_003870	IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	HUMORFA01, KIAA0051, SAR1, p195
46	Hs.708128	NM_003685	KHSRP	KH-type splicing regulatory	FBP2, FUBP2, KSRP,



				protein	MGC99676
47	Hs.479754	NM_000222	KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	C-Kit, CD117, PBT, SCFR
48	Hs.551506	NM_002299	LCT	Lactase	LAC, LPH, LPH1
49	Hs.194236	NM_000230	LEP	Leptin	FLJ94114, OB, OBS
50	Hs.356769	NM_000528	MAN2B1	Mannosidase, alpha, class 2B, member 1	LAMAN, MANB
51	Hs.159410	NM_014484	MOCS3	Molybdenum cofactor synthesis 3	MGC9252, UBA4, dJ914P20.3
52	Hs.73133	NM_005954	MT3	Metallothionein 3	GIF, GIFB, GRIF
53	Hs.179718	NM_002466	MYBL2	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	B-MYB, BMYB, MGC15600
54	Hs.709191	NM_000625	NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible	HEP-NOS, INOS, NOS, NOS2A
55	Hs.495473	NM_017617	NOTCH1	Notch 1	TAN1, hN1
56	Hs.1832	NM_000905	NPY	Neuropeptide Y	PYY4
57	Hs.493767	NM_001161	NUDT2	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 2	APAH1, MGC10404
58	Hs.66581	NM_006849	PDIA2	Protein disulfide isomerase family A, member 2	PDA2, PDI, PDIP, PDIR
59	Hs.517216	NM_003768	PEA15	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15	HMAT1, HUMMAT1H, MAT1, MAT1H, PEA-15, PED
60	Hs.146100	NM_015553	IPCEF1	Interaction protein for cytohesin exchange factors 1	KIAA0403, PIP3-E, RP3-402L9.2
61	Hs.77274	NM_002658	PLAU	Plasminogen activator, urokinase	ATF, UPA, URK, u-PA
62	Hs.153357	NM_001084	PLOD3	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	LH3
63	Hs.103110	NM_005036	PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	MGC2237, MGC2452, NR1C1, PPAR, PPARalpha, hPPAR
64	Hs.491440	NM_001009552	PPP2CB	Protein phosphatase 2, catalytic subunit, beta isozyeme	PP2Abeta, PP2CB
65	Hs.43322	NM_006251	PRKAA1	Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit	AMPK, AMPKa1, MGC33776, MGC57364
66	Hs.82793	NM_002795	PSMB3	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3	HC10-II, MGC4147
67	Hs.591286	NM_002852	PTX3	Pentraxin 3, long	TNFAIP5, TSG-14
68	Hs.654583	NM_000964	RARA	Retinoic acid receptor, alpha	NR1B1, RAR
69	Hs.652114	NM_000991	RPL28	Ribosomal protein L28	FLJ43307, L28

<b>70</b>	Hs.265174	NM_000994	RPL32	Ribosomal protein L32	L32
<b>71</b>	Hs.498569	NM_002952	RPS2	Ribosomal protein S2	LLREP3, MGC102851, MGC117344, MGC117345, S2
<b>72</b>	Hs.546287	NM_001011	RPS7	Ribosomal protein S7	DBA8, S7
<b>73</b>	Hs.515500	NM_005500	SAE1	SUMO1 activating enzyme subunit 1	AOS1, FLJ3091, HSPC140, SUA1, UBLE1A
<b>74</b>	Hs.473721	NM_006516	SLC2A1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	DYT17, DYT18, GLUT, GLUT1, GLUT1DS, MGC141895, MGC141896, PED
<b>75</b>	Hs.380691	NM_001042	SLC2A4	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	GLUT4
<b>76</b>	Hs.467097	NM_003089	SNRNP70	Small nuclear ribonucleoprotein 70kDa (U1)	RNPU1Z, RPU1, SNRNP70, Snp1, U1-70K, U170K, U1AP, U1RNP
<b>77</b>	Hs.503178	NM_003128	SPTBN1	Spectrin, beta, non-erythrocytic 1	ELF, SPTB2, betaSpII
<b>78</b>	Hs.25723	NM_006396	SSSCA1	Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1	p27
<b>79</b>	Hs.380973	NM_006937	SUMO2	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2 ( <i>S. cerevisiae</i> )	HSMT3, MGC117191, SMT3B, SMT3H2, SUMO3, Smt3A
<b>80</b>	Hs.435609	NM_000360	TH	Tyrosine hydroxylase	DYT14, DYT5b, TYH
<b>81</b>	Hs.474783	NM_003312	TST	Thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)	MGC19578, RDS
<b>82</b>	Hs.75318	NM_006000	TUBA4A	Tubulin, alpha 4a	FLJ30169, H2-ALPHA, TUBA1
<b>83</b>	Hs.80658	NM_003355	UCP2	Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	BMIQ4, SLC25A8, UCPH
<b>84</b>	Hs.73793	NM_003376	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	MGC70609, MVCD1, VEGF, VPF



