

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ - CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI



MALİGN MELANOMDA ING-2 GEN FONKSİYONLARININ
ARAŞTIRILMASI
(KLİNİK ÇALIŞMA)

UZMANLIK TEZİ
DR. ROYAL KHANKISHIYEV

TEZ DANIŞMANI:
PROF. DR. ARIF TÜRKMEN

İSTANBUL 2018

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ - CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI



MALİGN MELANOMDA ING-2 GEN FONKSİYONLARININ
ARAŞTIRILMASI
(KLİNİK ÇALIŞMA)

UZMANLIK TEZİ
DR. ROYAL KHANKISHIYEV

TEZ DANIŞMANI:
PROF. DR. ARİF TÜRKMEN

İSTANBUL 2018

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve becerilerinin yanı sıra tecrübelerinden büyük kazanç sağladığım ve yetişmemde sonsuz emekleri olan değerli hocalarım emekli öğretim üyesi Sn. Prof Dr Muzaffer ALTINDAŞ, emekli öğretim üyesi Sn. Prof Dr M. Zeki GÜZEL, Sn. Prof Dr Oğuz ÇETİNKALE, Sn. Prof Dr Yağmur AYDIN, Sn. Prof. Dr Arif TÜRKMEN, Sn. Doç. Dr. Hakan ARSLAN, Op Dr Semih BAĞHAKİ ve Op Dr Anıl DEMİRÖZ'e sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Asistanlığım süresince benden destek, birikim ve hoşgörülerini esirgemeyen stez danışmanım sayın Prof Dr Arif TÜRKMEN'e, tez çalışması için yaptıkları katkılardan dolayı Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan sayın Dr Öğr. Üyesi Övgü AYDIN'a, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıbbi Fizioloji Anabilim Dalı'ndan sayın Prof Dr Sadrettin PENÇE'ye ve Yrd. Doç. Hani ALSADONI'ye, tezim sürecinde yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Dr Alp ERCAN'a, Dr Mehmet Fatih OKYAY'a, Dr Tuğba Feryal YILDIZ'a, Dr Hasan KÖMÜRCÜ'ye, Dr Şamil SÜLEYMANOV'a, Dr Mehmet Beşir ÖNER'e, Dr Başak DAĞHAN'a, Dr Koray TEMİZ'e, Dr Uğur ÇELİK'e, Dr Fatih ÇİNAR'a, Dr. Mehmet GÜR'e ve ayrıca Op Dr Müge YALÇIN'a, Op Dr Metin TEMEL'e sonsuz teşekkür ederim. Plastik Cerrahi Kliniği hemşire, personel ve tüm çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen, sevgili annem Sn. Merveye KHANKISHIYEVA ve sevgili babam Sn. Khanlar KHANKISHIYEV'e ve tezimin hazırlanışı esnasında büyük özveri gösteren, bana destek olan eşim Sn. Dilara ŞAHAN KHANKISHIYEV'e sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu çalışma için Etik Kurul Onayı İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinden alınmıştır. Sonradan üniversitemizin ismi İstanbul Üniversitesi–Cerrahpaşa olarak değiştirilmiştir.

Dr Royal KHANKISHIYEV

İstanbul 2018

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 DERİ KANSERLERİ.....	3
2.1.1 MALİGN MELANOM	3
2.1.1.1 TANIM	3
2.1.1.2 İNSİDANS VE EPİDEMİOLOJİ	3
2.1.1.3 RİSK FAKTÖRLERİ	4
2.1.1.4 ETYOPATOGENEZ VE MOLEKÜLER DEĞİŞİMLER	7
2.1.1.5 TANI VE KLİNİK.....	13
2.1.1.6 HİSTOPATOLOJİK ALT TİPLER.....	15
2.1.1.7. EVRELEME	17
2.1.1.8 TEDAVİ.....	22
2.1.1.9 PROGNOZ.....	24
2.2 HÜCRE SİKLUSU	25
2.3 ING (Inhibitor of Growth) GEN AİLESİ	27
2.4.1. ING GEN AİLESİ ÜYELERİ, YAPISAL ÖZELLİKLERİ VE FONKSİYONLARI.....	28
2.4.1.1 ING1 VE FONKSİYONLARI.....	33
2.4.1.2 ING2 VE FONKSİYONLARI	36
2.4.1.3 ING3 VE FONKSİYONLARI.....	39
2.4.1.4 ING4 VE FONKSİYONLARI	41
2.4.1.5 ING5 VE FONKSİYONLARI.....	43
3.AMAÇ	44

4.GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
4.1. HASTA SEÇİMİ.....	45
4.2. ÖRNEKLERİN SEÇİLMESİ.....	46
4.3. GENETİK- MOLEKÜLER İNCELEMELER.....	47
4.3.1. Total RNA izolasyonu.....	47
4.3.2. cDNA sentezi.....	47
4.3.3. Real-Time PCR uygulama ve analizi.....	49
4.4. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	50
4.4.1. KLİNİK DEĞERLENDİRME.....	51
4.4.2 HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	51
4.4.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME.....	51
5.BULGULAR.....	52
5.1 KLİNİK BULGULAR.....	52
5.2 HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	53
5.3. GENETİK- MOLEKÜLER BULGULAR.....	55
5.4. İSTATİSTİKSEL BULGULAR.....	58
5.4.1. ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLEN 21 HASTANIN SONUÇLARI.....	59
6.TARTIŞMA.....	64
7.KAYNAKLAR.....	69

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1: Malign melanom için risk faktörleri özeti	4
Tablo 2: Fitzpatrick sınıflaması.	6
Tablo 3: Malign melanomda majör genetik değişiklikler	12
Tablo 4: Cilt Melanomunda Tümör (T) evrelemesi.....	17
Tablo 5: Rejyonel lenf nodu (N) sınıflaması.	18
Tablo 6: Uzak metastaz (M) sınıflaması.	19
Tablo 7: Klinik evreleme (cTNM).....	20
Tablo 8: Patolojik evreleme (pTNM).	21
Tablo 9: Primer melanomda geniş eksizyonun önerilen cerrahi sınırları.	22
Tablo 10: Reverse transkripsiyon reaksiyon bileşenleri.	48
Tablo 11: Reverse-transkripsiyon karışımı.	48
Tablo 12: Olgun miRNA için miScript SYBR Green kit karışımı (96'lık plaka).....	49
Tablo 13: ING2 geninin qRT- PCR'da kullanılan primer dizisi.	49
Tablo 14: qRT- PCR kondüsyonları.	50
Tablo 15: Hastaların cinsi, yaşı, primer tümör lokalizyonu, sentinel lenf nodu biyopsisi ve bölgesel disseksiyon sonuçları.	53
Tablo 16: Tümörün tipi, Clark evresi, Breslow kalınlığı, büyüme fazı, cerrahi sınır, mitotik aktivite.	54
Tablo 17: Normal deri dokusu ve primer tümörün β aktin ve ING2 değerleri, Delta Ct, Delta-Delta Ct ve Rölatif İfadeler.	55
Tablo 18: Sağlam lenf nodu ve metastatik lenf nodu dokularının β aktin ve ING2 değerleri, Delta Ct, Delta-Delta Ct ve Rölatif İfadeler.	56
Tablo 19: Tümörlerin klinik ve histolojik özellikleri.	58
Tablo 20: Sağlam deri dokusu ve primer tümörün delta Ct, Delta Delta Ct, Rölatif ifade değerleri.	59
Tablo 21: Sağlam lenf nodu dokusu ve primer tümörün delta Ct, Delta Delta Ct, Rölatif ifade değerleri	60

Tablo 22: Sağlam deri ve primer tümör hücrelerinde ekspresyon farkı ve Breslow tümör kalınlığı ilişkisi.	61
Tablo 23: Sağlam ve metastatik lenf nodunda ekspresyon farkı ve Breslow tümör kalınlığı ilişkisi.	62
Tablo 24: Primer tümör ve sağlam deri dokusu delta Ct değerleri ile primer tümör kalınlığı karşılaştırılması.....	63
Tablo 25: Metastatik ve metastaz olmayan lenf nodu dokusu delta Ct değerleri ile primer tümör kalınlığı karşılaştırılması.	63



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1: Ultraviyole Işığın Dalga Boyları	5
Şekil 2: RAS-RAF-ERK yolağı	8
Şekil 3: Mutasyonlar, tetikledikleri yollar	9
Şekil 4: Clark evrelemesi	14
Şekil 5: Hücre siklüsünün aşamaları	26
Şekil 6: ING ailesi proteinlerinin inhibitörünün aracılık ettiği bir sinyal yollarının modeli	27
Şekil 7: ING genleri lokalizasyonu, yapısı ve transkriptleri	29
Şekil 8: İnsan ING gen alanları	31
Şekil 9: ING ailesinde bulunan bazı moleküler kısımlar ve etkileri	32
Şekil 10: ING1 fonksiyonları	35
Şekil 11: ING2 sinyal yolağının modeli	39
Şekil 12: qRT- PCR çalışma protokolü	50
Şekil 13: ING2 ve β aktinin ekspresyon sonuçları	57
Şekil 14: Sybr green ayrılması (MELTING CURVE)	58

KISALTMALAR

BCC	: Bazal Hücreli Karsinom
SCC	: Skuamöz Hücreli Karsinom
UV	: Ultraviyole
AJCC	: American Joint Committe of Cancer
CDK	: Siklin Bağımlı Kinazlar
ING	: Inhibitor of Growth
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
DNA	: Deoksiribonükleik-asit
PUVA	: Psöralen Ultra Viyole A
XP	: Xeroderma Pigmentosum
NER	: Nucleotide Excision Repair –Nükleotid Eksizyon Onarımı
KIN	: Keratinosit İntraepidermal Neoplazi
SRK	: Srcasm Tirozin Kinaz
LOH	: Heterozigotluk Kaybı
GTP	: Guanozin Tri-fosfat
NK-kB	: Nükleer Faktör Kappa B
RNA	: Ribonükleik-asit
mRNA	: Mesajcı RNA
miRNA	: Mikro RNA
CEA	: Karsinoembriyojenik Faktör
NCCN	: National Comphenesive Cancer Network

IFN	: İnterferon
5-FU	: 5-Flurourasil
CP	: Check-point –Kontrol noktası
HAT	: Histon Asetiltransferaz
HDAC	: Histon Deasetilaz
HIF	: Hipoxia Inducible Factor –Hipoksi ile İndüklenen Faktör
PIP	: PCNA Interacting Protein
PBD	: Partial Bromo Domain
NCR	: Novel Conserved Region
NLS	: Nükleer Localization Signal
PHD	: Plant Homeo Domain
PBR	: Poly Basic Region.
LZL	: Leucine Zipper Like.
P5P	: Fosfoinozitol-5-fosfat
FADD	: Fas-associated Death Domain –Fas İlişkili Ölüm Bölgesi
MNNG	: Metil-nitro-nitröz-guanid
PCNA	: Proliferating Cell Nuclear Antigen –Prolifere Olan Hücre Nükleer Antijen
PARP	: Poli-ADP Riboz Polimeraz
PAD4	: Peptidilarginin Deaminaz 4
AD	: Anabilim Dalı
PCR/PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
cDNA	: Komplementer (Tamamlayıcı) DNA

ÖZET

Malign melanom melanositlerin malign transformasyonu sonucu gelişen neoplazidir. Ultraviyole ışınlar maruziyet sonucunda genetik mutasyonların birikimi onkogenleri aktive eder, tümör süpresör genleri etkisiz hale getirir ve DNA onarımını bozar. Bu süreç melanositlerin kontrolsüz proliferasyonuna ve nihayetinde malign melanoma yol açar. Malign melanomda primer tümörün lokalizasyonu, derinliği, lokal veya uzak metastazların varlığı prognozu etkiler.

Malign melanom insidansı 10-20 yılda iki katına (yılda yaklaşık %3-7 artış) çıkması beklenen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Malign melanomda risk faktörlerinin etki mekanizmalarını anlamak hastalığın karşısına geçilmesinde büyük önem arz edecektir. Günümüzde melanoma, genetik yatkınlık ve çevresel maruziyet arasındaki etkileşimden kaynaklanan çok faktörlü bir hastalık olarak kabul edilmektedir.

Hücre siklüsünün tüm aşamaları süpresör genler ve onkogenler ve diğer bir takım kontrol mekanizmalarının denetimi altındadır. Kontrol mekanizmalarında olan ve onarılmayan mutasyonlar kontrolsüz hücre bölünmesi- kanserle sonuçlanır. Cilt kanserlerinde en sık p53 mutasyonuna rastlanır. ING proteinlerinin p53 etki mekanizması için gerekli olduğu düşünülmektedir. ING gen ailesinin bugüne kadar 5 bireyi tanımlanmıştır. ING proteinleri apoptozu destekleme, DNA hasarının onarılması, hücre yaşlanmayı kontrol etme, hücre proliferasyonu üzerinde negatif etki, kromatin yapının yeniden düzenlenmesi, hormon yanıtı kontrolü, NF-kB ve hipoksi ilişkili neoplazi yollarında görev alırlar. ING2 hücre döngüsü G1-fazda tutulmasını ve apoptozisi artırdığını göstermiştir. Bundan başka ING2 ya nükleotid eksizyon onarımını güçlendirerek yada melanom hücrelerinde UV kaynaklı apoptozu teşvik ederek UV ışınlarına karşı hücrel stres yanıtında önemli rol oynar.

Daha önce yapılmış bir çalışmada malign melanom tanısı almış hastalarda ING2 ekspresyonlarının tümörlü dokularda azaldığı gösterilmiş ve ING2'nin malign melanom için tümör süpresör gen olabileceği belirtilmiştir.

Bu çalışmada malign melanom tanısı almış 21 hastanın tümörlü ve sağlam deri dokularına, metastatik ve sağlam lenf nodlarına ait parafin bloklardan alınan 84 doku örneğinde ING2 mRNA seviyeleri ölçüldü. Tümör ve sağlam deri dokular arasındaki

farka bakıldı. Daha önceki çalışmalara benzer şekilde ING2 gen ekspresyonunun tümör hücrelerinde azaldığı görüldü. Sağlam ve metastatik lenf nodları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Bundan başka sağlam ve metastatik lenf nodlarındaki ING2 ekspresyon farkı ile primer tümörün Breslow kalınlığı arasındaki ilişkiye bakıldı. Ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı.

Bu çalışma ile ING2 geninin tümör süpressör gen olması konusunda diğer çalışmalar desteklense, primer tümör kalınlığı ve metastatik lenf nodunda ekspresyon farkı arasında herhangi bir korelasyonun olmadığını ortaya konuldu.



ABSTRACT

The malignant transformation of melanocytes results in the formation of malignant melanoma. UV energy causes genetic mutations that activate oncogenes and deactivate tumor suppressor genes, resulting in problems in DNA repair. As a result, melanocytes proliferate without control and melanocytic neoplasias occur. The prognosis of malignant melanoma is determined by tumour localization, invasion depth, local and distant metastases.

The incidence of malignant melanoma is expected to increase two-fold by 10-20 years, which is a 3-7% increase each year. Thus it is a major public health problem. It is important to understand the melanoma risk factors in order to prevent the disease. Melanoma is accepted as a multifactorial disease: both genetic predisposition and environmental factors are important risk factors.

The cell cycle is controlled by tumor suppressor genes and oncogenes. The mutations in these genes result in uncontrolled cell proliferation and thus cancer if left unrepaired. The most common mutation in skin cancer pathogenesis is the mutation of p53 gene. ING proteins are thought to be crucial in the role of p53. Up to now, five members of the ING protein family have been determined. These proteins have roles in DNA repair, control of cell aging, withholding cell proliferation, re-arrangement of chromatin, control of hormonal responses, NF κ B and hypoxia associated neoplasia pathways. ING2 stops the cell cycle at the G1 phase and induces apoptosis. Furthermore, ING2 induces either nucleotide excision repair or the UV mediated apoptosis in melanoma cells, and thus has an important role in the cellular stress response against the UV energy.

A previous study has showed that ING2 expression is decreased in melanoma cells and thus can be a tumor suppressor gene in the pathogenesis of malignant melanoma.

In this study the ING2 mRNA levels were evaluated of the 84 paraffin blocks obtained from the tumoral, metastatic, lymph nodes and healthy tissue specimens of 21 patients. The difference between the tumoral and healthy tissues was determined. Parallel to the previous studies, it was concluded that the ING2 expression was

decreased in the tumoral tissues. No difference was found between healthy and metastatic lymph nodes. In addition to these, the relationship between the breslow thickness and ING2 expression of metastatic and healthy lymph nodes was found to be statistically insignificant.

Although this study supports the previous work on ING2 being a tumorsuppressor gene in melanoma pathogenesis, a relationship between the breslow thickness and the metastatic lymph node ING2 expression was not found.



1.GİRİŞ

Malign melanom, normal melanositlerin farklı faktörlerin etkisinden malign transformasyonu sonucunda oluşan deri kanseridir. Melanositler erken fetal dönemde nöral krestten köken alarak epidermis, meninkslere, uveal bölgeye, ektodermal mukozaya göç etse de malign melanom daha sıklıkla ciltde görülmektedir.

2017 senesinde A.B.D’de 87,110 hastaya malign melanom tanısı konulmuş ve 9730 hasta bu sebepten hayatını kaybetmiştir (1). Malign melanom insidansı dramatik olarak artmaktadır. 2002 senesinden 2006 senesine kadar erkekler için %33, kadınlar için %23 artış gözlenmiştir (2).

Malign melanomun risk faktörleri arasında fenotipik faktörler (mavi gözler, sarışın veya kırmızı saç, açık ten, güneş hassasiyeti, bronzlaşmama), malign melanom öyküsü, displastik nevüs mevcudiyeti, pozitif aile hikayesi ve nadiren de olsa genetik mutasyonlar bulunur (3–6). Genetik faktörlere ek olarak fazla güneşe maruz kalma ve UV bazlı suni bronzlaşma gibi çevresel faktörler melanom gelişmesine neden olabilir (7).

Primer malign melanom non-metastatik radial faz ve dermise invaze olarak metastaz kapasitesi kazanan vertikal fazlardan oluşmaktadır (8). Malign melanomun kesin tanısı histopatolojin inceleme ile konulur. Hastaların büyük bir kısmı erken tanı konulduktan sonra basit cerrahi müdahaleler ile tedavi edilebilse de, uzak metastaz gelişen hastaların %50’si tanı konulduktan 6 ay içerisinde hayatlarını kaybediyorlar (9). Tümörün histopatolojik özellikleri, lokalizasyonu, çapı, hastanın özgeçmiş, kliniği, prekanseröz durumların varlığı, hastalığın prognozunun etkiler.

Malign melanom için kabul görmüş en güncel evreleme American Joint Committee of Cancer (AJCC)’nin 2016 yılında yaptığı TNM evrelemesidir.

Malign melanomun primer tedavisi cerrahi eksizyondur. Melanom, konvansiyonel radyo veya kemoterapiye karşı oldukça dirençlidir. Melanom tedavisi için tek FDA onaylı ilaç olan Dacarbazine (DTIC) yanıt oranı sadece %16’dır (10). Bu nedenle, yeni tedavi rejimlerinin tasarlanması için melanom progresyonunun ve kemorezistansının daha iyi anlaşılması istenir. Malign melanomun başlangıcı ve

gelişiminde moleküler etkilerin ortaya konulması malignitenin önlenmesi ve tedavisine yardımcı olacaktır.

Hücre siklüsünün tüm aşamaları bir takım kontrol mekanizmalarının denetimi altındadır. Bu mekanizmalar arasında tümör süpressör genler ve onkogenler başlıca role sahiptir. Kontrol mekanizmalarında olan ve onarılmayan mutasyonlar kontrolsüz hücre bölünmesi- kanserle sonuçlanır. Cilt kanserlerinde en sık p53 mutasyonuna rastlanır (11). DNA hasarını apoptozise bağlayan merkezi bir sensör olan p53, birçok tümör tipinde tümör baskılanmasında ve kemosenesitivitesinde önemli rol oynar. Bununla birlikte, mutasyon analizi p53 geninin melanomların sadece yaklaşık % 11'inde değiştiğini ortaya koymaktadır (12). P53'ün düşük mutasyon oranı, diğer tümör süpressör genlerin melanom patogeneğinde önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir (13).

ING proteinlerinin p53 etki mekanizması için gerekli olduğu düşünülmektedir. Literatürde ING proteinlerinin p53'ten bağımsız çalıştığı yönünde yayınlar vardır (14). ING gen ailesinin bugüne kadar 5 bireyi tanımlanmıştır ve 5 ayrı kromozomlarda yerleşmektedir. ING proteinleri apoptozu destekleme, DNA hasarının onarılması, hücre yaşlanmayı kontrol etme, hücre proliferasyonu üzerinde negatif etki, kromatin yapının yeniden düzenlenmesi, hormon yanıtı kontrolü, NF-kB ve hipoksi ilişkili neoplazi yolaklarında görev alırlar (15).

Önceki çalışmalar kolorektal karsinomda ING2'nin p53 ile işbirliği yaparak hücre döngüsü G1-fazda tutulmasını ve apoptozisi artırdığını göstermiştir. ING2 p300 ile birlikte p53 asetilasyonu yoluyla replikatif yaşlanmayı ve PHD alanından fosfoinositidle (PtdInsPs) etkileşerek DNA hasarına karşı nuklear cevabı düzenlediği bildirilmiştir. Bundan başka ING2 ya nukleotid eksizyon onarımını güçlendirerek yada melanom hücrelerinde UV kaynaklı apoptozu teşvik ederek UV ışınlarına karşı hücre yaşlanma yanıtında önemli rol oynar (16).

2.GENEL BİLGİLER

2.1 DERİ KANSERLERİ

Deri kanserleri ABD’de en yaygın kanser türüdür. Bunların büyük çoğunluğu melanom dışı deri kanserlerdir. Melanom dışı deri kanserleri keratinize epitelial hücrelerden kaynaklanır. Bu kanserler bazal hücreli karsinom (BCC) ve skuamoz hücreli karsinomdur (SCC). Tüm malign deri tümörlerinin %75’sini BCC oluştururken SCC için bu oran yaklaşık %20’dir (17). Malign melanom tüm deri kanserlerinin %4 kısmını oluştursada, deri kanserlerinden ölümlerin %77’sinden sorumludur (18). Melanom dışı deri kanserlerinden olan Kaposi sarkomu, Merkel hücreli tümör, dermatofibrosarkoma protuberans, sebase karsinom daha nadir görülmektedir.

2.1.1 MALİGN MELANOM

2.1.1.1 TANIM

Malign melanom melanositlerin malign transformasyonu sonucu gelişen neoplazidir. Melanositler epidermisin bazal tabakasında bulunur. Ultraviyole ışınlar maruziyet sonucunda genetik mutasyonların akkumulasyonu onkojenleri aktive eder, tümör süpresor genleri etkisiz hale getirir ve DNA onarımını bozar. Bu süreç melanositlerin kontrolsüz proliferasyonuna ve nihayetinde malign melanoma yol açar. Malign melanomda primer tümörün lokalizasyonu, derinliği, lokal veya uzak metastazların varlığı prognozu etkiler.

2.1.1.2 İNSİDANS VE EPİDEMİOLOJİ

21. yüzyılın başında malign melanom potensiyel ölümcül malignite olarak kalmaktadır. Birçok tümörün insidansında zamanla azalma gözlenmede, malign melanomun insidansı giderek artmaktadır (19,20). Çoğu hastada lokalize hastalık primer tümörün cerrahi eksizyonu ile tedavi edilmesine rağmen metastaz gelişmektedir. Malign melanom açık tenli popülasyonda daha sık görülen kanserdir. 100 sene önce nadir rastlanan hastalık olsada şuanda ortalama yaşam boyu risk 50’de 1’e ulaşmıştır. 1973’te ABD’de melanomu insidans oranı 100.000’de 6,8 iken, 2003’ten 2007’ye kadar bu oran 100.000’de 20,1’e yükseldiği görülmüştür. Solid tümörlerin aksine malign melanom

daha çok genç yaşlarda görülür. 25 yaştan 50 yaşa kadar görülme insidansı yaşa göre doğrusal olarak artsada, sonrasında rast gelme oranı azalma eğilimindedir (19).

Bazı çalışmalarda cinsiyete göre melanom insidansı ile ilgili olarak farklı sonuçlar olsada genel kaide erkeklerde daha sık rastlanması yönündedir (21). Kütanöz malign melanom beyaz derili popülasyonda siyah deriliye göre 10 defa daha fazla risk taşımaktadır. Beyaz ve Afrika Amerikan popülasyonda plantar malign melanom görülme olasılığı eşit olsada, non-kütanöz malign melanom (örneğin: mukozal malign melanom) siyah derili polulasyonda daha sık rastlanmaktadır (22). Baş ve boyun bölgesinden kaynaklanan mukozal malign melanoma nadir görülen bir durumdur, fakat kütanöz melanoma göre daha agresif seyrettiği bildirilmiştir (23).

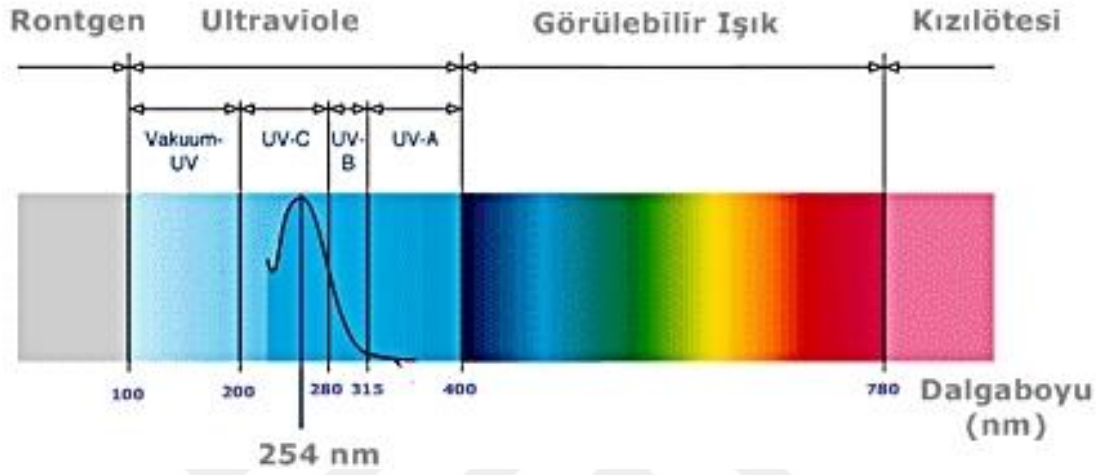
2.1.1.3 RİSK FAKTÖRLERİ

Malign melanom insidansı 10-20 yılda iki katına(yılda yaklaşık %3-7 artış) çıkması beklenen önemli bir halk sağlığı sorunudur (24). Malign melanomda risk faktörlerinin etki mekanizmalarını anlamak hastalığın karşısına geçilmesinde büyük önem arz edecektir. Günümüzde melanoma, genetik yatkınlık ve çevresel maruziyet arasındaki etkileşimden kaynaklanan çok faktörlü bir hastalık olarak kabul edilmektedir (19).

Tablo 1: Malign melanom için risk faktörleri özeti (21).

YÜKSEK KANIT	ZAYIF KANIT	YETERSİZ KANIT VEYA RİSK YOK
Çevresel ve hayat tarzı faktörleri	Bronzlaşma yatağı	Eksojen hormonlar
Güneş maruziyeti	Obezite	Alkol, sigara
Coğrafi yerleşim	Endüstriyel meslek	Kahve, Vitamin A ve E
Nevüs sayısı	Cilt kanseri öyküsü	Gebelik
Melanom aile öyküsü	Yüksek sosyoekonomik durum	
İmmünsüpresyon	Kahverengi saç	
Güneş hassasiyeti veya bronzlaşmamamak	Erkek cinsiyet	
Mavi veya yeşil göz rengi, sarı veya kızıl saç rengi	Endojen hormonlar (menarş yaşı)	

1.Ultraviyole radyasyona maruziyet: UVR, görünür ışıktan daha kısa fakat X-ışınlarından daha uzun olan 100–400 nm aralığındaki dalga boylarında elektromanyetik radyasyonudur. UVR'nin kaynağı güneş ışığıdır. UV bandı biyolojik etkileri farkı A (320-400nm), B (280-320nm), C (100-280nm) olmak üzere üç spektrumdan oluşmuştur.



Şekil 1: Ultraviyole Işığın Dalga Boyları.

UVC'nin antiseptik özellikleri iyi bilinmesine rağmen, güneş ışığının UVC dalga boylarının ozon tabakası tarafından etkili bir şekilde bloke edilmesi bilinmektedir. Bununla birlikte, memeli sistemlerinde mutagenез analizleri genellikle tüm UV dalga boylarının DNA'da benzer mutasyonlar oluşturduğu fikrini desteklemektedir (24). Güneş ışığının UVA ve UVB dalga boyları, cildin farklı katmanlarındaki hücreler tarafından absorbe edilebildiği için, UVA ve UVB'nin insan sağlığıyla daha ilgili olduğu düşünülmektedir. Güneş ışığı %90-95 UVA içerir ve insan derisinin dermal tabakasına ulaşabilir. UVB sadece epidermal tabakasındaki hücreleri etkiler.

UVR etkisinden oluşan bir takım ürünler (cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs), pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4)PPs, Dewar isomerleri) oluşturmakla direkt DNA hasarı yapar. Bundan başka UVR DNA onarım proteinlerini etkileyerek kanserogenezde rol aldığı ileri sürülmektedir (25).

2. PUVA tedavisi: Solar UV dışında psoriasis ve vitiligo tedavisinde kullanılan Psoralen Ultra Violet A (PUVA)'nın da malign melanom için risk faktörü olduğu bildirilmiştir (26). 250 ve daha fazla PUVA tedavisi gören hastada 5 kat daha fazla risk oluşmaktadır (27).

3. Fenotipik özellikler: Fenotip, malign melanomun gelişimi için bir risk faktörü olarak bağımsız olarak önemlidir. Açık saç rengi, açık göz rengi ve açık ten rengi olan insanların daha fazla risk taşıdığı bildirilmiştir. Kızıl saç ve açık ten rengiyle ilişkilendirilmiş Melanocortin-1 reseptör geninin malign melanomla ilişkili olduğu bildirilmiştir (28). Fenotipik özellikler genellikle “cilt tipi” başlığı altında yer alır.

Tablo 2: Fitzpatrick sınıflaması.

DERİ FOTOTİPLERİNİN SINIFLAMASI (Fitzpatrick)		
	Koruyucusuz 30 dk. Güneş maruziyetine reaksiyon	Fenotipik özellikler
I	Her zaman yanarlar, asla bronzlaşmazlar	Çok açık ten rengi, sarı veya kızıl saç,mavi göz
II	Kolayca yanarlar, nadiren bronzlaşırlar	Beyaz ten rengi, sarı veya kızıl saç, mavi-yeşil-ela göz rengi
III	Bazen yanar,genellikle bronzlaşırlar	Açık-orta buğday ten rengi
IV	Hemen her zaman bronzlaşır, nadiren yanar	Orta-koyu esmer ten rengi
V	Kolayca bronzlaşır, nadiren yanar	Kahverengi cilt rengi
VI	Kolayca bronzlaşır, asla yanmaz	Siyaha yakın cilt rengi

4. Melanositik nevüsler: Malign melanom için en güçlü risk faktörüdür. Nevüslerin total sayısı, ebatları ve türü malign melanom riski ile körele olarak değişkenlik gösterir. 100 ve üzerinde nevüs sayısı riski 7 kat artırır. Büyük (>5MM) ve gigant (>20 CM) nevüsler yüksek risklidir. Dev konjenital melanositik nevüsler habis melanoma yatkındır ve %2 ila %31 arasında bir insidans bildirmiştir (29). 5 ve daha fazla atipik nevüs malign melanom gelişme riskini 6 kat artırmaktadır (19). Tüm malign melanomların yaklaşık %40'ı nevüs veya nevoid kalıntılar zeminde oluşmaktadır (30,31). Pigment hücre instabilitesi ile karakterize edilen onkojenik yolun, daha yüksek sayıda nevüs ile ilişkili olduğu ve daha agresif melanom ve daha kötü prognoza neden olabileceği düşünülmektedir (32).

5. Aile öyküsü ve FAMMM (familial atypical multiple mole and melanoma) sendromu: Melanom hastalarının birinci derece akrabaları, aile öyküsü olmayan bireylerden daha yüksek bir hastalık riskine sahiptir ve bu da, farklı bir kalıtsal komponentin varlığını düşündürmektedir. Ailesel melanoma, tüm melanom vakalarının tahmini % 5 ila 10'unu oluşturur. Ailesel malign melanom ilk tanıda erken yaş, daha iyi sağkalım, daha ince lezyonlar, çoklu primer lezyonlar ve melanom dışı kanserlerin ortaya çıkması gibi özellikler arz etmektedir (32,33). Kutanöz melanomun yaklaşık% 5–10'unda kalıtsal bir yatkınlık bulunan türlerde görülür. Ailesel melanomlu hastaların yaklaşık% 20-40'ında kromozom 9p21 üzerinde bulunan CDKN2A geninde germline mutasyonları vardır. Etkilenmiş bireylerde melanom gelişme riski normal popülasyona göre 184 kat artmıştır (34,35).

6. Ailevi kanser sendromları: Familial retinablastom, Li-Fraumeni, tip II Lynch sendromu (21,36).

7. DNA onarım genleri: Kseroderma pigmentozum hastalarında nukleotid eksizyon onarımı (nucleotide excision repair –NER) veya post-replikasyon onarımları yapılamaz. Hasarlanan DNA'da kromozomal mutasyonlar, hücre ölümü, neoplastik ve atrofik değişiklikler başlar. DNA onarım bozukluğu olan Kseroderma Pigmentozumda malign melanom riski 1000 kat daha fazladır (37).

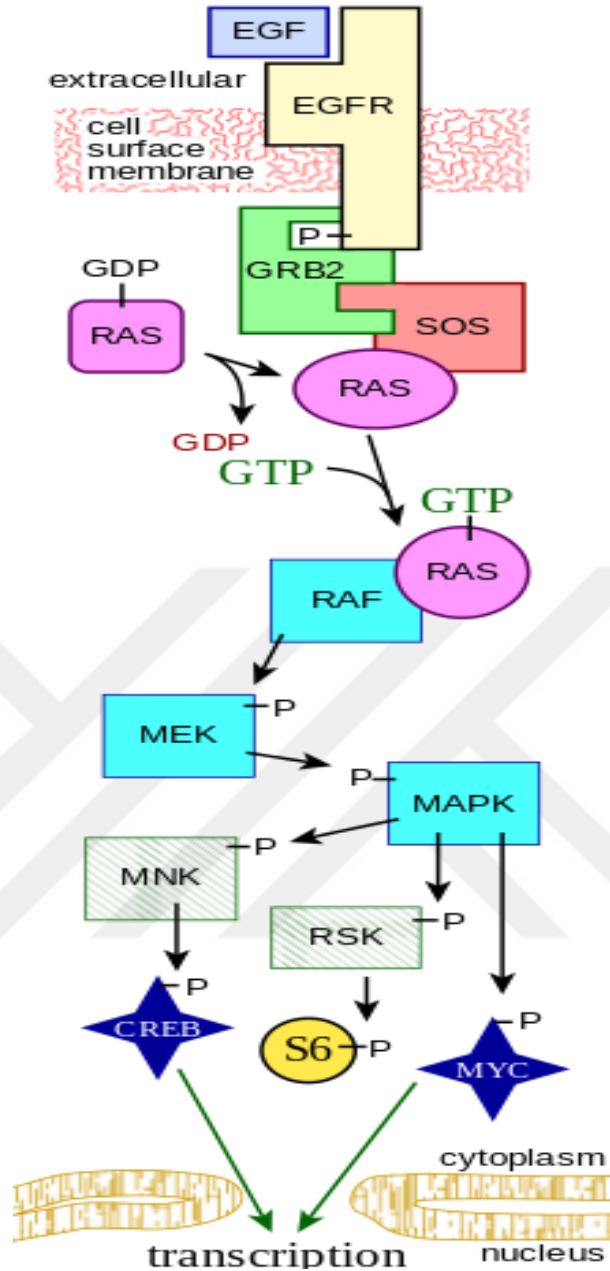
8. Melanom öyküsü: Daha önce melanom öyküsü olan hastalarda ikinci melanom gelişme riski %3-6 olarak tahmin edilmektedir (38).

2.1.1.4 ETYOPATOGENEZ VE MOLEKÜLER DEĞİŞİMLER

Moleküler genetik ve kanser kök hücre biyolojisindeki son gelişmeler, melanomagenезin moleküler temeline ışık tutmuştur. Melanomun patogenezini anlamak, giderek artan bu yaygın hastalık için yeni teşhis ipuçlarını ve terapötik hedefleri ortaya çıkarabilir. Son zamanlarda, melanomdaki genetik değişikliklerin spesifik histolojik değişikliklerle ilişkili olduğu da gösterilmiştir (39).

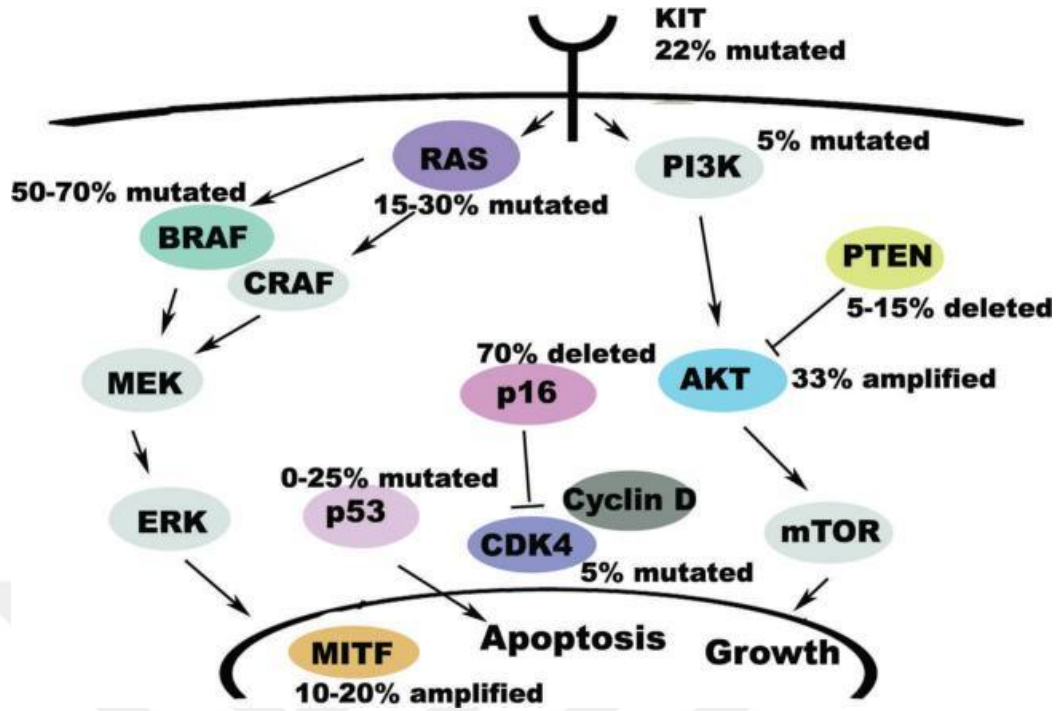
1.RAS-RAF-ERK yolağı

NRAS RAS ailesinin melanomda sıklıkla mutasyon görülen üyesidir. HRAS ve KRAS proto-onkojenleri insanlarda görülen diğer kanserlerde sık görülsede malign melanomda nadiren görülmektedir. NRAS mutasyonundaki Q61R glutamin yerine arginin geçmesine neden olmakla GTP hidrolizine yol açar.