Verilerin olduğu MS Excel .xls uzantılı dosyanın yüklenmesi

The screenshot shows the RT² Profiler PCR Array Data Analysis web portal. The browser address bar displays the URL: <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pci/>. The page title is "RT² Profiler PCR Array Data ...".

On the left, there is a section titled "New to RT² Data Analysis? Learn more by:" with links to "Taking a test run", "Playing a movie guide (Flash)", and "Attending a webinar". Below this is a "Notes:" section with three numbered instructions:

- Please note that you must complete all of your work with the PCR Array Data Analysis Web Portal in the same session. Your data is not stored on a server, so all work is lost once the session (or your web browser) is closed. Be sure to export all processed data and results to an Excel file saved on your local computer.
- Please set your screen resolution to 1024 X 768 or greater, if possible.
- Turn off any window pop-up blockers. The software will launch separate windows for viewing the plots and charts.

In the center, there is a "Select Cataloged PCR Array:" dropdown menu set to "PAHS-032Z". Below it, there are three radio button options: "Standard RT² PCR Array" (selected), "Custom RT² PCR Array", and "Single or Multi-Gene qPCR Assays".

On the right, there is a "Note:" explaining the upgrade to Version 4.0 and the format of the PCR Array numbers. Below the note, there is a "File:" input field containing the path "E:\EnvePCR data\Dahipoksiarayc" and an "Upload" button. A warning message states: "File must be a MS Excel Sheet (in .XLS format, not .XLSX)."

At the bottom, there are links for "Excel Templates for Formatting your Experimental Data:" including "Cataloged PCR Array", "Custom PCR Array", and "Single/Multi-Gene Assays".

Grupların seçilip güncellenmesi

The screenshot shows the RT² Profiler PCR Array Data Analysis web portal, version 3.5. The browser address bar displays the URL: <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pci/>. The page title is "RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5".

The navigation menu includes "Upload data", "Analysis setup", "Analysis", "Plots & charts", "Export data", and "What's next". The "Analysis" menu is expanded, showing "Basic Setup", "Data QC", "Select Housekeeping Genes", and "Data Overview".

The "Data Overview" section shows a table with columns for "Position", "Gene Symbol", "Control Gene", "ortalama primer", and "ortalama metas". The "ortalama primer" column has a dropdown menu with options: "Group 1", "Control Group", "Group 1", and "Exclude Sample".

Position	Gene Symbol	Control Gene	ortalama primer	ortalama metas
A01	ADM	<input type="checkbox"/>	Group 1	19.47
A02	ADORA2B	<input type="checkbox"/>	Group 1	25.27
A03	ALDOA	<input type="checkbox"/>	Group 1	22.11
A04	ANGPTL4	<input type="checkbox"/>	Group 1	22.79
A05	ANKRD37	<input type="checkbox"/>	Group 1	17.89
A06	ANXA2	<input type="checkbox"/>	Group 1	20.05
A07	APEX1	<input type="checkbox"/>	Group 1	19.59
A08	ARNT	<input type="checkbox"/>	Group 1	18.34
A09	ATR	<input type="checkbox"/>	Group 1	22.36
A10	BHLHE40	<input type="checkbox"/>	Group 1	29.78
A11	BLM	<input type="checkbox"/>	Group 1	20.57
A12	BNIP3	<input type="checkbox"/>	Group 1	20.79
B01	BNIP3L	<input type="checkbox"/>	Group 1	17.74
B02	BTG1	<input type="checkbox"/>	Group 1	30.69

Gruplardaki kullanılan cDNA sentez kitinin ve Rotor-Gene Q cihazında yapılmışsa ikinci seçeneğin seçilmesi ve güncellenmesi

**RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5**

Basic Setup **Data QC** Select Housekeeping Genes Data Overview

Select Group: Control Group

Standard RT<sup>2</sup> cDNA Synthesis Kit used

Standard RT<sup>2</sup> cDNA Synthesis Kit used with RT<sup>2</sup> Arrays Performed on Rotor-Gene Q

RT<sup>2</sup> PreAMP cDNA Synthesis Kit used with fresh/frozen samples\*

RT<sup>2</sup> PreAMP cDNA Synthesis Kit used with fixed samples (FFPE)\*

\*Note: The respective RT<sup>2</sup> PreAMP PreAMP cDNA Synthesis Kit analysis settings also apply when the PreAMP kits are used with RT<sup>2</sup> Arrays performed on Rotor-Gene Q.

**Quality Checks Performed**

Test Performed	ortalama primer
1. PCR Array Reproducibility	Inquiry
2. RT Efficiency	Pass
3. Genomic DNA Contamination	Pass

- Remember to check each experimental group
- If 'Inquiry' is displayed then see the Troubleshooting Guide of the PCR Array User Manual/Handbook or Contact Technical Support at 888-503-3187.

“Housekeeping” genlerinin seçilip normalizasyonun gerçekleştirilmesi (Rotor-Gene Q cihazında çalışılmışsa cut-off Ct değeri 33 olarak seçilir.)

Basic Setup Data QC **Select Housekeeping Genes** Data Overview

Methods Available for Housekeeping/Internal Control/ Normalization Gene Selection

Choose your preferred method of analysis: Automatic Selection from Full Plate

Automatic Selection from Full Plate

This method automatically selects an optimal set of internal control / housekeeping / normalization genes for the analysis from the full plate on the PCR Array. The software measures and identifies the genes with the most stable expression via a non-normalized calculation. The  $C_t$  values for these genes are then geometrically averaged and used for the  $\Delta\Delta C_t$  calculations.

Position	Gene Symbol	Control Group	Group 1
		ortalama primer	ortalama metas
A10	BHLHE40	29.80	29.7
D09	LGALS3	18.45	18.3
D10	LOX	20.84	20.8
E02	MMP9	18.80	18.8
F06	PGAM1	17.64	17.6
H05	RPLP0	12.33	12.3
	<b>Geometric Mean</b>	18.99	19.0
	<b>Avg. of Geometric Mean</b>	18.99	19.

Set Ct Cut-off\*: 35

## Analiz aşaması

RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5

Upload data | Analysis setup | Analysis | Plots & charts | Export data | What's next