Şekil 2: RAS-RAF-ERK yolağı.

Primer ve metastatik malign melanomların 1/3'ünde NRAS mutasyonu vardır ve daha çok nodüler malign melanomda olduğu bildirilmiştir. NRAS mutasyonu metastaz ve kötü prognozla ilişkilidir (39,40). NRAS mutasyonu çoğu displastik nevüste olduğu gösterilse de nadiren konjenital nevüste vardır. Buda konjenital nevüs ve displastik nevüsün farklı yollarla aktifleşmesini göstermektedir (39).



Şekil 3: Mutasyonlar, tetikledikleri yollar (39).

RAF RAS sinyallerini mitojen aktive edici protein kinaza (MAPK) ötüren ileticidir. 3 izoformu (ARAF, BRAF, CRAF) olsada melanomda %50-70 BRAF rastlanmaktadır (41). Mutasyonların %90'ını glutamik asit yerine valin değişikliğine yol açan V600E mutasyonudur. Bu mutasyon kinaz alanında fosfomimetik değişikliğe yol açarak kinaz aktivitesini 10-480 defa artırır. BRAF mutasyonu tiroid kanserinde (%44.2), over kanserinde (%30) ve kolorektal kanserlerde (%30) görülür (42).

Ekstracellular regulated kinase (ERK) aktivitesi BRAF ve MAPK yolağını hedef alarak melanom hücrelerinin proliferasyonunun yanısıra IL-10, IL-6 ve VEGF faktörlerinin sentezini azaltarak immun melanom hücrelerinin immun yanıtta kaçınmasına neden olur (39). MAPK'n anormal aktivasyonu kaskadı malign melanom proliferasyonuna ve apoptozdan kaçınmasına neden olur. Bu yolak malign melanomların %90'da görülür.

BRAF yolu tedavi için bir yol olarak hedeflenmiş ve selektif bir BRAF inhibitörü (PLX4032) ile yakın zamanda erken evre klinik bir çalışma umut verici klinik etkinlik göstermiştir (43).

2.PI3K/AKT ve PTEN yolu

Malign melanomda PI3K/AKT yolu tümör supressor gen olan PTEN inaktifleşmesi ve AKT aktivasyonu sonucunda aktive olur. PTEN hücre içi lipid fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat (PIP3) seviyesini regule eden lipid protein fosfatazi kodlar. PTEN kaybı tümör hücrelerinde AKT fosforilasyonuna ve aktifleşmesine neden olur. PTEN'in ekspresyonunun azalması %50 hastalarda görülmektedir (44). Bundan başka PTEN metilasyonunda inktive olmasına neden olur. Primer melanomla karşılaştırıldığında PTEN metilasyonu metastatik melanomda daha sık rastlanmaktadır, buda PTEN'in melanom progresyonu ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir (45).

PTEN ve NRAS mutasyonları nadiren aynı anda rastlansada, PTEN ve BRAF mutasyonları %20 malign melanomda beraber görülür (39).

AKT'in 3 izoformu vardır. Malign melanomda daha çok AKT3 izoromu aktive olur. pAKT ekspresyonunun artması hem genel hem de hastaliksız sağkalım ile ters orantılıdır ve 1,5 mm'den az melanomlu hastalar için kötü bir prognostik faktördür. Ayrıca AKT3 agressiv malign melanom progresyonundan sorumludur (46).

3.KIT

PDGF ailesi üyesi olan KIT(CD117) melanosit gelişmesinden sorumlu tirozin kinaz reseptörünü kodar. Kronik güneş maruziyeti az olan bölgelerde gelişmiş akrall melanom ve mukozal melanomlarda BRAF mutasyonu nadiren görülsede KIT ekspresyonu sıkça rastlanmaktadır. Oral mukozal melanom ve akrall melanomda KIT ekspresyonu % 62 iken, anal melanomlarda %15 olarak görülmektedir (47).

Yüksek KIT ekspresyonu olan hastalarda tirozin kinaz reseptör inhibitörü olan imatinibe dramatik yanıt elde edilmektedir (48). Bununla birlikte KIT ekspresyonunun BRAF^{V600E} mutasyonları ile birlikte görüldüğü durumlarda zayıf imatinib cevabı alınmaktadır (39).

KIT'in melanom gelişmesindeki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, melanositlerde ERK2 ve p90RSK(p90 ribosomal S6 kinaz) ile MITF fosforilasyonu yaparak melanogenezise katkıda bulunduğu bilinmektedir.

4.MITF

Basit lösün heliks-loop-heliks transkripsiyon faktörü olan MITF, çoklu sinyal yollarının merkezinde yer alır ve melanoblastlar, melanositler ve melanomların farklılaşması, morfolojisi, proliferasyonu ve hayatta kalması için bir ana düzenleyici olarak görev yapar (49).

İnsanlarda MITF mutasyonu, çeşitli derecelerde sensorinöral işitme kaybı ile göz, iç kulak ve ön bacakta melanosit eksikliği ile karakterize edilen otozomal dominant bir durum olan Waardenburg sendromu tip IIA'ya neden olur.

MITF primer melaomda %10, metastatik melanomda %21 amplifiye olsada normal nevüste bu artım görülüyor (49).

MITF amplifikasyonu metastatik melanomlarda daha yaygındır ve genel hasta sağkalımının azalması ve kemoterapiye dirençle ilişkilidir (50).

5. P53

P53 proteini çeşitli stres faktörlerine karşı esas transkripsiyon anahtarıdır (51). Melanositlerin melanoma hücrelerine dönüşümü, normal hücre siklus kontrolü, genomik instabilite ve anormal proliferasyonun bozulması ile karakterizedir. P53 proteini hücre büyümesinin durdurulması, kanserin baskılanması, mutant hücre çoğalmasına karşı genomun korunması, programlanmış hücre ölümü, hücre farklılaşması ve DNA tamir mekanizmasının başlatılmasında da rol alır. DNA hasarı, hipoksi, onkogen aktivasyonu, mutajenik kimyasallar ve UV radyasyonuna maruz kalınması gibi strese neden olan birçok duruma yanıt olarak fosforilasyon ve asetilasyon yoluyla aktive olur TP53 mutasyon veya delesyonları %50 kanserlerde görülmekle birlikte, diğer kanserlerden farklı olarak, TP53 gen mutasyonları solid tümörlerin çoğuna kıyasla nadirdir; metastatik olmayan melanomlarda %1 ila %5 arasında ve metastatik melanomlarda %11 ile %25 arasında değişmektedir (39,52,53).

6. HIF (Hipoxia-Inducible Factors)

Tümör gelişmesinde önemli faktörlerden biri tümör mikro çevresidir. Cilt fizyolojik olarak hipoksiktir ve hipoksi melanomagenesis için destekleyici faktördür (54). Hipoksik yanıt esas olarak hipoksi-indüklenebilir faktörlerin (HIFs) stabilizasyonu

tarafından aracılık edilir. Bu heterodinamik transkripsiyon faktörleri oksijen duyarlı α subünitesi ve HIF-1 β /ARNT kompleksinden oluşmaktadır. Normoksik ortamda HIF- α subsementlere ayrıştırılır. Hipoksik koşullarda kararlı hale gelir ve ARNT ile birlikte hedef genlerin hipoksi-duyarlı elemanlarına (HREs) bağlanır. HIF-1a ve HIF-2a anjiyogenez, invazyon ve metastazda yer alan hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder. HIF-1a tarafından aktive edilen genler glikoliz ve apoptozda rol alır (39). Ciltte hipoksik mikro çevre, AKT'nin neden olduğu melanosit transformasyonuna ve tümör büyümesine katkıda bulunur. Son zamanlarda, hipoksinin, hedef bölgelerdeki tümör metastazını kolaylaştıran premetastatik niş oluşumu için kritik olduğu gösterilmiştir (39,55).

Tablo 3: Malign melanomda majör genetik değişiklikler (39)

GEN	MUTASYON	TÜMÖR TİPİ, FREKANS	KAYNAK, YIL
NRAS	Aktive edici mutasyon; Q61R en yaygın mutasyon	Konjenital nevüs (81) Primer tümör (25) Metastaz (33)	Bauer ve ark., 2007 Houben ve ark., 2004
BRAF	Temel mutasyon, V600E en yaygın mutasyon	Melanomlar (66) Benign nevüs (82)	Davies ve ark., 2002 Pollock ve ark., 2003
PTEN	İaktivasyon	Melanomlar (10)	Stahl ve ark., 2003
AKT3	Aktivasyon	Sporadik melanomlar (43- 60) Benign nevüs (4)	Stahl ve ark., 2004
mTOR	Aktivasyon	Melanomlar (73) İn-situ melanom (78) İnvaziv melanom (67) Metastaz (76)	Karbowniczek ve ark., 2008
cKIT	Aktivasyon ve amplifikasyon	Benign nevüs (0-18) Güneş hasarlı melanomlar (28) Akral melanom (36) Mukozal melanom (39)	Curtin ve ark., 2006
MITF	Amplifikasyon	Primer tümör (10) Metastatik melanom (21)	Garraway ve ark., 2005
TP53	Mutasyon ve inaktivasyon	Primer tümör (1-5) Metastaz (11-25)	Akslen ve ark., 1998 Papp ve ark., 1996

2.1.1.5 TANI VE KLİNİK

Baş-boyun bölgesi tüm vücudun %9'unu oluşturmasına rağmen, primer malign melanomların %15-30'u bu bölgede gelişir. Deri kanserleri tüm kanserlerin %95'ni oluşturmasına rağmen, malign melanom sadece deri kanseri değildir. Primer deri dışı melanom bölgeleri arasında oküler, mukozal, gastrointestinal, genitoüriner, leptomeningeal alanlar ve lenf nodları (primer lezyon bilinmeyen) bulunur (21).

Erkeklerde malign melanom oluşma riski kadınlarla kıyaslandığında 1,5 defa daha fazladır. Primer malign melanom erkeklerde sırtta, kadınlarda üst ve alt ekstremitelerde daha sık rastlanır (21).

Malign melanomun erken saptanması mortalitenin düşürülmesinde anahtar faktördür. Melanomdaki prognoz, neoplazmın derinliği ile orantılıdır. Melanom tanısında, melanomun zamanında tanınması, saptanması ve hızlı tedavisi kritik aşamalardır.

Cilt muayenesi melanom ve prekanseröz lezyonlar için basit, uygun bir tarama yöntemi olarak büyük bir potansiyele sahiptir. Melanom erken klinik sunumunda, "ABCD" kriterleri 1985 yılında geliştirilmiştir, daha sonradan "E" eklenmiştir: bu kriterlerde asimetri, sınır düzensizliği, renk değişimi, çap(> 6 mm) ve değişim yer almaktadır. Bazı dermoskopik kriterler tanı konulmasında önemlidir:

1. Atipik pigment ağı
2. Düzensiz noktalar / globüller
3. Düzensiz çizgiler
4. Düzensiz pigmentasyon
5. Regresyon yapıları (skar benzeri alanlar)
6. Mavi-beyaz perde
7. Vasküler patern (36).

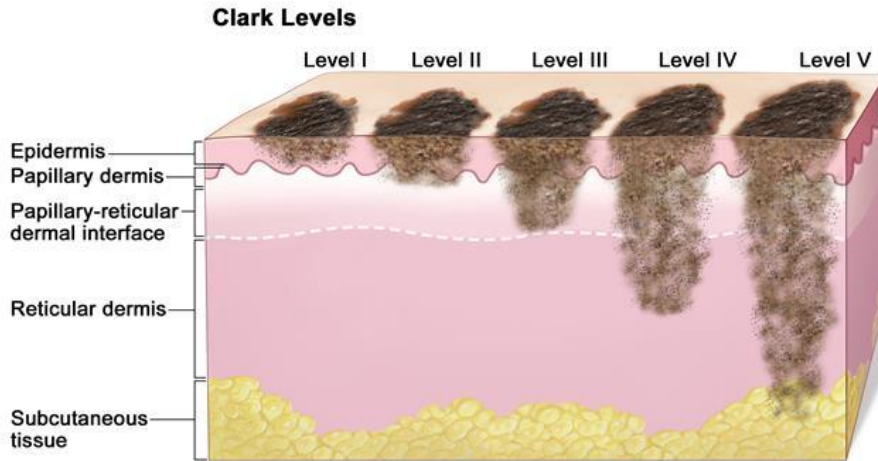
Malign melanomun ayırıcı tanısında bileşik nevüs, intradermal nevüs, mavi nevüs, pigmente BCC, piyojenik granulom, seboreik keratoz yer alır.

Klinik olarak şüphe doğuran tüm lezyonlar hem kesin tanı konulması, hem de prognozun belirlenmesi için biyopsi alınarak histopatolojik incelenmeye gönderilmelidir. Lezyonun yerleşim yeri ve büyüklüğüne göre insizyonel ve eksizyonel

biyopsi alınabilir. Eksiyonel biyopsinin 1-3 mm sağlam sınırla, elliptik şekilde, insizyon lenfatik akıma paralel kalacak şekilde alınması önerilir. İnsizyonel biyopsi veya punch biyopsi tam kalınlıkta alınmalıdır. Histopatolojik inceleme tanı konulması için altın standarttır (36,56).

Patoloji raporunda Clark derinliği, Breslov kalınlığı, büyüme fazı, ülserasyon, mitotik aktivite, tümörü infiltre eden lenfosittik cevap, mikroskopik satellit, regresyon bulguları, perinöral invazyon, kan-damar invazyonu, lenfatik invazyon ve cerrahi sınırlar yer almaktadır.

Tümörün derinliği prognozla yakından ilişkilidir. Clark evrelemesi tümörün penetrasyon derinliğini gösterir.



Şekil 4: Clark evrelemesi

Level 1: İn situ malign melanom, epidermiste sınırlı lezyondur.

Level 2: Tümör papiller dermise uzanım göstermektedir.

Level 3: Papiller dermisen tamamı tümör hücreleriyle infiltredir ancak retiküler dermise uzanmamaktadır.

Level 4: Retiküler dermise invazyon vardır.

Level 5: Lezyon subkutan dokuya ulaşmıştır.

2.1.1.6 HİSTOPATOLOJİK ALT TİPLER

Morfolojik olarak malign melanom 4 grupta sınıflandırılır:

1. Yüzeyel Yayılan Melanom
2. Nodüler Melanom
3. Lentigo Malign Melanom
4. Akral Lentiginöz Melanom

1. Yüzeyel yayılan melanom

Vakaların yaklaşık %70'ini oluşturan en yaygın melanom tipidir. Güneşe aralıklı maruz kalma ile ilgilidir. Yüzeysel yayılan melanomlar de novo veya nevus ile ilişkili olarak ortaya çıkabilir. Klinik bakış açısından, bu kanser ten rengi kahverengi, gri, siyah, mor, pembe ve nadiren mavi veya beyaz gibi çeşitli renkleri gösterir. Lezyon taslağı genellikle bir veya daha fazla düzensiz yarımada benzeri çıkıntılarla keskin bir şekilde sınırlanır. Yüzey, deri yüzeyinin üzerinde birkaç milimetre uzayan palpe edilebilir bir papül veya nodüle sahip olabilir (21,36).

2. Nodüler malign melanom

Melanomların %15-30'nu oluşturur ve en sık olarak yaşamın beşinci veya altıncı on yılında hastaların gövde ve ekstremitelerinde oluşur; Erkeklerde kadınlardan daha yaygındır. Nodüler melanomlar sıklıkla ülsere olur. Radyal büyüme fazı yoktur, ancak daha hızlı büyüme ve daha yüksek metastaz oranı ile korele olan sadece vertikal büyüme fazına sahiptir. Klinik olarak, nodüler malign melanom nisbi düzgün kahverengi, siyah veya mavi-siyah bir renge sahiptir. Düzgün yüzeyli bir nodül, ülsere bir polip olarak veya düzensiz dış hatlara sahip kabarık bir plak şeklinde olabilir (21,36).

3. Lentigo malign melanom

Kutanöz melanomların %4 ila %5'ini oluşturur ve uzun süreli güneş maruziyeti ve artan yaş ile ilişkilidir. Histolojik olarak, epidermin bazal tabakalarına lokalize olan hücrelerin proliferasyonu ile karakterizedir. Prekürsör lezyonların (lentigo maligna-Hutchinson çizgileri) invaziv kansere dönüşmeleri yıllar (10-50 yıl) aldığı için lentigo

malign melanom öncelikle yaşlılarda; sıklıkla boyunda, başta ve kollarda görülür. Yüzeysel yayılan malign melanom ve nodüler malign melanomdan daha iyi prognoza sahiptir (57).

4.Akral lentiginöz melanom

Melanomların %5'ini oluşturur, ancak Asya, İspanyol ve Afrikalı hastalar arasında en sık görülen melanom türüdür. Bu alt tip genelde el içinde, ayak tabanında, tırnak altlarında ortaya çıkar. Proksimal tırnak çizgisini tutması ile ortaya çıkan lezyona Hutchinson's işareti denir. Bazen tırnak altında yerleşen melanom tırnağın fungal enfeksiyonu ile karışarak tanı konulmasında gecikmeye neden olabilir (36).

Nadir Görülen Melanom Tipleri

Desmoplastik melanom

Desmoplastik malign melanom daha çok baş ve boyunda, daha nadir konjunktiva, gingiva, genital bölge ve perianal bölgede gelişir. Altıncı ve yedinci dekatta erkeklerde daha sık görülmektedir. Klinik olarak, desmoplastik melanoma amelanotik olabilir ve güneş hasarlı bir deride veya bir dermal nodül üzerinde pigmentasyon ile ortaya çıkan eritematöz, soluk veya ten rengi nodül veya plak olarak mevcut olabilir. Desmoplastik melanomlar diğer malign melanom türleri ile ilişkili olarak da ortaya çıkabilirler. Bu kanser sık perinöral invazyon nedeniyle yüksek nüks oranları ile karakterizedir. Lokal rekürrens sıklığı yüksektir, ancak nadiren lenf nodlarına metastaz yapar; Bununla birlikte, akciğerlere metastaz eğilimi vardır (21).

Uveal melanom

Uveal melanom gözdeki iris, silier cisim ve koroiddeki melanositlerden köken alan bir tümördür. Nadir görülmesine rağmen en sık rastlanan intraoküler kanserdir. Göz lenfatik ağdan fakir olduğundan hematojen metastaz yapma eğilimindedir. Karaciğer metastazları sık görülür (58).

Balon hücreli melanom

Nükleer pleomorfizm ve mitozlar gösteren melanomun kötü prognoza sahip nadir bir histolojik varyantıdır (21,59).

Malign melanomun mukozal melanom, malign mavi nevüs, nevoid melanom, küçük hücreli melanom, spitzoid melanom, amelanositik melanom, miksoid melanom, rabdoid melanom, osteoid melanom, bazomelanositik melanom gibi nadir rastlanan histolojik alt tipleride vardır (21).

2.1.1.7. EVRELEME

Kutanöz melanomlar için evreleme sisteminin 7. Baskısı AJCC (American Joint Committee of Cancer) tarafından 2009 senesinde yapılmış ve 2010 senesinde uygulamaya girmiştir. 01.02.2016 tarihinde AJCC tarafından 8.baskı yayınlanmış ve 01.01.2018 tarihinden itibaren uygulanmaya başlanmıştır.