Position	Gene Symbol	AVG $\Delta C_t$		$2^{-\Delta C_t}$		Fold Change		p-value	Fold Up- or Down-Regulation
		Group 1	Control Group	Group 1	Control Group	Group 1/Control	Comments	P Value	Group 1
A01	ADM	-0.36	0.48	1.279648	0.716147	1.79	OKAY	N/A	1.79
A02	ADORA2B	6.27	4.40	0.012920	0.047476	0.27	OKAY	N/A	-3.67
A03	ALDOA	3.11	2.23	0.115483	0.213651	0.54	OKAY	N/A	-1.85
A04	ANGPTL4	3.79	7.20	0.072080	0.006817	10.57	OKAY	N/A	10.57
A05	ANKRD37	-1.11	-0.99	2.152102	1.990772	1.08	OKAY	N/A	1.08
A06	ANXA2	1.05	4.25	0.481546	0.052677	9.14	OKAY	N/A	9.14
A07	APEX1	0.59	-0.12	0.662387	1.089245	0.61	OKAY	N/A	-1.64
A08	ARNT	-0.66	2.48	1.580901	0.179658	8.80	OKAY	N/A	8.80
A09	ATR	3.36	3.49	0.097446	0.089209	1.09	OKAY	N/A	1.09
A10	BHLHE40	10.78	10.82	0.000567	0.000554	1.02	OKAY	N/A	1.02
A11	BLM	1.57	3.32	0.336983	0.100365	3.36	OKAY	N/A	3.36
A12	BNIP3	1.79	1.61	0.289322	0.327219	0.88	OKAY	N/A	-1.13
B01	BNIP3L	-1.26	-1.47	2.387907	2.767011	0.86	OKAY	N/A	-1.16
B02	BTG1	11.69	9.50	0.000302	0.001384	0.22	A	N/A	-4.59
B03	CA9	11.84	8.67	0.000272	0.002452	0.11	A	N/A	-9.02
B04	CCNG2	5.08	4.74	0.029477	0.037378	0.79	OKAY	N/A	-1.27
B05	COP55	-2.66	-0.90	6.301724	1.863905	3.38	OKAY	N/A	3.38
B06	CTSA	1.01	4.42	0.496803	0.046822	10.61	OKAY	N/A	10.61
B07	DDIT4	2.40	1.98	0.188907	0.253196	0.75	OKAY	N/A	-1.34
B08	DNAJC5	0.67	0.12	0.628832	0.919122	0.68	OKAY	N/A	-1.46
B09	EDN1	1.45	1.19	0.366211	0.437795	0.84	OKAY	N/A	-1.20
B10	FRN1	4.07	1.15	0.059365	0.451666	0.13	OKAY	N/A	-7.61

## Analizin Grafiksel Görünümü


RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5

Upload data | Analysis setup | Analysis | Plots & charts | Export data | What's next

Select a Plot or Chart Icon below to launch a separate window.

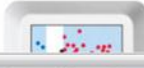
**Notes:**

- Before launching a plot or chart, please upload your readout data or take a test run.
- Please disable any Pop-Up Window Blockers in your web browser.
- To save the figure:
  - Using Windows: Right-click on the figure and save the image/picture
  - Using OS X: Hold down the Control key & Click and save the image/picture




**Scatter Plot**

The scatter plot compares the normalized expression of every gene on the array between two groups by plotting them against one another to quickly visualize large gene expression changes. The central line indicates unchanged gene expression. Set the boundary (fold regulation cut-off) and the experimental groups to compare. Then, export the lists of genes whose expression changes are greater than the selected boundary.