AJCC tarafından tanımlanmış TNM sınıflaması (8.baskı 2016)

Primer tümör (T) sınıflaması

Tablo 4: Cilt Melanomunda Tümör (T) evrelemesi.

T sınıflaması	Kalınlık	Ülserasyon durumu
TX: tümör kalınlığı belirlenmemiş	Uygulanamaz	Uygulanamaz
T0: primer tümör kanıtı yok	Uygulanamaz	Uygulanamaz
Tis (<i>melanoma in situ</i>)	Uygulanamaz	Uygulanamaz
T1	≤1.0 mm	Bilinmiyor veya belirtilmemiş
T1a	<0.8 mm	Ülserasyon yok
T1b	<0.8 mm 0.8-1.0 mm	Ülserasyon var Ülserasyon var veya yok
T2	>1.0 – 2.0 mm	Bilinmiyor veya belirtilmemiş
T2a	>1.0 – 2.0 mm	Ülserasyon yok
T2b	>1.0 – 2.0 mm	Ülserasyon var
T3	>2.0 – 4.0 mm	Bilinmiyor veya belirtilmemiş
T3a	>2.0 – 4.0 mm	Ülserasyon yok
T3b	>2.0 – 4.0 mm	Ülserasyon var
T4	>4.0 mm	Bilinmiyor veya belirtilmemiş
T4a	>4.0 mm	Ülserasyon yok
T4b	>4.0 mm	Ülserasyon var

- Primer melanoma kalınlığı ve ülserasyon T kategorisini tanımlar, fakat tümör kalınlığı 0.01mm değil 0.1mm yakınlığında ölçülür.
- T1a ve T1b revise edilmiş, T1a <0.8 mm ülserasyonsuz tümörü tanımlarken, T1b 0.8 – 1 mm ülserasyon var veya yok ve <0.8 mm ülserasyonlu tümörü tanımlamaktadır.
- Mitotik oran artık bir T1 kategorisi kriteri değildir, ancak tüm invazif birincil melanomlar için belgelenmelidir.
- T0 tanımı açıklığa kavuşturulmuştur: Bir primer tümör kanıtı olmadığında ya da primer tümörün yeri bilinmediğinde (örn., Bilinen primer tümör bulunmayan bir aksiller metastaz gösteren bir hastada) T0 kullanılmalıdır.
- Tis (melanoma in situ), TX (tümör kalınlığı belirlenmemektedir) olarak kullanılıyor (56,60).

Rejyonel lenf nodu (N) sınıflaması

Tablo 5: Rejyonel lenf nodu (N) sınıflaması.

Uzak veya rejyonel lenf nodu ve/veya metastazı		
N sınıflaması	Tutulan lenf nodu sayısı	İn-transit, satellit ve/veya mikrosatellit metastazlar
Nx	Rejyonel lenf nodları belirlenmemiş	Yok
N0	Tutulan lenf nodu yok	Yok
N1	1 lenf nodu tutulmuş veya lenf nodu tutulmadan in-transit, satellit ve/veya mikrosatellit metastazlar	
N1a	1 klinik olarak gizli	Yok
N1b	1 klinik olarak belirgin	Yok
N1c	Rejyonel lenf nodu tutulumu yok	Var
N2	2 veya 3 lenf nodu tutulmuş veya lenf nodu tutulmadan in-transit, satellit ve/veya mikrosatellit metastazlar	
N2a	2 veya 3 klinik olarak gizli	Yok
N2b	2 veya 3 klinik olarak belirgin	Yok
N2c	1 klinik olarak gizli veya belirlenmiş lenf nodu	Var
N3	4 veya daha fazla lenf nodu tutulmuş veya lenf nodu tutulmadan in-transit, satellit ve/veya mikrosatellit metastazlar	
N3a	4 veya daha fazla klinik olarak gizli	Yok
N3b	4 veya daha fazla klinik olarak belirgin	Yok
N3c	2 ve ya daha fazla klinik olarak gizli veya belirgin lenf nodu veya hasarlı(matted nodes) lenf nodu varlığı	Var

- Metastaz içeren bölgesel lenf düğümlerinin sayısı korunuyor.
- Önceden ampirik olarak tanımlanmış “mikroskobik” ve “makroskobik” tanımlayıcılar “klinik olarak gizli” (yani sentinel nod biyopsisinde belirlenen nodal metastazlı klinik evre I-II) ve “klinik olarak belirgin” bölgesel düğüm hastalığı (klinik evre III) olarak yeniden tanımlanmıştır.
- Mikrosatellitlerin, satellitlerin veya intransit metastazların varlığı, eğer varsa tümörle ilişkili bölgesel lenf düğümlerinin sayısına göre N1c, N2c veya N3c olarak kategorize edilir.
- “Bariz” ektranodal genişleme artık N evreleme kriteri olarak kullanılmamaktadır (ancak “hasarlı düğümlerin varlığı” korunmaktadır) (56,60).

Uzak metastaz (M) sınıflaması

Tablo 6: Uzak metastaz (M) sınıflaması.

M sınıflaması	Anatomik bölge	LDH seviyesi
M0	Uzak metastaz kanıtı yok	Uygulanamaz
M1	Uzak metastaz kanıtlı	Aşağıya bakınız
M1a	Uzak cilt metastazı, kas dahil yumuşak doku metastazı, uzak lenf nodu metastazı	Belirtilmemiş
M1a(0)		Yükselmemiş
M1a(1)		Yükselmiş
M1b	Akciğer metastazı M1a ile birlikte veya tekbaşına	Belirtilmemiş
M1b(0)		Yükselmemiş
M1b(1)		Yükselmiş
M1c	Santal sinir sistemi dışında visseral organ metastazı M1a veya M1b ile birlikte veya tekbaşına	Belirtilmemiş
M1c(0)		Yükselmemiş
M1c(1)		Yükselmiş
M1d	Santral sinir sistemi metastazı M1a, M1b veya M1c ile birlikte veya tek başına	Belirtilmemiş
M1d(0)		Yükselmemiş
M1d(1)		Yükselmiş
<ul style="list-style-type: none"> • Serum laktat dehidrojenaz (LDH) • (0) LDH yükselmemiş • (1) LDH yükselmiş 		

- M1, uzaktaki metastatik hastalığın anatomik bölgesi ve tüm anatomik bölge alt kategorileri için serum laktat dehidrogenaz (LDH) değeri ile tanımlanmaktadır.
- M alt kategorilerinde uzak anatomik hastalık yerlerinin tanımları açıklığa kavuşturulmuştur.
- Uzak hastalıkların tüm siteleri için LDH değerlerini (“yükseltilmemiş” için “0” ve “yükseltilmiş” için “1” olarak belirlenmiş) sağlayan M1 alt kategori tanımına eklenmiştir; örneğin, yüksek LDH'li deri / yumuşak doku / nodal metastazlar M1c değil, M1a (1)'dir.
- Santral sinir sistemine (SSS) uzak metastaz eklemek için yeni bir M1d eklenir; M1c artık SSS metastazını ifade etmiyor.
- Artık M1c yüksek LDH seviyesini tanımlamaz (56,60).

Tablo 7: Klinik evreleme (cTNM).

	T	N	M
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre Ia	T1a	N0	M0
Evre Ib	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
Evre IIa	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
Evre IIb	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
Evre IIc	T4b	N0	M0
Evre III	Her hangi T, Tis	≥N1	M0
Evre IV	Her hangi T	Her hangi N	M1

- Evre III gruplandırmaları yeniden tanımlanmış ve bir evre IIID alt grubunun eklenmesiyle üç iken dört alt gruba yükseltilmiştir. Evre III hastalık heterojen sonuçlarla ilişkilidir; Beş yıllık sağkalım oranları evre IIIA'da %93'ten evre IIID'de %32'ye kadar değişmektedir.

Tablo 8: Patolojik evreleme (pTNM).

	T	N	M
Evre 0**	Tis	N0	M0
Evre IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
Evre IB	T2a	N0	M0
Evre IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
Evre IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
Evre IIC	T4b	N0	M0
Evre IIIA	T1a/b, T2a	N1a, N2a	M0
Evre IIIB	T0	N1b, N1c	M0
	T1a/b, T2a	N1b/c, N2b	M0
	T2b, T3a	N1a/b/c, N2a/b	M0
Evre IIIC	T0	N2b/c, N3b/c	M0
	T1a/b, T2a/b, T3a	N2c, N3a/b/c	M0
	T3b, T4a	Her hangi N \geq N1	M0
	T4b	N1a/b/c, N2a/b/c	M0
Evre IIID	T4b	N3a/b/c	M0
Evre IV	Her hangi T, Tis	Her hangi N	M1

Sentinel lenf nodu biyopsisi (SLNB)

SLNB risk sınıflamasında evre I-II hastalarda subklinik nodal metastazların belirlenmesi için yapılan minimal invaziv prosedürdür. SLNB pozitif hastalar tamamlayıcı lenf nodu biyopsisi ve / veya adjuvan kemoterapi için adaydırlar. SLNB teknik bakımdan preoperatif dinamik lenfosintigrafi, intraoperatif izosulfan mavisi veya metilen mavisi ve gama prob kullanarak birincili lenf nodunun belirlenmesine dayanır. Medikülöz patolojik inceleme ile mikrometastazlar belirlenebilir. Mikrometastazlar rutin hematoksilin ve eosin (H&E) boyası ile belirlenemezse seri kesitler ve immunohistokimyasal (HMB-45 ve /veya Melanin-A) boyama uygulanmaktadır (56).

Prospektif randomize çalışmalar tamamlayıcı disseksiyonla karşılaştırıldığında SLNB'nin daha az risk oluşturduğunu göstermektedir (61). SLNB komplikasyonları yara ayrışması ve enfeksiyon, seroma /hematom, sinir hasarı, lenfödem, trombofilebit,

derin ven trombozu ve trombozis olarak sıralanabilir (61,62). Başta lenfödem olmakla komplikasyon riski aksilla ve boyunla kıyaslandığında kasıkta daha yüksektir (63).

SLNB yapılan hastalarda primer tümör özellikleri (Breslow kalınlığı, Clark seviyesi, mitotik indeks, ülserasyon, lenfosit infiltrasyonu, anatomik bölge) ve hasta özellikleri (yaş, cinsiyet) prognozu etkiler. İnce tümörlerde SLNB endikasyonları farklı çalışmalarda tartışmalı sonuçlar ortaya koymaktadır. Tümör kalınlığı 0.75mm olan hastada SLN metastaz oranı %2.7 iken, tümör kalınlığı 0.75-1 mm olan hastada bu oran %6.2 olarak belirtilmiştir (56,64). Orta kalınlık 1-4 mm: nodal metastaz riski %8'den %30'a yükselir ve bu hastalara SLNB'nin önerilmesi gerektiği konusunda bir fikir birliği vardır (65)(66). Kalınlık > 4 mm olan hastalarda uzak metastaz riski vardır ve lenf nodu metastazı riski %40 civarındadır, prognozu belirleme açısından önem ettiği için > 4 mm melanomlarda da SLNB yapılması önerilmektedir (67).

2.1.1.8 TEDAVİ

1.CERRAHİ TEDAVİ

Geniş eksizyon

Cerrahi eksizyon malign melanom için birinci tedavi seçeneğidir. Cerrahi eksizyonun ekonomik oluşu ve histopatolojik inceleme için materyal elde edilmesi avantaj sağlamaktadır. Cerrahi eksizyon mümkün kadar doku ve fonksiyon koruyucu olmalı, maksimal kozmetik sonuç elde edilmelidir. Bunun yanısıra cerrahi eksizyonda dikkat edilmesi gereken en önemli nokta negatif cerrahi sınırlardır.

Tablo 9: Primer melanomda geniş eksizyonun önerilen cerrahi sınırları.

Primer melanomda geniş eksizyonun önerilen cerrahi sınırları (56)	
Tümör kalınlığı	Önerilen cerrahi sınır
İn situ	0.5 – 1.0 cm
≤ 1.0 mm	1.0 cm
>1.0 – 2 mm	1 – 2 cm
>2.0 – 4 mm	2.0 cm
>4 mm	2.0 cm

Cerrahi sınırlar anatomik bölge ve fonksiyon göz önünde bulundurularak modifiye edilebilir.

İn situ malign melanomda altın standart tedavi cerrahi eksizyon olsada kozmetik ve komorbit durumlardan dolayı cerrahi yapılamayan hastalarda alternatif tedavi olarak topikal tedavi (Imiquimod) ve radyoterapi seçenekleride vardır (56).

Rejional lenf nodu disseksiyon prensipleri

- SLNB positif hastalara uygulanır.
- Positif lenf nodunun yerleştiği bölgeye anatomik tamamlayıcı disseksiyon uygulanır.
- Klinik olarak pozitif veya ≥ 3 inguinofemoral lenf nodu pozitif durumlarında elektif iliak ve obturator lenf nodu disseksiyonu düşünülür.
- Cloquet lenf nodu pozitif veya pelvik BT pozitif olursa iliak ve obturator lenf nodu disseksiyonu endikedir.
- Baş-boyun yerleşimli, parotiste klinik veya mikroskopik lenf nodu tutulumu varsa boyun disseksiyonu ile beraber süperfisial parotidektomi önerilir (56).

2.MELANOMDA RADYOTERAPİ PRENSİPLERİ

Primer hastalık

- Derinliği sınırlanmamış, yakın cerrahi sınırlı desmoplastik melanom
- Ekstensiv nörotropizm
- Lokal ilerleyici hastalık

Rejional hastalık

- **Adjuvan radyoterapi**
 - **Ekstranodal tümör eksizyonu ve /veya :**
 - **Parotid:** ≥ 1 tutulmuş lenf nodu, her hangi ebatlı invazyon
 - **Servikal:** ≥ 2 tutulmuş lenf nodu ve /veya ≥ 3 cm tümörle birlikte lenf nodu
 - **Aksillar:** ≥ 2 tutulmuş lenf nodu ve /veya ≥ 4 cm tümörle birlikte lenf nodu

- **Inguinal:** ≥ 3 tutulmuş lenf nodu ve /veya ≥ 4 cm tümörle birlikte lenf nodu
- **Palyatif:**
 - Rezeke edilemeyen nod, satellite veya intransit hastalık

Metastatik hastalık

- **Beyin metastazları**
 - Primer tedavi amaçlı stereotaktik radyocerrahi
 - Adjuvant tedavi amaçlı stereotaktik radyocerrahi
 - Primer tedavi amaçlı bütün beyin radyoterapi
 - Adjuvant tedavi amaçlı bütün beyin radyoterapi
- **Diğer semptomatik veya potensiyel semptomatik yumuşak doku ve /veya kemik metastazları (56).**

3. MELANOMDA ADJUVAN TEDAVİ

- **Immunoterapi:** Yüksek doz IL-2, INF- α , CTL-4 antikorları, ipilimumab,
- **Hedeflenmiş tedaviler:** BRAF inhibitörleri (sorafenib, vemurafenib, dabrafenib), MEK inhibitörleri (trametinib)
- **Kemoterapi:**
 - Tek ajan:** dakarbazin, temozolamid
 - Kombine kemoterapi:** CVD (sisplatin, vinblastine, dakarbazin) (56)

2.1.1.9 PROGNOZ

Evre 0 melanom (İn situ malign melanom)

İn situ malign melanom dermise invaze olmadığı için metastatik kapasitesi yoktur, fakat lokal nüks riski taşımaktadır. NCCN önerileri doğrultusunda 5 mm sağlam sınırla eksizyon yapılacağı takdirde mükemmel prognoza sahiptir (68).

Evre I ve II melanom

Prognozu etkileyen başlıca faktörler tümör kalınlığı (veya Breslow derinliği), ülserasyon durumu, mitotik indeksidir. T1 melanomlarda 10 yıllık sağkalım %92 iken, T4 melanomda %50 olarak görülmektedir. Ülserasyon durumu karşılaştırdığında T4a'da 5 yıllık sağ kalım %72, T4b tümörde ise 5 yıllık sağkalım %53'e kadar düşmüştür (9). Mitotik indeks en az 1mitozis/mm² olarak ölçülür. Mitotik indeks göz önünde bulundurulduğunda T1 tümörlerde Clark seviyelendirmesi değerini kaybeder. Mitotik indeksin prognostik değeri T1 tümörlerde risk değerlendirilmesi için daha fazla önem arz etmektedir. Mitotik indeks tümör kalınlığı ile doğru orantılıdır (68,69). T1 melanomlarda mitotik indeks 1/mm² olduğu zaman 10 yıllık sağkalım %95 iken, mitotik indeks 1/mm²'den yüksek olduğu zaman %88'e kadar düşüyor (69).

Evre III melanom

Evre III melanom nodal metastaz, in-transit metastaz veya satellit metastaz olan hastalığı tanımlamaktadır. 5 yıllık sağkalım evre III non-ülser primer melanomda %70'den tek noda mikrometastaz ve intransit metastaz veya satellit metastaz varlığında veya %39'a düşmektedir (68). Nodal mikrometastaz olan evre III hastalıkta ek olarak mikrometastaz olan lenf nodu sayısı, ülserasyon durumu, tümör kalınlığı ve anatomik bölgede sağkalımı etkilemektedir (70).

Evre IV melanom

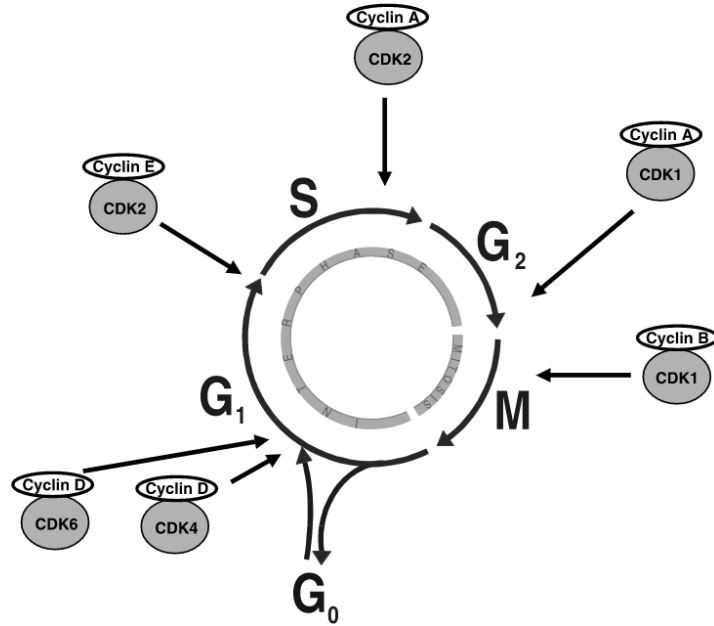
Evre IV melanom uzak metastaz olan hastalığı tanımlamaktadır. İmmunoterapi ve hedef seçme tedavileri uygulanmadan önce 1 yıllık sağkalım M1a hastalık için %59dan M1c hastalık için %41'e kadar değişiyordu. Bu istatistiksel göstergeler efektif tedaviler sonrasında değişmiştir. Evre IV M4c BRAF V600 mutasyonu olan hastalarda ortalama yaşam süresi 15.9 ay, 1 yıllık sağkalım %58 olmuştur (43,71).