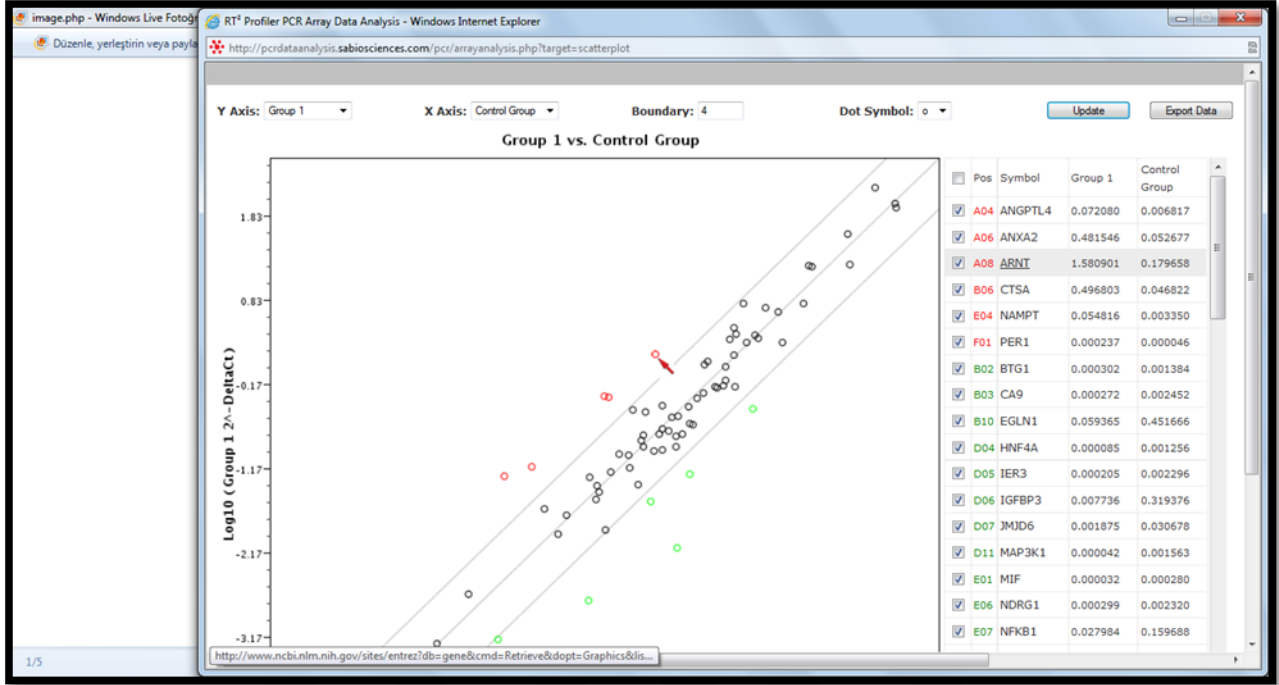
The volcano plot helps quickly identify significant gene expression changes. The volcano plot displays statistical significance versus fold-change on the y- and x-axes, respectively. The volcano plot combines a p-value statistical test with the fold regulation change enabling



The clustergram performs non-supervised hierarchical clustering of the entire dataset to display a heat map with dendrograms indicating co-regulated genes across groups or individual samples.



## Verilerin Saçılım Grafiği



Analiz sonucunun MS Excel .xls dosya formatında kaydedilmesi

RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5

Upload data | Analysis setup | Analysis | Plots & charts | Export data | What's next

Select a Plot or Chart Icon below to launch a separate window.

**Notes:**

- Before launching a plot or chart, please upload your readout data or take a test run.
- Please disable any Pop-Up Window Blockers in your web browser.
- To save the figure:
  - Using Windows: Right-click on the figure and save the image/picture
  - Using OS X: Hold down the Control key & Click and save the image/picture