2.2 HÜCRE SIKLUSU

Hücre bölünmesi esas olarak DNA replikasyonu ve kromozomların iki ayrı hücreye ayrılması ile karakterize iki ardışık süreçten oluşur. Hücre bölünmesi nükleer bölünmenin olduğu mitoz ve iki mitoz arasındaki interfaz evrelerinden oluşmaktadır. Sürekli bölünen hücrelerde siklus G₁-S-G₂ (interfaz) ve M (mitoz) şeklinde

tekrarlanır. Mitoz profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmakla 4 fazdan oluşmaktadır. İnterfaz, hücrenin bölünmeye hazırlandığı ve büyüdüğü evredir. İnterfazın da kendi içinde G_1 , S ve G_2 , aşamaları vardır. G_1 fazında hücre DNA replikasyonu için hazırlanır, RNA ve protein sentezi olur, S fazında DNA replikasyonu olur, G_2 fazı ise hücrenin mitoz için hazırlandığı dönemdir. Hücreler bölünmek için gerekli sinyalleri almadıkları sürece istirahat fazı G_0 'da durmaktadırlar. G_0 'daki hücreler, insan vücudundaki büyümeyen ve çoğalmayan hücrelerin büyük bölümünü oluşturur (53,72).

Bir hücre döngüsü zamanı bir fazdan diğerine geçiş düzenli bir şekilde gerçekleşir ve farklı hücresel proteinler tarafından düzenlenir. Hücre siklusunda G_1 -S geçişinde, G_2 -M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları bulunmaktadır. Hücre siklusu Siklin bağımlı kinazlar (CDK, katalitik altbirim) ve Siklin (CYC, düzenleyici altbirim) tarafından kontrol edilmektedir (Şekil 5) (72).

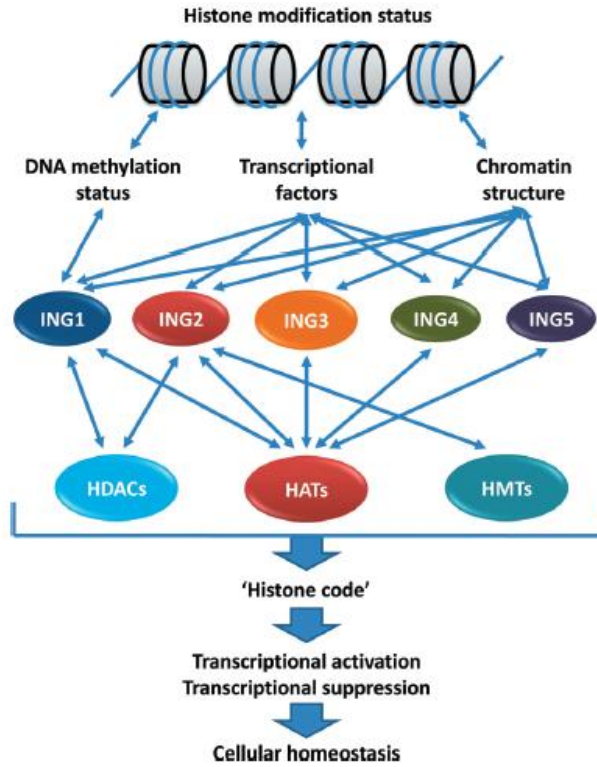


Şekil 5: Hücre siklüsünün aşamaları.

Homeostasis; hücre çoğalması, büyümenin durdurulması ve apoptozis (programlı hücre ölümü) ile sürdürülmektedir. Hücre büyümesi ve ölüm arasındaki dengenin bozulması hiperplazi veya neoplaziye neden olur (73).

2.3 ING (Inhibitor of Growth) GEN AİLESİ

ING gen ailesi proteinleri tümör supressor olarak tanılanmaktadır (74). ING proteinlerinin histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzim kompleksinin bir komponenti olması ING gen ailesinin gen transkripsiyonunda düzenleyici rol aldığını düşündürmektedir. ING ailesinin tüm major formları p53'ü aktive eder. Bu direkt yolla olabileceği gibi, indirekt olarak p53 yolağındaki MDM2, ARF, p300 ve p21 üzerinden de olabilir. ING proteinleri ekspresyonundan tümör baskılanmasına giden çok çeşitli yollar bulunur (75). Ek olarak, doku kültüründe gerçekleştirilen aşırı-ekspresyon çalışmalarının sonuçları, ING proteinlerinin bir kaçının, p53 tümör baskılayıcı protein ve / veya nükleer faktör-kappa B (NF-κB) protein kompleksi ile etkileşebildiğini göstermiştir. ING ile ilişkili proteinler, DNA onarımı, hücre büyümesi ve sağkalm, enflamasyon ve tümör baskılanması dahil olmak üzere birçok köklü rollerde oynadığı ve gen transkripsiyonunu modifiye etme yeteneği, ayrıca p53 ve NF-κB aktivitesini değiştirme yeteneklerinin olduğu bildirilmiştir (76).



Şekil 6: ING ailesi proteinlerinin inhibitörünün aracılık ettiği bir sinyal yollarının modeli.

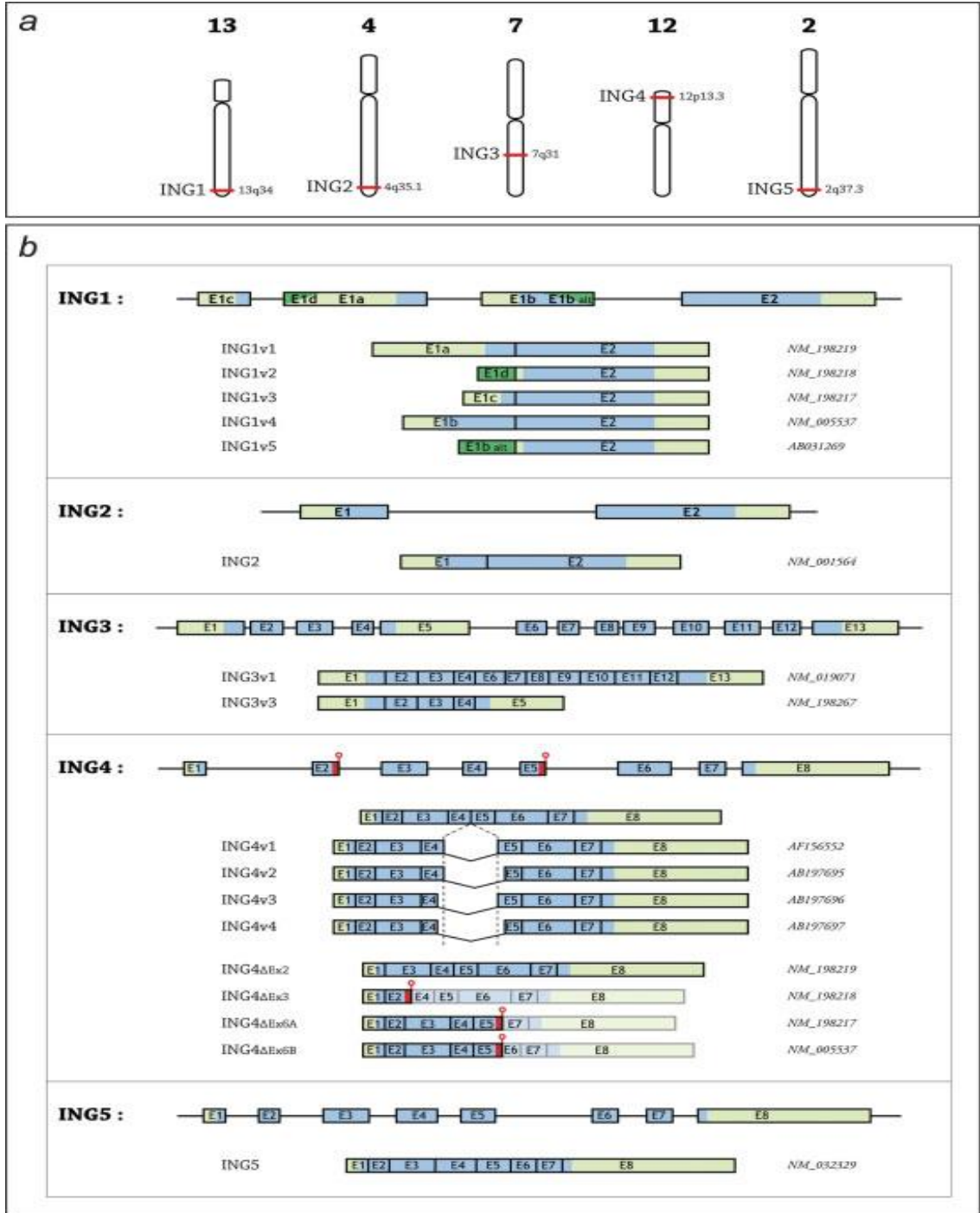
Kanser, nihai olarak malign karakterlere yol açan çoklu mutasyonları biriktiren hücreler tarafından başlatılan karmaşık bir genetik hastalıktır. Neoplastik hücreler bölünürken, hücreye çeşitli selektif avantajlar sağlayan değiştirilmiş fenotiplerle sonuçlanan genetik veya epigenetik değişimler biriktirirler. Kanserde değişmiş bir anahtar gen sınıfı, tümör baskılayıcılarıdır. Tümör baskılayıcı proteinlerin, hücre döngüsü durdurması, hücre yaşlanması, DNA onarımı, sinyal iletimi ve apoptoz dahil olmak üzere çok sayıda hücresel işlemi düzenlediği bulunmuştur. Çok çeşitli düzenleyici etkiyi yansıtan tümör süpresör genler dış büyüme sinyallerini hücrelere ileten proteinlerin, nukleus ve sitoplazmadaki diğer enzimlerin işlevlerini düzenleyen kinazların, hücre büyümesi, bölünmesi ve hayatta kalması ile ilgili düzenleyici proteinlerin transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu değiştirebilir (76).

2.4.1. ING GEN AİLESİ ÜYELERİ, YAPISAL ÖZELLİKLERİ VE FONKSİYONLARI

Tüm ING gen üyeleri fetal ve yetişkin dokularında ekspresse edilir. Çeşitli ING genlerinin ekspresyon seviyeleri, organlar ve gelişim aşamaları arasında farklılık gösterir (76).

ING genlerinin ilk üyesi Garkavtser ve ark.'ları tarafından 1996 yılında yedi meme kanserli olgu ile normal memeli epiteli arasındaki farklılığı ortaya koymak için yaptıkları çalışmada bulunmuş ve genetik süpresör element olarak adlandırılmıştır (77). Bu genetik süpresör elementlerin hücre büyümesi ve transformasyonunda promotör fonksiyonu gördükleri ortaya konulmuş daha sonra yapılan çalışmalarda aynı ailenin %32 ile %76 oranında benzer homolojiye sahip olan 4 farklı üyesi daha (ING2, ING3, ING4, ING5) tanımlanmıştır (53,76).

Tüm ING genleri bağımsız kromozomlar üzerinde haritalanmıştır. ING3 hariç diğer ING genleri, ilgili kromozomlarının subtelomerik bölgesinde bulunurlar (14).



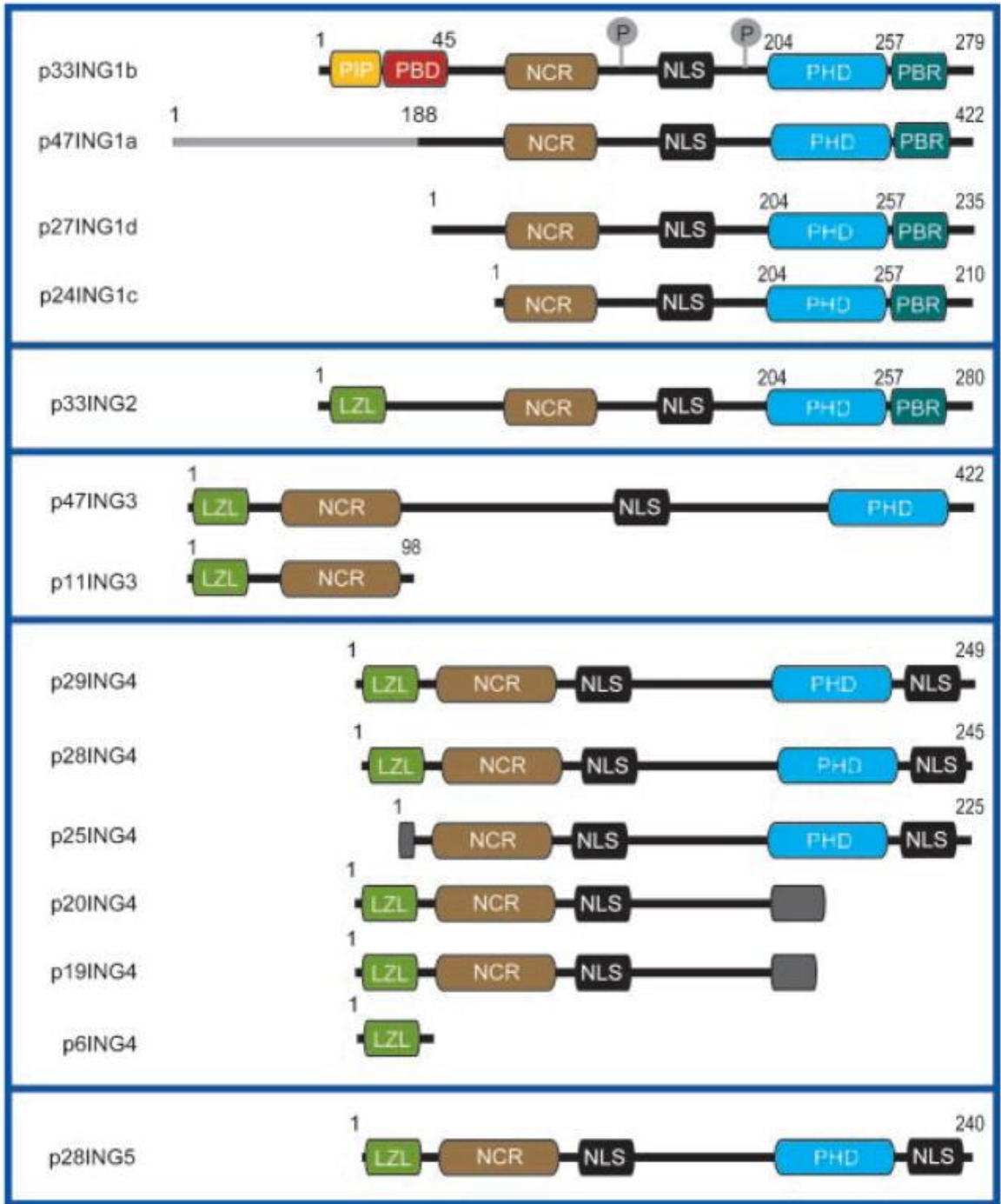
Şekil 7: ING genleri lokalizasyonu, yapısı ve transkriptleri. (a) Kromozomal lokalizasyon. Her ING geni farklı bir kromozom üzerinde ve ING3 hariç olmak üzere subtelerik bölgede bulunur. (b) ING ailesinin genomik organizasyonu ve varyantları. Resimde, E: ekzonları gösteriyor. ING1'in 5, ING2'nin 2, ING3'nin 13, ING4 ve ING5'in 8 ekzonu vardır. Bunların kendi aralarında farklı dizimleri ile izoformlar ortaya çıkar. Mavi bölgeler gen kodlayan, sarılar kodlamayanları, kırmızılar stop kodununun belirtmektedir. ING1v2 ve ING1v5 aynı proteini kodlar (14).

ING1, 13. kromozom 13q33-34 lokusunda yer alır. 4 protein kodlar. ING2, 4. kromozom 4q35.1 lokusunda yer alır. Kodladığı tek protein vardır. ING3, 7. kromozom 7q31 lokusunda yer alır. 2 farklı protein kodlar. ING4, 12. kromozom 12p13.3 lokusunda yer alır. 8 farklı protein kodlayabilir. En son bulunan ING5 ise 2. kromozom 2q73.3 lokusunda yer alır. Sadece 1 protein kodlar (78).

ING proteinleri C-terminal uçta yerleşen Plant Homedomain (PHD), Nuclear Localization Signal (NLS) ve fonksyonu net olarak belirlenmeyen Novel Conserved Region (NCR)'den oluşmaktadır. PHD alanı yaklaşık olarak 60 amino asit içerir ve tipik olarak iki Zn^{2+} iyonunu bağlar. Hali hazırda, insan veya farede kaç tane PHD proteininin bulunduğu bilinmemesine rağmen, insanlarda yaklaşık olarak 150 farklı PHD alan taşıyan proteinin ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (79). Büyük kromatin yeniden şekillendirme komplekslerinin bilinen bileşenleri olan proteinlerde sıklıkla bulunduğundan PHD alanlarının kromatin yeniden biçimlenmesinde yer aldığı görülmüştür (80–82).

Tüm ING proteinleri bir NLS içerir ve bazı ING proteinlerinin çoklu NLS'ye sahip olduğu görülmektedir. Bugüne kadar, NLS'nin rolü sadece ING1 için kapsamlı olarak incelenmiştir (83). NLS delesyonu proteinin sitoplazmik akümülyasyonuna neden olmaktadır. ING proteinlerinin çekirdeğe lokalizasyonu, işlevlerinde kritik öneme sahiptir. Bazı kanserlerde ING1'in nuklear boyanmasının kaybı görülmüştür (76,84)

Ayrıca ING proteinlerinden ING 2-5 arasındakilerin N-terminalinde LZL olarak adlandırılan (Leucine Zipper-Like) 4-5 adet lösin veya izolösin içeren hidrofobik alan bulunmaktadır (85). LZL, proteinin N-ucuna yakın bir hidrofobik yüz oluşturma potansiyeline sahip, dört ila beş korunmuş lösin veya birbirinden yedi amino asitten oluşan izolösin kalıntılarından oluşur. ING2'nin LZL motifinin nükleotid eksizyonu onarımı ve apoptozis indüksiyonu için gerekli olduğunu göstermiş olsa da, bu LZL ile ilişkili fonksiyonların daha fazla deneyle kanıtlanması gerekmektedir (76,86).

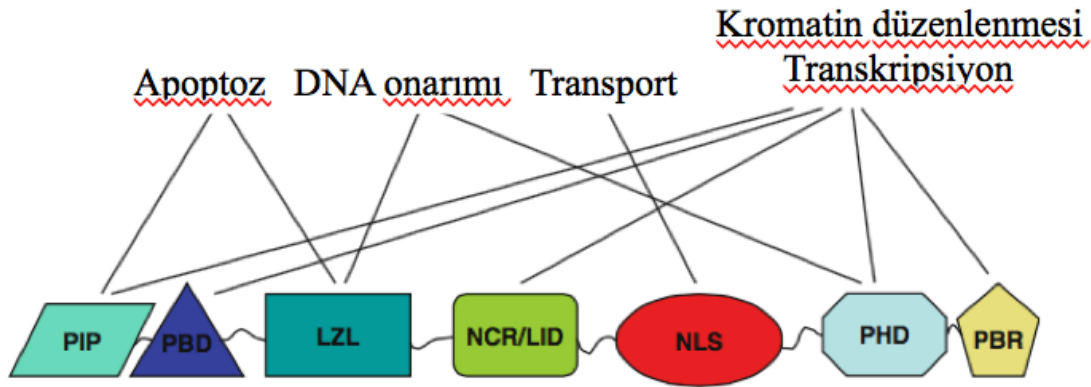


Şekil 8: İnsan ING gen alanları. Her ING proteini üç korunan alandan oluşmaktadır : PHD, NCR ve NLS. NLS p53'e bağlanma noktası olarak bilinmektedir. Leucine Zipper-Like (LZL) alan ING 2-5'te bulunmaktadır. Bu alan hakkında çok az şey bilinmektedir, ancak ING2'nin DNA onarımı ve apoptozda işlev görme yeteneğini etkilediği bildirilmiştir. ING1 ek olarak Partial Bromodomain (PBD) ve PNCA- Interacting Proteiin motif (PIP) alanlarına sahiptir. PBD alanının mSin3-HDAC kompleksinin SAP30 alt birimine bağlandığı görülmektedir. ING1 ve ING2'nin her ikisi de fosfoinositid bağlanmasına dahil olduğu düşünülen bir Poly Basic Region (PBR)'a sahiptir. Fare ING proteinleri için alan yapıları karakterize edilmemiştir.

Filogenetik analizler, sıçanlar, kurbağalar, balıklar, sivrisinekler, meyve sinekleri, solucanlar, mantarlar ve bitkiler dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda yeni ING aile üyelerini tespit etmiştir (87).

ING3 haricindeki tüm ING genleri kromozomların uçlarının yakınında bulunur ve ING5'in işlevi ve ifadesi telomer erozyonundan etkilenebilir. ING1 aynı PHD alanını içeren üç izoforma sahiptir. p33ING2, p33ING1b ile %60 özdeşlik paylaşır ve bir 33-kDa proteinini kodlar. ING1b ile karşılaştırıldığında ING2, hidrofobik protein-protein etkileşimlerine aracılık ettiği düşünülen, ekstra ve benzersiz bir LZL alanı içerir. p29ING4 ve p28ING5, % 72.8 kimlik ile oldukça benzerdir (88). Çeşitli çalışmalar ING ailesi proteinlerinin biyolojik işlevlerini spesifik moleküler partnerlerle olan ilişkileri aracılığıyla kullandıklarını ileri sürmektedir. ING ailesi üyeleri, nükleer NLS ve değişken bir N-terminal bölgesini içeren korunmuş bir merkezi bölge olan PHD'yi paylaşırlar.

Son araştırmalar ING fonksiyonlarının ING gen ekspresyonu düzeyinde düzenlenebileceğini ortaya çıkarmıştır. ING proteinlerinin aktivitesi, posttranslasyonel modifikasyonlar yoluyla da düzenlenebilir (76).



Şekil 9: ING ailesinde bulunan bazı moleküler kısımlar ve etkileri (14).

PIP kutusu PCNA'ya bağlanır ve ING1 aracılı apoptosisi teşvik eder. PBD ve NCR / LID, SAP30, HDAC ve HAT'a bağlanır ve faaliyetlerini düzenler. DNA onarımı ve apoptozis indüksiyonu için ING2'nin LZL alanı gereklidir. NLS, ING proteinlerini ING1 için fonksiyonel bölgelerine, çekirdeklerine ve / veya nükleoluslarına hedeflemek için karyopherin-a ve β transporter proteinlerine bağlanır. Ayrıca, p53 ile etkileşime aracılık ettiği bildirilmiştir (89). PHD, HAT ve / veya HDAC aktivitesinde rol oynar, bu

da daha sonra belirli lokuslarda transkripsiyonu düzenleyebilir. Hem PHD hem de PBR PtdInsPs'ye bağlanır, bu da PBR'nin kromatin yeniden biçimlenmesi ve transkripsiyon regülasyonuna dahil olabileceğini düşündürmektedir.

Çeşitli kanıtlar ING proteinlerinin hücre döngüsü ilerlemesini etkileyebileceğini ve hücre döngüsü kontrol noktalarında yer aldığını göstermiştir (90). Bu çalışmaların çoğu ING1 kullanılarak yapılmıştır, ancak ING2-5'i içeren daha az çalışma bu ING proteinleri için benzer roller tanımlamıştır. ING proteinlerinin baskılanmasının hücre yayılmasını arttırdığı, hücre göçünü arttırdığı ve temas inhibisyonunu azalttığı gösterilmiştir (77) Çeşitli çalışmalarından elde edilen sonuçlar, ING proteinlerinin çoğunun uygun p53 fonksiyonu için de gerekli olduğunu göstermiştir (85). Son deneyler ayrıca, NF- κ B'nin düzenlenmesi ve hypoxia inducible factor (HIF) yolağı da dahil olmak üzere ING proteinleri için p53-bağımsız fonksiyonlar olduğunu ileri sürmüştür (91). ING proteinlerinin, kromatin yeniden yapılanma komplekslerinde alt birim olarak işlev gördüğü bulunmuştur (92).

2.4.1.1 ING1 VE FONKSİYONLARI

İnsan fibroblastlarında ING1'in aşırı ekspresyonu, hücre döngüsünün G₀ / G₁ fazında bulunan hücre sayısında %50'lik bir artışa neden olmuştur, ING1'in G₁-S'geçişinde de bir rol oynayabileceğini düşünülmektedir. ING1 G₁/S ve G₂/M fazlarındaki kontrol noktasını oluşturmaktadır. ING1 Siklin-B1'in ekspresyonunun negatif regülatörü olduğundan G₂/M siklusunda düzenleyici role sahiptir. Ayrıca ING1 ekspresyonu Siklin-E ekspresyonu ile ters orantılıdır (76) . ING1'in ekspresyonu hücre siklusu boyunca regüle edilmektedir: G₀ 'dan G₁ fazına geçişte azalmakta, geç G₁ fazında artarak S fazında maksimum düzeylere çıkmakta ve G₂ fazında ise azalmaktadır. ING1, tümör uyarıcılarının tipik özelliklerinin tümü olan UV ile indüklenen DNA hasarı üzerine büyüme düzenlemesi, apoptoz, yaşlanma ve DNA onarımı gibi çoklu hücrel aktivitelere önemli bir rol oynar.

Genlerdeki epigenetik ve genetik değişimlerin iki tipi vardır: biri doğrudan karsinogenezde yer alan birincil 'sorumlu' bir değişimdir, diğeri ise genomun instabilitesi gibi birincil değişimden sonra kollateral olarak meydana gelen ikincil bir 'yolcu' değişimdir.

ING1 ve apoptozis

ING1 ekspresyonu, serum açlığı ile uyarılan apoptozdan önce artar ve ektopik ING1 ekspresyonunun, fibroblastında apoptosisi indüklemek için c-Myc ekspresyonu ile birlikte çalıştığı bulunmuştur, ING1'deki azalma ise apoptozisten korumaktadır (93). Bu sonuçlar ING1'in hücre ölümünü düzenlemede de bir rolü olduğunu göstermektedir. ING1'in izofromlarının apoptozis oluşturmadaki etkinliğide hücrelerin genç veya yaşlı olmasına göre değişmektedir (94). p33^{ing1b} aşırı salındığı durumda TNF- α ile sinerjik etki ile apoptozisi uyarmaktadır. Bu bulgu, NF- κ B sinyalinin hücreleri TNFa ile indüklenen apoptozdan koruduğu için, NF- κ B yolunda p33ING1b'nin dolaylı bir rolünü ortaya koymaktadır (95).

ING1 ve DNA onarımı

UV maruziyetini takiben nükleotid hasarlarının onarımından sorumlu olan Nucleotide Excision Repair (NER) düzenlenmesi de ING1 ile ilişkilendirilmiştir. P33ING1b'nin aşırı ekspresyonu plazmid-DNA'sı aracılığı ile hücre içine verildiği durumlarda Nucleotide Excision Repair (NER) ünitesinin arttığı görülmüştür (76). ING1'in bu fonksiyonunda GADD45 ile olan etkileşimleri sözkonusudur. P33^{ing1b} PHD domain mutasyonlar, Sin3a co-repressor kompleksinin bir komponenti olan Sap30 (Sin3a Associated Protein 30) ile olan etkileşimleri sonucu olarak p33^{ing1b}'nin NER fonksiyonunda bozulmaya neden olduğu radioimmün assay ile gösterilmiştir (111). Bu bilgilerden anlaşıldığı üzere DNA nükleotid hasarlarının onarımında esas olan NER'de temel fonksiyonları ING1'e bağımlı olarak gerçekleşmektedir (53,96).

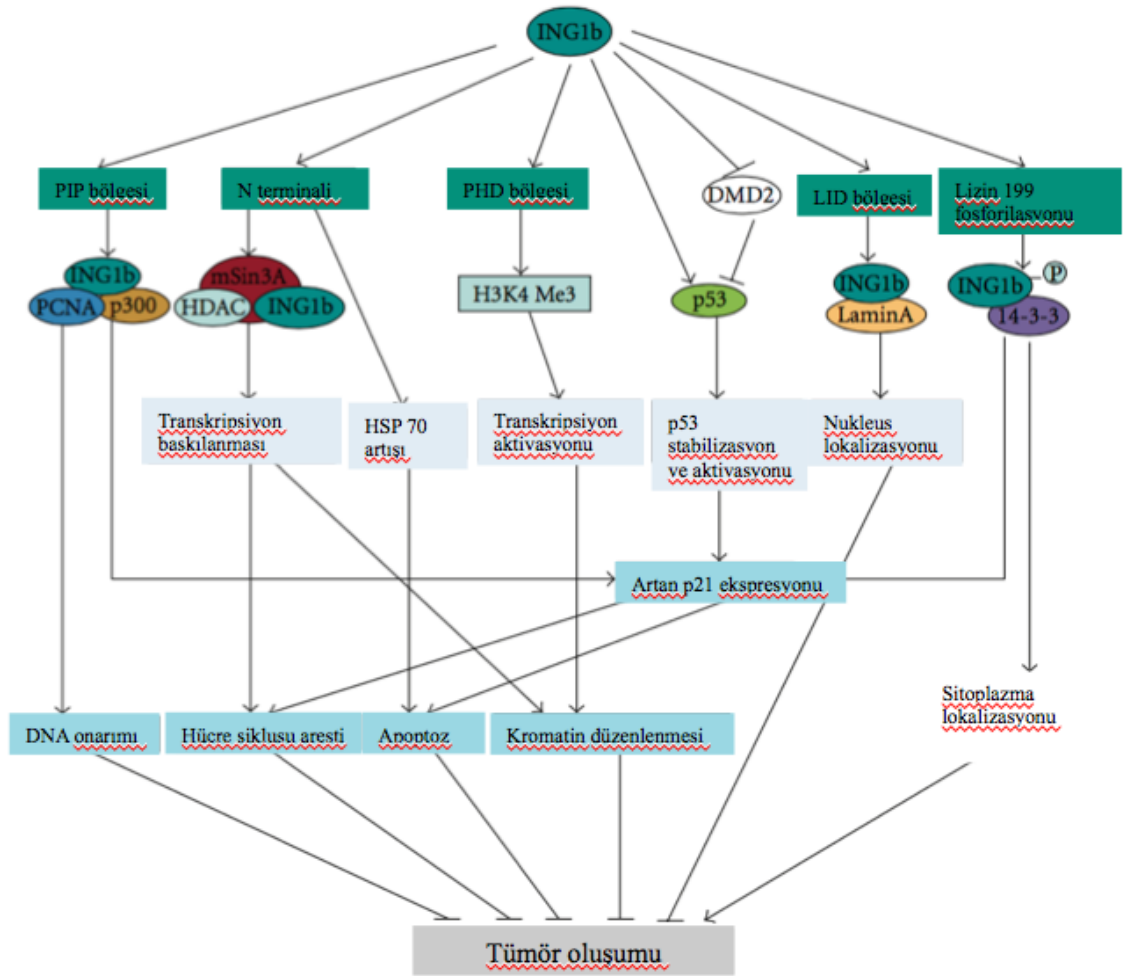
ING1 ve P53

ING proteinleri p53 yolunun düzenlenmesinde rol almaktadır. p53, DNA bütünlüğünün bozulmasına ve / veya çeşitli stres türlerine maruz kalan hücrelerde tepki veren bir tümör baskılayıcıdır (97). DNA hasarını takiben, stres sinyalleri p53 transkripsiyon faktörünü aktive eden ve hücre döngüsü arresti, yaşlanma, DNA onarımı ve apoptozda yer alan çok çeşitli genleri başlatan veya upregüle eden post-translasyonel modifikasyonlar dizisi ile p53 proteinine iletilir. ING proteinlerinin hücre büyümesinin inhibisyonunda p53'e bağımlı olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda p53 transkripsiyon aktivatörü olarak işlev görmesi için ING proteinlerine ihtiyaç duyar (98). Son bulgular

ING1'in ayrıca ARF-MDM2-p53 sinyal ekseninin birkaç bileşenini de düzenleyebileceğini göstermiştir (76,99).

ING1'in P53den bağımsız fonksiyonları

Yapılan bazı çalışmalar sonucu ING1b'nin tamamem p53 bağımsız yollardan da tümör supresör etkisini gösterebileceği fikrini ortaya atmıştır. Tamannai ve arkadaşları; LN229 glioblastom hücrelerinde verilen HDAC inhibitörü trichostatin tedavisi altında; p53 veya p14(ARF)/p16(INK4a)'dan tamamen bağımsız, ING1b'nin artmış ekspresyonuyla H3, H4 histonları asetilasyonu, caspase-3 ve Fas-associated death domain (FADD) aktivasyonu ve artmış apoptozu bildirmişlerdir. Coles ve arkadaşları yaptıkları deneysel çalışmada p53 yokluğunda p37ING1'in DNA hasarı olan hücrelerde apoptozu başlattığını görmüştür (76,100).



Şekil 10: ING1 fonksiyonları (84).

ING1 ve Nf-Kb Yolağı

ING proteinleri Nf-Kb yolağında da dzenleyici olarak rol oynar. NF-κB, proteinlerin IκB ailesi tarafından sitoplazmada tecrit edilen Rel protein ailesi üyelerinden oluşan dimerik bir transkripsiyon faktörüdür (101). NF-κB, lipopolisakkarid (LPS) gibi mikrobiyal patojenlerin bileşenleri ve inflamatuvar sitokinler dahil olmak üzere bir dizi uyararla aktive edilir. Reseptörlerin bu uyarılar tarafından aktivasyonu IκB inhibitör proteininin degradasyonuna ve NF-κB kompleksinin nukleusa translokasyona neden olmakla hücreSEL immün yanıtla ilgili genlerin ekspresyonuna yol açar (102). NF-κB apoptozis, anjiogenezis, metastaz, proliferasyon ve tümör büyümesi ve sağkalımı ile ilgili genlerin ekspresyonunu dzenlediği bilinmektedir. Bununla birlikte, NF-κB'nin mutasyonu, tümörlerde nadiren görülür (103). Son alışmalarda ING1 ekspresyon artışıının ısı-çok protein 70'in (HSP 70) artmasına yol açtığı gösterilmiştir. Isı- çok proteini 70 IκB degradasyonu yaparak NF-κB yolağını süprese eder (76).

2.4.1.2 ING2 VE FONKSİYONLARI

ING2'nin Hücre Büyümesinin Regülasyonu, Apoptozis ve DNA Onarımındaki Fonksiyonu

ING2 ING gen ailesinin ikinci üyesidir ve aminoasit yapısı ING1'e benzemektedir. Shimada ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ING2'nin aşırı ekspresyonu gösterilmiştir (104). ING1 gibi ING2'nin aşırı ekspresyonu p53 modifikasyonu ile apoptozisi indükler ve hücre siklusünü durdurur. Bu sonuçlar ING2'nin tümör süpressor olduğunu kanıtlar (105).

ING2'nin ektopik ekspresyonu RKO hücrelerinde koloni formasyonunu inhibe ettiği ve hücre siklusünü G1 fazında duraklattığı gösterilmiştir, bu sebeplerden ING2'nin hücre büyümesinde rol aldığı düşünölmektedir (105). Son zamanlarda, bir MDM2 inhibitörü olan nutlin-3a ile aktive edilen p53'ün ING2 ekspresyonunu ING2 promoter üzerinde iki p53 bağlanma bölgesine bağlanarak doğrudan düşürdüğü ve normal insan fibroblastlarında yaşlanmaya neden olduğu ortaya çıkmıştır. ING2'nin aşırı ekspresyonu replikatif yaşlanmayı indükler ve RNAi aracılı ING2 down regülasyonu replikatif yaşlanmanın başlangıcını geciktirmektedir (106). Bunun yanısıra son çalışmalar bu sonuçlarla çelişmektedir. hTERT immobilize insan fibroblastlarında

ING2'nin RNAi aracılı ortadan kaldırılması p53 bağımsız yaşlanmayı indüklediği, ING'nin aşırı ekspresyonu ise p53 aracılı yaşlanmayı indüklediği gösterilmiştir (107). Bu çalışmalar ING2'nin hücre yaşlanmasında rol aldığını düşündürsede, ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ING2 hücre proliferasyonunda görev almaktadır. TGF- β , normal epitelde tümör baskılayıcı benzeri fonksiyonlara sahip olan ve aynı zamanda invaziv metastatik kanserlerde onkojenik fonksiyonlara sahip bir protein olduğundan, ING2 normal hücrelerde ve kanserlerde TGF- β 'den farklı sinyallere aracılık edebilir. Son zamanlarda, ING2'nin epitelial hücrelerde TGF- β -bağımlı yanıtların yeni bir aracı olduğu bildirilmiştir. ING2 SnoN ve Smad2 ile etkileşime girerek TGF β 'ya bağlı gen ekspresyonunu destekler ve hücre proliferasyonunu inhibe ediyor (108). Diğer ING gen ailesi üyelerinin TGF β yolağı üzerinden proliferasyona etkileri bilinmemektedir. TGF β hücre proliferasyonu, apoptozis, migrasyon, invazyon ve inflamasyon üzerine etkilidir. ING aynı zamanda etoposid kaynaklı apoptozistede rol almaktadır. Ultraviyole ışınıyla transfekte edilmiş hücrelerde ING2'nin aşırı ekspresyonu apoptozisi artırdığı gösterilmiştir. ING2 aşırı ekspresyon olmuş malign melanom hücrelerinde UVB etkisiyle BCL-2 protein salınımı artar ve BAX'ın mitokondrial translokasyonuna neden olur. Bundan başka, ING2 Fas ekspresyonunu düzenler ve apoptozisin iki yolağı olan intrinsik-mitokondrial ve ekstrinsik-ölüm reseptörü arasında köprü görevini yapar (109). Mutant ING2 gen transdukte edilmiş, leucine zipper-like (LZL) domeni bulunmayan hücrelerde UV takiben apoptozisin artmadığı görülmüştür. Buda ING aracılı apoptozisin LZL domenine ihtiyaç duyduğunu göstermektedir (86).

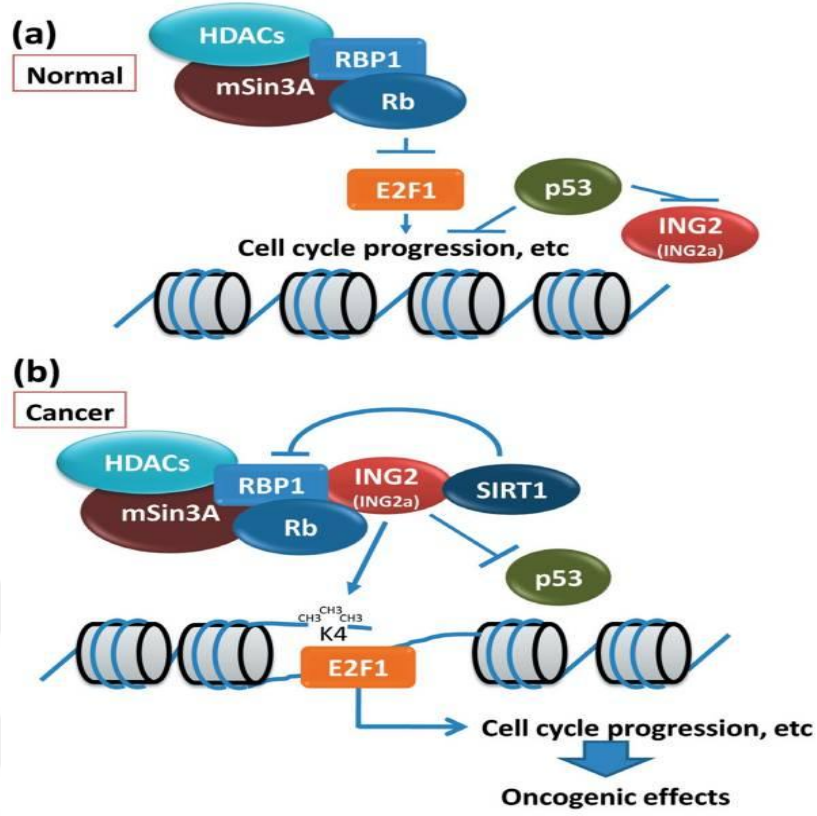
Son zamanlarda yeni bir izoform ING2b tespit edildi; ING2b'den ayırt etmek için orjinal ING2'ye ING2a da denir. ING2b promotörü, ING2a'nın promotörünün aksine, görünür bir p53 bağlama bölgesine sahip değildir. Bu sebepten p53 aktivasyonu sadece ING2a baskılanmasına neden olur. ING2b'nin ortadan kaldırılması hücre büyümesine herhangi katkı sağlamamıştır. ING2a yalnızca p53 varlığında hücre büyümesini engellerken; ING2b hücre büyümesi üzerinde etkili olmayıp hücre çoğalma siklusunda duraklama ve apoptoziste aşağı yönde bir regülasyona neden olmakta ve bunu p53'den bağımsız olarak yapmaktadır. ING2a ve ING2b hücre siklus arresti ve apoptoziste kompensatuar bir rol oynamakta ve belkide kemoterapötiklere rezistanstans

gelişiminde sorumlu olmaktadır. Nutlin-3a ve adriamisininin indüklediği p53 salınımı sonucu ING2a salınımı azalırken ING2b'nin değişmediği gösterilmiştir (110).