**Scatter Plot**

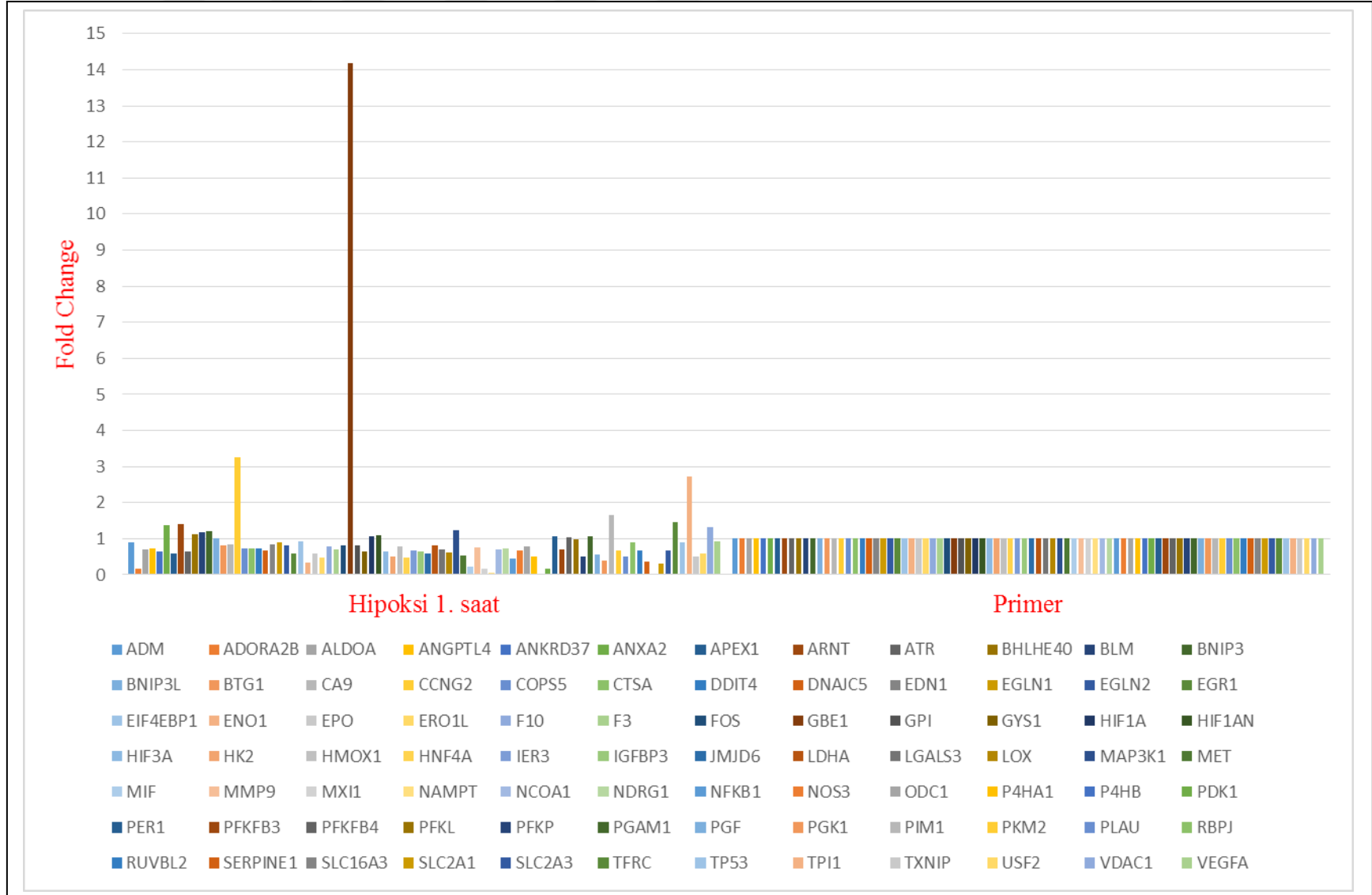
The scatter plot compares the normalized expression of every gene on the array between two groups by plotting them against one another to quickly visualize large gene expression changes. The central line indicates unchanged gene expression. Set the boundary (fold regulation cut-off) and the experimental groups to compare. Then, export the lists of genes whose expression changes are greater than the selected boundary.

The volcano plot helps quickly identify significant gene expression changes. The volcano plot displays statistical significance versus fold-change on the y- and x-axes, respectively. The

The clustergram performs non-supervised hierarchical clustering of the entire dataset to display a heat map with dendrograms indicating co-regulated genes across groups or individual