İnsan kanserlerinde ING2 ekspresyonu

Yapılan çalışmalarda kolorektal kanser dışında ING2 ekspresyonunun Burkitt lenfomada ve servikal kanserde arttığını gösterse de, baş- boyun SCC'lerinde, kütanöz malign melanomda ekspresyonun azaldığı gösterilmiştir (16,111). Böylece, ING2'nin fonksiyonları muhtemelen kanser tipine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Okano ve ark. tarafından yapılan çalışmada 8 hastada normal bronşial epitel ile karşılaştırıldığında akciğer kanseri hücrelerinde ING2 ekspresyonunun azaldığı görülmüş, fakat bu çalışma tüm akciğer kanserlerinde ING2 ekspresyonunun azaldığını söylemek için yetersizdir (112). Yapılan bir diğer hepatoselüller karsinomda (HCC) ING2 ekspresyon çalışmasında mRNA düzeyinde azalma görülsede, protein seviyelerinde anlamlı azalma görülmemiştir (113).

Kumamoto ve ark. yaptığı çalışmada birçok kanserde ekspresyonu artan antiapoptotik faktör olan NF- κ B ING2 promotoruna bağlanarak ekspresyonunu artırdığını göstermiştir (114). MMP13 bazal membran ve ekstraselüler matriks komponentlerini parçalamakla tümör invazyonunda kritik role sahiptir. ING2-HDAC1-mSin3A kompleksinin in vitro deneylerde MMP13 ekspresyonunu artırarak tümör invazyonunu artırdığı gösterilmiştir (114). HDAC- mSin3A kompleksi gen transkripsiyon supresyonu yaptığı için MMP13 indüksiyonu indirekt sonuç olabilir. ING2, SIRT1 ile etkileşim yoluyla doğrudan HDAC-mSin3A aktivitesini baskılayabilir. SIRT1 RBP1 ilişkili mSin3A – HDAC1 transkripsiyonel baskı aktivitesini inhibe eder ve bunun sonucunda MMP13 ekspresyonunun artmasına neden olur (115). Bu sonuç ING2'nin karsinogenezde onkojenik rollere sahip olduğunu düşündürmektedir (Şekil 11).



Şekil 11: ING2 sinyal yolağının modeli (74). (a) normal hücrelerde Retinol Bağlayıcı Protein (RBP) mSin3-HDAC kompleksinin tümör süpressor olan Retinoblastom (Rb) tarafından aktive edilmesine izin verir ve E2F bağımlı transkripsiyon ve DNA replikasyon kaynaklı hücre döngüsü arrestini indükler. Aynı zamanda tümör supressor gen olan P53 ING2 ve hücre proliferasyonu ile ilgili genlerin supresyonu yoluyla anormal hücre proliferasyonunu gözlemler. (b) Kanser hücresinde aşırı eksprese olmuş ING2 SIRT aracılığıyla E2F2'yi aktive etmekle RBP1'e bağlı mSin3A- HDAC1 aktivitesini baskılar. Aktive E2F hücre proliferasyonunu destekler. Aşırı eksprese ING2 (ING2a), kanserlerin alevlenmesini kolaylaştırmak için p53 fonksiyonlarını baskılayabilir.

2.4.1.3 ING3 VE FONKSİYONLARI

ING3 identifikasyonu ve kanserle ilişkisi

ING3 ING gen ailesinin 3. üyesidir. Baş ve boyun kanserlerinde ve kutanöz melanomada ING3'ün downregülasyon ve anormal hücre içi lokalizasyonu bildirilmiştir (116). Melanomda azalmış nükleer ING3 ekspresyonu, ING3'ün nukleustan sitoplazma kompartmanına belirgin bir translokasyonunu gösteren artmış sitoplazmik ING3 seviyesi ile pozitif ilişkilidir. ING3, bu tip kanserlerdeki tümör baskılayıcısı olarak işlev görebilir. ING3'ün amino asit dizisi, evrimsel olarak beş ING ailesi üyesi arasında en

belirgin olanıdır (87). ING3, diğer ING ailesi proteinleri ile aynı etki alanlarına sahiptir. ING1 gibi ING3 ekspresyonunda %61 ekzokrin pankreas kanserinde, %42 NSCLC'de, %44 primer meme kanserinde azaldığı gösterilmiştir. Displastik nevüsle karşılaştırıldığında malign melanomda %60 nuklear ING3 ekspresyon azalması gözlemlenmiştir (116). Yemin Wang ve ark. tarafından yapılan çalışmada, azaltılmış nukleer ING3 ekspresyonu, birincil melanomdan metastatik melanomaya ilerlemesi ile korelasyon göstermektedir, bu da ING3'ün sadece melanomun başlangıcında değil, aynı zamanda melanoma progresyonunda da rol oynadığını göstermektedir.

ING3'ün apoptozise etkisi

ING3 hücre döngüsü ve apoptozun regülasyonunda rol almaktadır. ING1'e benzer şekilde, RKO hücrelerinde ING3'ün ektojik ekspresyonu, muhtemelen S fazında hücre sayısını azaltarak koloni oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (117). ING3 aşırı ekspresyonu ayrıca Fas ekspresyonunu indükleyerek , Bid, kaspaz-8, -9 ve -3 'in bölünmesini arttırmış ve UV ile muamele edilmiş hücrelerde apoptozisi teşvik ettiği görülmüştür (118). ING2'ye benzer şekilde, bu bulgular ING3'ün ölüm-reseptör / ekstrensek yolunda rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, diğer birçok ING proteininin aksine, ING3 NER'de veya replikatif yaşlanmada rol oynar gibi görünmüyor, p53 ile etkileşime girmiyor ve IR ile indüklenen hücre ölümüne dahil edilmiyor (117).

Aşırı ekspresyon deneylerinin sonuçları her zaman bir proteinin fizyolojik fonksiyonlarını yansıtmaz. UV ile ışınlanmış hücrelerde ING3'ün endojen ekspresyon artışı apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Bununla beraber UV ile indüklenmiş apoptozisin ING3 siRNA tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (74,118).

ING3'ün kromatin remodellinginde rolü

HeLa hücre nukleer ekstraktlarından ING protein içeren komplekslerin biyokimyasal saflaştırılması (Doyon ve ark., 2006), ING3'ün esas olarak, sadece NuA4 / Tip60 HAT kompleksinin bir alt birimi olarak bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Tip 60, p53, NF-KB, Myc, E2F1 ve nukleer reseptöre bağımlı transkripsiyonel aktivasyon için önemli bir transkripsiyonel kofaktördür ve DNA hasarına, apoptozise, metastaz supresyonuna ve embriyonik kök hücre kimliğinin korunmasına hücresel yanıtta rol oynar (76). Tip60 eksik olan fareler, implantasyondan önce embriyojenez sırasında ölür

(E4) ve Tip60 haplo-yetersizliği, transjenik E-Myc farelerinde hızlandırılmış lenfomajenez ile sonuçlanır (119). Bu veriler ING3'ün, NuA4 / Tip60 HAT kompleksi ile olan ilişkisi sayesinde bu farklı süreçlerde de işlev görebileceğini göstermektedir.

2.4.1.4 ING4 VE FONKSİYONLARI

ING4'ün hücrel fonksiyonları

ING4 yapı ve fonksiyon bakımından ING2'e benzemektedir. ING4 ün 4 subtipi vardır. ING4'ün aşırı ekspresyonu hücre döngüsünü G2/M fazında durdurarak hücre proliferasyonunu engeller. Endojen ING4 ekspresyon artışı ise hücrelerin G2/M fazından G1 fazına geçişini kolaylaştırdığı gösterilmiştir (120).

ING3 gibi ING4'de NER düzenlenmesinde rol almaz. Bununla birlikte, RKO hücrelerinde ING4'ün ektopik ekspresyonunun, S fazındaki hücrelerin yüzdesindeki azalmaya bağlı olarak koloni oluşumunu inhibe ettiği bulunmuştur ve ING4 aşırı ekspresyonu, artan Bax ekspresyon seviyeleri ve serum açlığının indüklediği apoptozun up-regülasyonu ile korele olduğu gösterilmiştir (117). Bu bulgular ING4'ün hücre siklusu ve apoptozisile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Bundan başka ING4'ün hücre migrasyonu ve angiogenezde de rol aldığı gösterilmiştir.

ING4'ün angienez ve hücre migrasyonuna etkisi

Garkavtsev ve ark. tarafından siçan beynine implante edilmiş glioblastoma multiforme hücreleri üzerinde yapılan çalışmada ING4 seviyeleri siRNA ile azaltıldığı tümör hücrelerinin kontrol hücrelere göre daha hızlı büyüdüğu ve yüksek vasküler volüm fraksiyonları olan tümör hücrelerinin üretildiği gösterilmiştir (91). Multipl miyeloma hücrelerinde ING4 ekspresyonunun azaltılması, pro-anjiyogenik moleküllerin interlökin-8 (IL-8) ve osteopontin (OPN) ekspresyonunu da arttırmıştır. Bu in vitro gözlemlere ek olarak, multipl miyelom hastalarında ING4 ekspresyonunun azalması ve mikrovasküler dansite artması arasında da bir korelasyon kaydedilmiştir (121).

ING4 aynı zamanda hücre migrasyonu, hücre yayılması ve kontakt inhibisyonluda ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ektopik ING4 artışının hücre yayılması ve migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (122).

ING4'ün, p53, Nf-Kb ve HIF-1 α Yolaklarındaki Fonksiyonları

ING4'ün p53, Nf-Kb ve HIF-1 α 'e bağlanarak onların fonksiyonunu regüle ettiği bilinmektedir. ING4'ün aşırı ekspresyonu ile p300'ün etkileri arttırılmakta ING4-p53 kompleksi oluşumu ve p53 asetilasyonu arttırdığı bilinmesine rağmen bu asetilasyon sonucu oluşan etkiler bilinmemektedir (88).

U87MG glioblastoma hücrelerinde yapılan zorlu aşırı ekspresyon ve eş-immünopresipitasyon deneyleri ING4'ün ING4'ü NF- κ B yolağına bağlayan p65 (RelA) ile fiziksel olarak etkileştiğini göstermiştir (91). Bu etkileşimin daha fazla analizi, ING4'ün, RelA'nın DNA bağlama aktivitesini inhibe edebileceğini gösterir. Ek olarak, ING4'ün ortadan kaldırılması transfekte edilmiş hücrelerde bir NF-KB'ye bağlı lusiferaz raportör plazmidinin ekspresyonunu uyarabilir. Bu sonuçlar ING4'ün NF- κ B transkripsiyonel aktivitesini inhibe etmek için doğrudan RelA ile etkileştiğini göstermektedir.

ING4'ün siRNA ile inaktive edilmesi hipoksik koşullar altında HIF-1 α hedef genleri NIP3 ve AK3'ün yükselmesine yol açar (123). HIF-1 α 'nın nükleer seviyeleri bu deneylerde değiştirilmemiştir, bu da ING4'ün HIF-1 α aktivitesini değiştirerek HIF-regüle edilmiş gen ekspresyonunu baskıladığını ve ING4 ile HIF-1 α arasında doğrudan bir etkileşimin gözlenmediğini göstermektedir. Sonraki deneyler, ING4'ün kromatin yeniden modelleme enzimlerinin aktifliğini etkileyerek HIF-1 α aktivitesini düzenleyebileceğini ortaya çıkarmıştır (123).

ING4'ün kromatin düzenlenmesine etkisi

ING4, yeni bir HBO1-HATcomplex'in bir bileşeni gibi görünmektedir. HBO1 proteini, histon H4'ü spesifik olarak asetilleyen iki farklı HAT kompleksinin katalitik alt birimidir ve HBO1, DNA replikasyonu, S-fazı ilerlemesi ve transkripsiyonel regülasyon ile ilişkilidir (124). Ayrıca, HBO1'in androjen reseptörü (Avvakumov ve Cote, 2007) ve NF- κ B için ortak bir baskılayıcı olarak davrandığı düşünülmektedir (125). Ayrıca, p53'ün HBO1 ile etkileştiği ve HBO1-asitiltransferaz aktivitesini azalttığı bulunmuştur (126). Bunlar ilginç bulgular olsa da, HBO1'in transkripsiyon düzenleyicisi olarak işlev görme yeteneği, kanıtlar seyrek ve çelişkili olduğundan tartışmalıdır. Bu nedenle, HBO1 kompleks oluşumunu düzenlemede veya HBO1 fonksiyonuna katkıda bulunmada ING4'ün bir rolü daha ileri çalışmalar ile kanıtlanmalıdır (76).

2.4.1.5 ING5 VE FONKSİYONLARI

Biokimyasal olarak ING5 ING4'e benzerlik göstermektedir. ING5, diğer ING ailesi proteinleri gibi histon H3K4me3'e bağlanır (127). ING5, iki farklı HAT kompleksinde yer alır (92). Biri, ING4'e benzer ING5, HBO1 ve JADE arasındaki etkileşimle histon H4'e bağlanan bir komplekstir. Bir başka kompleks, ING5 ve ING4'ün benzer amino asit yapılarına sahip olmasına rağmen, ING5, MOZ ve MORF içeren bir kompleks ve ING4'ten farklı olarak BRPF arasındaki etkileşimle histon H3'e bağlanır. ING5 ayrıca replikasyonun kökeninde prereplikatif bir kompleksin oluşturulması yoluyla DNA replikasyonunda önemli bir rol oynayan MCM proteinleri ile de ilişkilidir. ING5'in fizyolojik olmayan aşırı ekspresyonu, kanser hücrelerinde hücre döngüsü arresti ve apoptozu indüklemesine rağmen, ING5'in inaktive edilmesi tamamen DNA sentezini ortadan kaldırdığı ve HBO1 hücrelerinin S fazında yıkımının arttığından, HBO1-JADE- ING5 HAT kompleksi, MCM kompleksi ile işbirliği içinde DNA replikasyonu sırasında önemli bir role sahip olabileceği ve bu da ING5'in DNA replikasyonunu arttırarak karsinogeneze dahil olabilme olasılığını düşündürmektedir (88). ING5 fonksiyonu hakkında çok az şey bilinmektedir, ancak son zamanlarda yapılan transfeksiyon deneyleri ING5'in koloni oluşturan etkinliği azalttığını, S-fazını inhibe ettiğini ve p53'e bağlı bir şekilde apoptozu indüklediğini göstermiştir (88). Ek olarak, ING5, bir p53-hedef geni olan sikline bağımlı kinaz inhibitörü p21'in ekspresyonunu indükleyebilir. Bu sonuçlar, ING5'in hücre büyümesi ve p53 aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynadığını, ancak ING5 fonksiyonu ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir (76).

3.AMAÇ

Daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda ING gen ailesi üyelerinin farklı malignitelerin gelişimine rol aldığı gösterilmiştir. Literatürde ING1, ING2, ING3, ING4'ün malign melanomla ilişkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. Ülkemizde yapılan bir çalışmada bazal hücreli karsinomda ING2 gen fonksyonları araştırılmıştır. BCC oluşumu ve ING2 ekspresyon kaybı arasında korelasyon bulunmuş, ancak tümörün evre ve prognozu ile ilişki olduğu söylenememiştir (128). Kliniğimizde yapılan SCC'de ING2 gen fonksyonlarının araştırılmasına yönelik çalışmada SCC ve ING2 fonksyon kaybı arasında ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (129). Biz bu çalışmamızda ING2 gen ekspresyonunun metastatik yolakta rolünü tespit etmeyi hedefledik. ING2'nin melanom gelişimindeki rolünü araştırmak için, ING2'nin farklı dokularda ekspresyonunu inceledik ve ING2 ekspresyonu ile klinikopatolojik değişkenler arasındaki korelasyonu analiz ettik.

4.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı. (Sayı :83045809-604.01.02 Tarih: 07/02/2018) Çalışmada, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'na başvuran, dermtoskopik muayenede malign melanom ön tanısı konulmuş, yada yapılan biyopsilerde malign melanom tanısı alan, akabinde sentinel lenf nodu biyopsisi veya direkt lenf nodu disseksiyonu yapılan evre III ve evre IV hastalara ait biyopsi materyalleri kullanılması planlandı. Çalışmaya 21 hasta dahil edildi. Seçilen hastalara ait biyopsi materyalleri çıkarılarak çalışma için yararlı olan hazır lamalar tekrar gözden geçirilerek genetik incelenme için gönderildi. Genetik inceleme Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

4.1. HASTA SEÇİMİ

Çalışmaya, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'na başvuran, dermtoskopik muayenede malign melanom ön tanısı konulmuş, yada yapılan biyopsilerde malign melanom tanısı alan, akabinde sentinel lenf nodu biyopsisi veya direkt lenf nodu disseksiyonu yapılan, evrelemede evre III ve evre IV olan hastalar dahil edildi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivi taranarak 2002-2018 senelerinde malign melanom tanısı alan yaklaşık 1500 hasta dosyası incelendi. Lenf nodu metastazı olan yaklaşık 250 hasta seçildi. Tüm hastaların piyeslerinden hazırlanmış olan lamaları Patoloji Anabilim Dalı arşivinden çıkarılarak incelendi. Çalışma için gerekli olan primer tümör, sağlam deri dokusu, metastatik lenf nodu ve metastaz olmayan lenf noduna ait doku örnekleri olan 21 hasta seçildi. Çalışma için gerekli doku örnekleri olmayan veya yetersiz olan hastalar, aynı zamanda primer tümör dokusu ileriye yönelik moleküler çalışmalar için yetersiz olan hastalar çalışmadan çıkarıldı. Ölüm Bildirim Sisteminden hayatta kalan ve ölen hastaların listesi hazırlandı. Hayatta kalan hastalara onam formu imzalatıldı. Tüm Hasta epikrizlerinden hastaların yaş, cinsiyet, daha önce geçirilmiş cilt kanseri öyküsü, sigara içimi, ailede kanser öyküsü, meslek, güneş ışığı maruziyeti, genetik hastalıklar, radyoterapi öyküsü, immunsupresyon, güneş yanığı öyküsü, cilt tipi araştırılarak dikkate alındı. Tüm hastalar, lokorejyonel lenf nodu metastazı ya da sistemik metastaz açısından değerlendirildi.