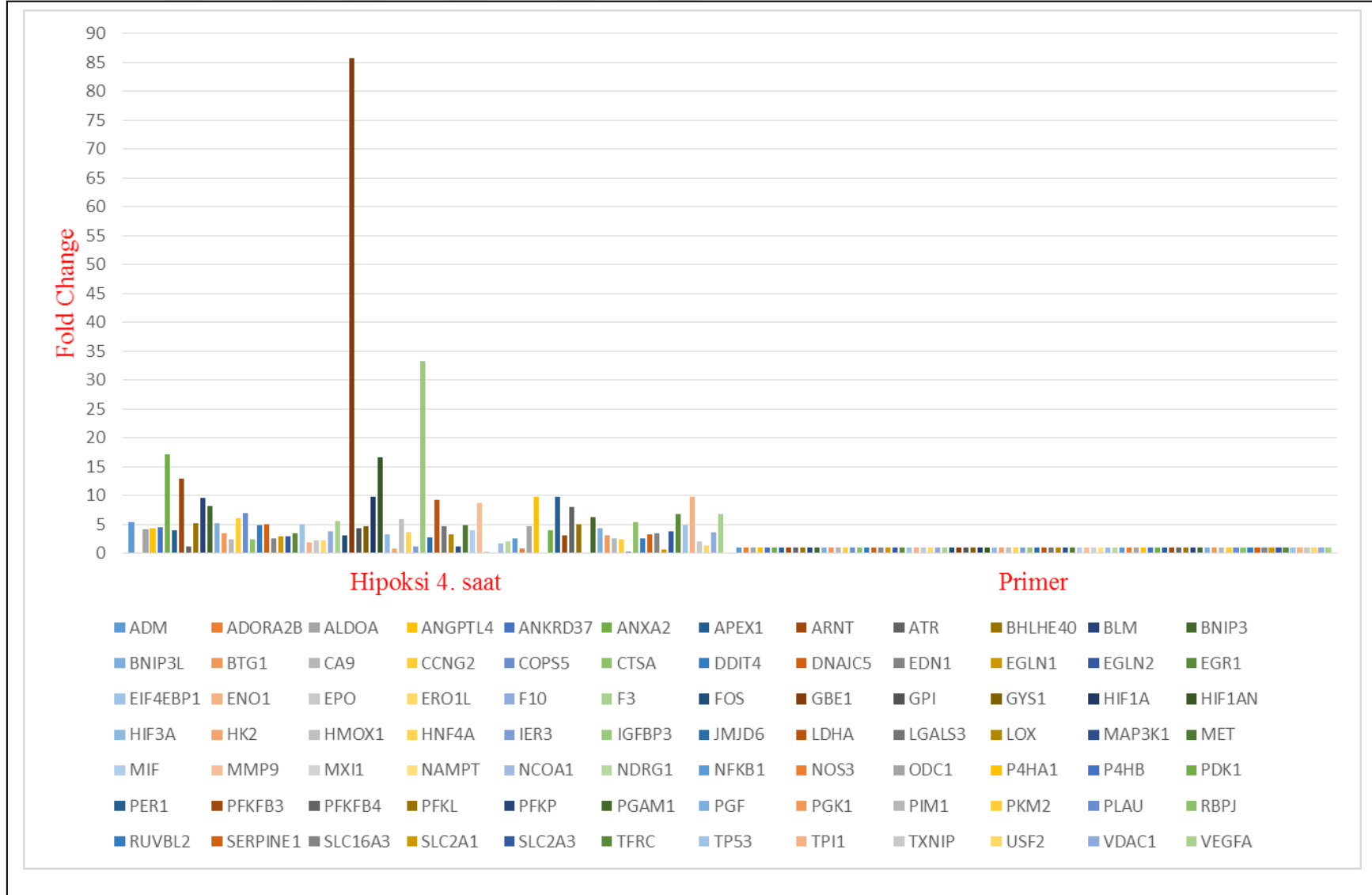
pcrdataanalysis.sabiosciences.com etki alanından PCRArrayDataset.xls dosyasını açmak ya da kaydetmek istiyor musunuz? Aç Kaydet İptal

Ek5: 1 Saatlik Hipoksi Sonrası Hipoksi İle İlişkili Genlerin Fold Change Çubuk Grafiği

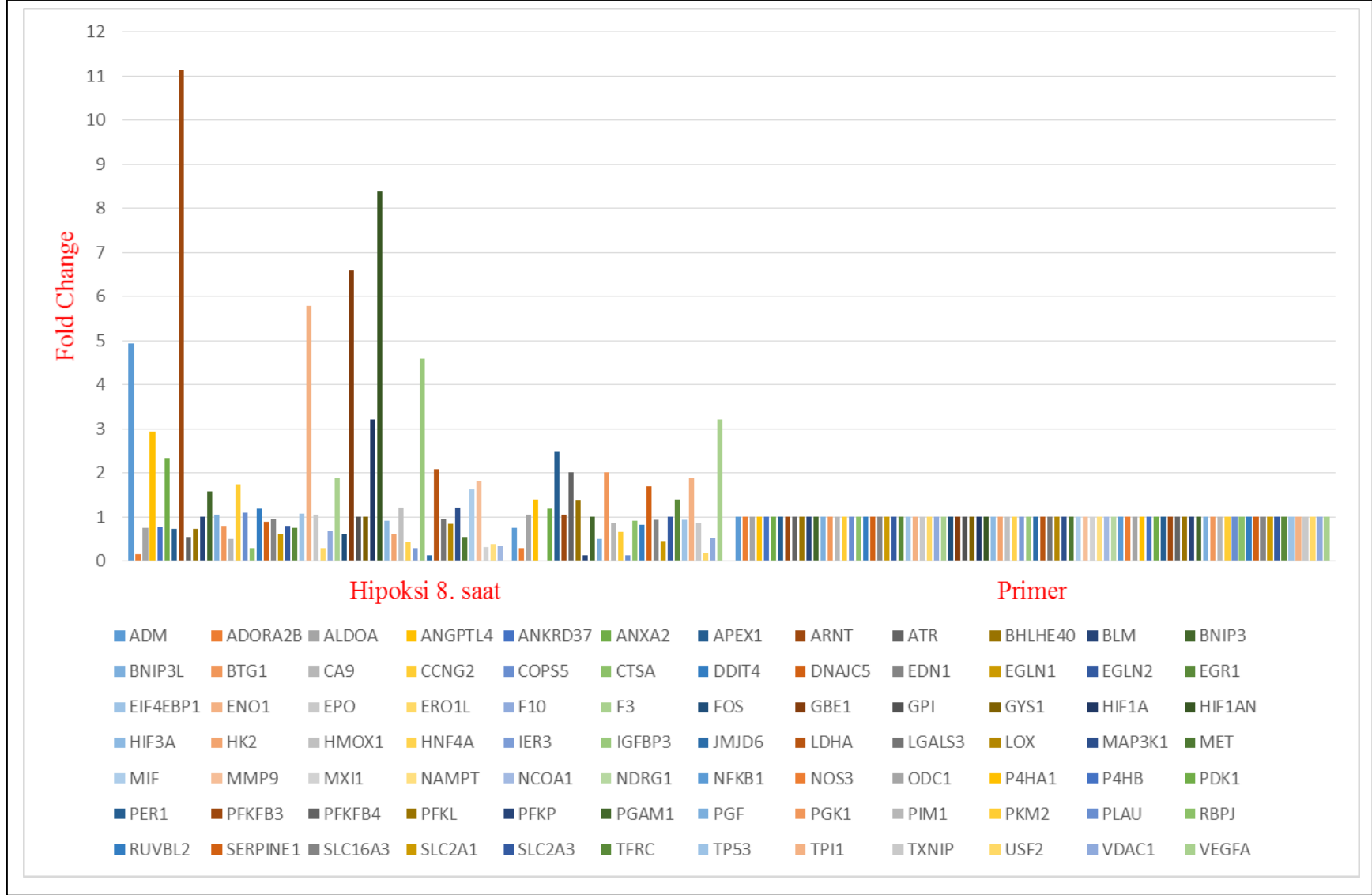




Ek6: 4 Saatlik Hipoksi Sonrası Hipoksi İle İlişkili Genlerin Fold Change Çubuk Grafiği



Ek7: 8 Saatlik Hipoksi Sonrası Hipoksi İle İlişkili Genlerin Fold Change Çubuk Grafiği



Ek 8: Metastatik Melanom Hücre Hatlarında Hipoksi İle İlişkili Genlerin Fold Change Çubuk Grafiği