Çalışmaya dahil edilen hastaların özellikleri:

1. Daha sonraki patolojik değerlendirmeye yeterli doku parçası olan hastalar.
2. Aynı lezyondan yapılan biyopsi sonucu malign melanom olarak raporlanan hastalar.
3. Daha önce aynı alanda veya yakın bölgesinde malign melanoma öyküsü olan hastalar.
4. Histopatolojik incelemede malign melanom tanısı konuşmuş, ancak in-operable kabul edilen hastalar.
5. Evreleme sonucu evre III ve evre IV olan hastalar.
6. Çalışma için yeterli miktarda doku örneği olan hastalar.

Çalışmaya dahil edilmeyen hastaların özellikleri:

1. Daha sonra patolojik inceleme yapılmasına yeterli doku parçası olmayan hastalar.
2. Lokorejyonel lenf nodu metastazı olmayan hastalar.
3. Genetik çalışmaya rızası olmayan hastalar.
4. Çalışma için gerekli tümör dokusu, tümörsüz doku, metastatik lenf nodu ve metastaz olmayan lenf nodu dokusu yetersiz olan veya gereken doku örnekleri olmayan hastalar.

4.2. ÖRNEKLERİN SEÇİLMESİ

Çalışma için uygun hastalara ait lamlar seçildi. Lamların hazırlandığı uygun parafin bloklar arşivden temin edilerek karşılaştırıldı. Her hasta için primer tümör, sağlam deri dokusu, metastatik lenf nodu ve metastaz olmayan lenf nodu dokusuna ait dört örnek incelendi. Mikroskop altında doku örneklerinin sınırları belirlenerek farklı renkli kalemlerle işaretlendi. Primer tümör dokusu siyah, sağlam deri dokusu kırmızı, metastatik lenf nodu mavi, metastaz olmayan lenf nodu mor kalemle işaretlendi. 21 hastaya ait 84 örneğin alınacağı parafin bloklar ve haritalanmış lamlar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalına yönlendirildi.

4.3. GENETİK- MOLEKÜLER İNCELEMELER

Parafin bloklardan lam üzerinde işaretlenmiş alanlar karşılaştırılarak doku örnekleri alındı. Herbir doku örneği RNA izolasyonu yapılması için ayrı- ayrı Eppendorf tüplerine yerleştirildi.

4.3.1. Total RNA izolasyonu

Her bir örneğin ~30mg'lık kesiti kullanıldı. “QIAGEN lysis agent” trizol aracılığı ile total RNA izolasyonu yapıldı. Her bir doku steril ortamda bistüri ile parçalanarak deney tüpüne aktarıldı ve 1ml QIAGEN lysis agent trizol eklendikten sonra doku tamamen parçalanana kadar vorteks yapıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 200µl kloroform eklenip tekrar 15 saniye vorteks yapıp 10-15 dakika oda sıcaklığında beklemeye alındı. +4°C'de 12000g'de 15 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant kısmı başka bir tüpe aktarıldı ve 1500µl isopropanol eklenerek vortekslendi. 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra +4°C, 12000g'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra 1ml %75'lik etanol eklenip pipetaj yapıldıktan sonra 12000g, +4°C'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldıktan sonra alkolün tamamen uzaklaştırılması için bekletildi ve son olarak 50µl “Rnase free” distile su eklenerek elde edilen total RNA çözdürüldü. Yapılan izolasyonlar sonucunda elde edilen total RNA miktarı nanodrop ile ölçüldü.

4.3.2. cDNA sentezi

Elde edilen total RNA'lar 25ng-5µg olacak şekilde sulandırıldı ve cDNA sentezi için QIAGEN RT2 First Strand kiti kullanıldı. Her bir örnek için Tablo 1'de belirtilen sıra ve miktarlara göre karışım hazırlandı. Kalıp RNA en son eklenerek 15 dakika 42°C'de bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi ve reverse transkriptaz enzim inhibisyonu için 95°C de 5 dakika bekletildi.

Tablo 10: Reverse transkripsiyon reaksiyon bileşenleri.

Component	Hacim
RNA	(25ng-5µg) 2 µl
Buffer GE	2 µl
RNase-free water	6 µl
Total Hacim	10 µl

Genomik DNA eliminasyon karışımını 5 dakika 42°C'de inkübe ettikten sonra 1 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi.

Tablo 2'ye göre hazırlanan ters transkripsiyon karışımı.

Tablo 11: Reverse-transkripsiyon karışımı.

Component	Hacim
5X Buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl
RE3 Recerse Transcription mix	2 µl
RNase-free water	3 µl
Total Hacim	10 µl

Kalıp RNA en son eklenerek 15 dakika 42°C'de bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi ve reverse transkriptaz enzim inhibisyonu için 95°C de 5 dakika bekletildi.

4.3.3. Real-Time PCR uygulama ve analizi

cDNA sentezinden sonra RT² SYBR® Green Mastermixes kiti ile Real - Time PCR analizi yapıldı. Her bir örnek PCR uygulaması için 20ng/reaksiyon olacak şekilde sulandırılarak sürece uygun hale getirildi.

Öncelikle beş ayrı tüpe sırasıyla B-aktin (kontrol gen), ING2 primerleri için ayrı ayrı Tablo 3'te belirtilen miktarlar temel alınarak karışım hazırlandı ve kalıp RNA'lar eklenmeden her bir primer karışımı 96'lık plakalara her bir kalıp için ikişer ölçüm yapılacak şekilde dağıtıldı.

Tablo 12: Olgun miRNA için miScript SYBR Green kit karışımı (96'lık plaka)

Component	Hacim
RT2 sybr green mastermix	12.5 µl
cDNA synthesis reaction	1 µl
RT2 Qpcr Primer Assay (10 µM stock)	1 µl
RNase-free water	10.5 µl
Total Hacim	25 µl

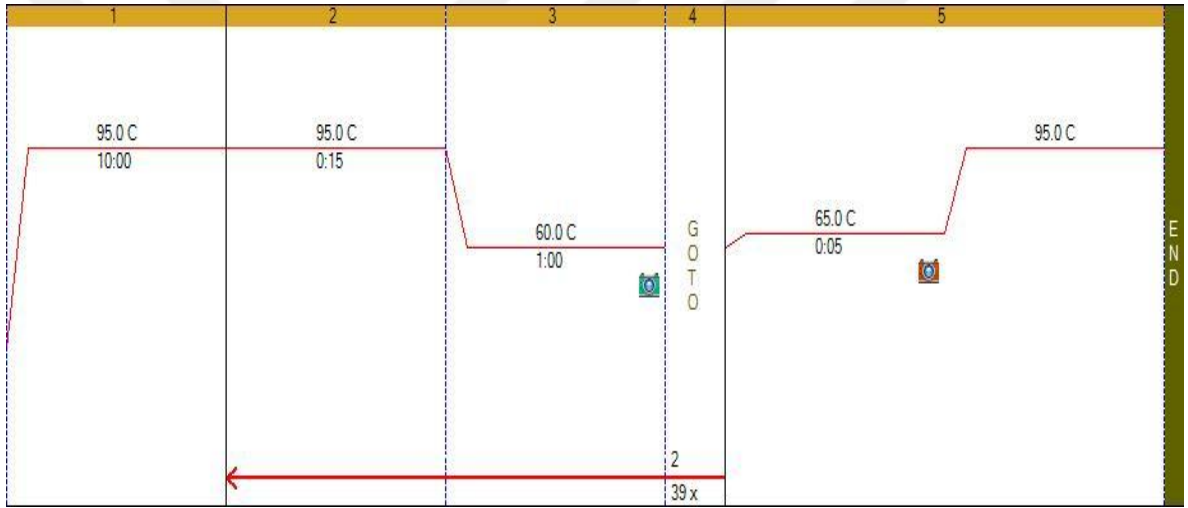
Tablo 13: ING2 geninin qRT- PCR'da kullanılan primer dizisi. F: Düz primer, R: Ters primer.

Primer Dizisi	
ING2-F	GCGAGAGCTGGACAACAAAT
ING2-R	TGCTGTAGACGTTTCTTCTGG

Hazırlanan karışımlar BIO- RAD CFX Connect Real- Time System cihazı kullanılarak aşağıda Tablo 14'te verilen koşullara göre qRT- PCR işlemi uygulandı.

Tablo 14: qRT- PCR kondüsyonları.

Program	Sıcaklık	Süre	Siklus
Preinkübasyon	95 °C	10 dakika	1
Amplifikasyon	95 °C	15 saniye	40
	60 °C	60 saniye	
Sybr green ayrılması (MELTING)	65 °C	5 saniye	1
	95 °C		



Şekil 12: qRT- PCR çalışma protokolü.

Her bir örnek için gerçek zamanlı PZR işlemi yapılarak ortalama Ct değerleri hesaplandı. Rölatif kantitasyon analizi delta-delta-Ct metodu kullanılarak tanımlandı.

4.4. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışma sonunda çalışma kriterlerine uygun olan hastalara ait parafin bloklardan alınan örnekler dört gruba ayrıldı.

- 1 : Mikroskopik olarak tümör içeren dokulardan ING-2 bakılan grup.
- 2: Tümör içermeyen sağlam deri dokularından ING-2 bakılan grup.
- 3: Metastatik lenf nodlarının tümör içeren dokulardan ING-2 bakılan grup.
- 4: Metastaz olmayan sağlam lenf düğümü dokularından ING-2 bakılan grup.

4.4.1. KLİNİK DEĞERLENDİRME

Alınan örneklerinde yeterli mRNA saptanan 21 hasta, yaşları, hastalığın primer veya nüks olması, lokal lenf bezi veya sistemik metastaz varlığı açısından değerlendirildi. Malign melanom etyolojisinde yer alan, konjenital hastalıklar, deri tipi, güneşe maruziyet, sigara kullanımı, radyoterapi, kemoterapi öyküsü, lenfoma ve diğer malignite öyküsü sorgulandı.

4.4.2 HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Malign melanom için ameliyat edilen hastaların parafin bloklarından hazırlanan lamalar incelenerek çalışma için kullanılacak kısımları lam üzerinde işaretlendi. Haritalanmış lamlara uygun parafin bloklar seçildi. Çalışmaya dahil edilen hastalara ait tüm patoloji raporları incelendi.

4.4.3. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmaya dahil edilen 21 hastadan alınan 84 örneğin mRNA ekspresyon değerleri incelendi. Tümörlü ve sağlam dokulardan, tümörlü ve tümör içermeyen lenf nodlarından izole edilen ING2 mRNA değerleri, ve bunların delta Ct değerleri, Delta-Delta Ct değerleri ve Rölatif ifadeleri karşılaştırıldı. Ayrıca tümörlü lenf nodu ve tümör içermeyen lenf nodlarının delta Ct değerleri ile primer tümörün Breslow kalınlığı arasındaki korelasyon olup olmadığı değerlendirildi.

İstatistiksel İncelemeler

Çalışmamızda verilerin istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA) programının 21.0 versiyonu kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart Sapma, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) gruplarda ölçülen değişkenlerin değerlendirilmesinde normal dağılım gösterenler için Paired Samples t Testi ve normal göstermeyenler için Wilcoxon Signed Ranks Testi kullanıldı. Korelasyonun değerlendirilmesi için spearman korelasyon testi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.01$ ve $p < 0.05$ düzeylerinde değerlendirildi.

5.BULGULAR

5.1 KLİNİK BULGULAR

Çalışmaya 21 hasta, her hastadan alınan 1 primer tümör, 1 sağlam deri doku örneği, 1 metastatik lenf nodu, 1 metastaz olmayan sağlam lenf nodu dokusu, toplam 84 örnek dahil edildi. Hastalardan 8 tanesi kadın 13 tanesi erkek hasta idi. En genç hasta 19 yaş erkek, en yaşlı hasta ise 87 yaşında kadın hastaydı. Çalışmaya dahil edilen örnekler 9 ölmüş olan hastalara ve 12 hayatta kalan hastalara aitti. Ölen hastaların primer tümör tanı anından ölene kadar olan en kısa süre 7 ay, en uzun sağkalım süresi ise 55 ay olarak görüldü.

Hastalardan tümör örneği alınan lezyonların lokalizasyonları kaydedildi. Buna göre:

1. Baş-boyunda yerleşimli: 5 hasta
 - a. Saçlı deri: 3 hasta
 - b. Yanak: 1 hasta
 - c. Malar bölge: 1 hasta
2. Gövde yerleşimli: 6 hasta,
 - a. Gövde arka yüz yerleşimli:3 hasta
 - b. Skapular bölge:1 hasta
 - c. Lomber bölge: 1 hasta
 - d. Sternum ön yüzü: 1 hasta
3. Üst ekstemite yerleşimli: 2 hasta
 - a. Omuz yerleşimli: 1 hasta
 - b. Kol yerleşimli: 1 hasta
4. Alt ekstremitede yerleşimli: 8 hasta
 - a. Ayak plantar yüz yerleşimli: 6 hasta
 - b. Uyluk yerleşimli: 2 hasta

13 hastaya sentinel lenf nodu biyopsisi uygulanmış, 8 hastaya sentinel lenf nodu biyopsisi yapılmaksızın bölgesel lenfatik disseksiyon uygulanmış. Sentinel lenf nodu biyopsisi pozitif saptanan 13 hastayanın 3ü'nde bölgesel lenfatik disseksiyon zamanı metastaza rast gelinmemiştir.

5.2 HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji AD'dan veya dış merkezlerden çıkartılmış eksizyonel biyopsi patoloji raporları vardır. Patoloji raporlarında hastaların yaşı, cinsi, patolojik tanısı, patoloji evresi, Clark leveli, Breslow kalınlığı, büyüme fazı, ülserasyon varlığı, mitotik aktivitesi, tümörü infiltre eden lenfositik cevap, zeminde nevüs varlığı, regresyon bulguları, perinöral invazyon, damar invazyonu, lenfatik invazyon, cerrahi sınırları yer almaktadır. Bundan başka sentinel lenf nodu biyopsisi sonuçları ve bölgesel lenf nodu disseksiyon sonuçlarında mevcuttur.

Hastaların histopatolojik özellikleri aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 15: Hastaların cinsi, yaşı, primer tümör lokalizasyonu, sentinel lenf nodu biyopsisi ve bölgesel disseksiyon sonuçları.

SIRA No	CİNS	YAŞ	PRİMER TÜMÖR LOKALİZASYONU	DİSSEKSİYON BÖLGESİ	SENTİNEL LENF NODU BİYOPSİSİ	BÖLGESEL DİSSEKSİYON
1	K	76	STERNUM	SAĞ BOYUN	N3/1	M0/7
2	E	19	SAĞ AYAK 1. PARMAK	SAĞ KASIK		M3/6
3	E	75	SOL MASTOİD	SOL BOYUN	N3/0	M2/3
4	K	87	SAĞ MALAR BÖLGE	SAĞ BOYUN		M2/34
5	E	52	SAĞ KOL POSTERİÖRÜ	SOL AKSİLLA		ÇOK SAYIDA MET LENF NODLARI
6	E	80	SIRT	SAĞ AKSİLLA	N1/3	M6/17
7	E	39	ENSE SAĞ YAN	SAĞ BOYUN	N2/7	M0/51
			SAĞ POST AURİKÜLER ALAN	SUBKÜTAN YAĞ DOKUSU		M1/7
8	K	67	SOL UYLUK	SOL KASIK		M1/5
9	E	66	SAĞ OMUZ	SAĞ AKSİLLA	N1/1	
10	E	75	SKALP-SAĞ PARİETOOKSİPİTAL BÖLGE	SAĞ BOYUN		M6/75
11	K	67	SIRT MM İNFİLTRASYONU	SAĞ AKSİLLA		M4/23
12	E	48	SAĞ AYAK	SAĞ KASIK	N1/1	
						M1/10
13	E	80	SOL TOPUK	SOL KASIK	N1/7	
14	E	68	SOL TEMPORAL	SOL BOYUN	N3/3	
15	K	53	SAĞ TOPUK	SAĞ KASIK	N1/1	
16	E	64	LOMBER BÖLGE	SAĞ AKSİLLA	N2/7	
17	E	62	SAĞ AYAK	SAĞ KASIK	N1/1	M0/7
18	K	62	SAĞ AYAK	SAĞ KASIK	N3/4	
19	E	53	SOL UYLUK POSTERİÖRÜ	SOL KASIK		M1/5
20	K	76	SAĞ SKAPULAR BÖLGE	SAĞ AKSİLLA		M2/10
21	K	34	SIRT	SAĞ AKSİLLA	N1/1	

11 hastanın tümör kalınlığı Clark evrelemesine göre evre IV, 10 hastanın evre V olarak değerlendirilmiştir. En ince tümörün Beslow kalınlığı 1,5 MM, en kalın tümörün ise 65 MM olarak ölçülmüştür. 6 hastanın primer tümörünün vertikal büyüme fazında olduğu, 13 hastada ise radial ve vertikal fazda olduğu görülmüştür. 17 hastada yüksek, 4 hastada düşük mitotik aktivite izlenmiştir.

Tablo 16: Tümörün tipi, Clark evresi, Breslow kalınlığı, büyüme fazı, cerrahi sınır, mitotik aktivite.

SIRA No	TÜMÖR TİPİ	CLARK	BRESLOW	BÜYÜME FAZI	CERRAHİ SINIR	MİTOTİK AKTİVİTE
1	REEKSİZYON	IV	1,5MM		0,2CM	YÜKSEK 28/MM
2	SUBUNGUAL MELANOM	IV	3,65MM	V	4MM	YÜKSEK 7/MM
3	YÜZEYEL YAYILAN MALİGN MELANOM	V	6,4MM	R/V	1,8CM	YÜKSEK 22/MM
4	LENTİGO MALİGN MELANOM	V	0,9CM	R/V	1MM	YÜKSEK 8/MM
5	NODÜLER MALİGN MELANOM	V	1,3CM	V	0,4CM	YÜKSEK 10/MM
6	YÜZEYEL YAYILAN MALİGN MELANOM	IV	5,03MM	R/V	5,68MM	8/MM
7	YÜZEYEL YAYILAN MALİGN MELANOM	IV	6,48MM	R/V	4,5MM	YÜKSEK 7/MM
8	MAVİ NEVÜS ZEMİNİNDE GELİŞEN MALİGN MELANOM	V	65MM	V		YÜKSEK 7/MM
9	YÜZEYEL YAYILAN MALİGN MELANOM	IV	7,58MM	R/V	1,87MM	YÜKSEK 7/MM
10	REST TM				0,9CM	
11	YÜZEYEL YAYILAN MALİGN MELANOM	IV	3,01MM	R/V	2,8MM	YÜKSEK 10/MM
12	NODÜLER MALİGN MELANOM	IV	10,46MM	Y	1,6 CM	YÜKSEK 27/MM
13	AKRAL LENTİJİNÖZ MALİGN MELANOM	V	13,05MM	V	CS TM GÖRÜLMEDİ	DÜŞÜK 3/MM
14	YÜZEYEL YAYILAN MALİGN MELANOM	IV	4,4MM		1MM	5MM
15	AKRAL LENTİJİNÖZ MALİGN MELANOM	V	14,2MM	R/V	2,2MM	YÜKSEK 8/MM
16	YÜZEYEL YAYILAN MALİGN MELANOM	IV	4,96MM	R/V	1,3CM	4/MM
17	AKRAL LENTİJİNÖZ MALİGN MELANOM	V	3,56MM	R/V	0,8CM	YÜKSEK 7/MM
	AKRAL LENTİJİNÖZ MALİGN MELANOM	IV	3,4MM	R/V		DÜŞÜK 4/MM
18	AKRAL LENTİJİNÖZ MALİGN MELANOM	V	17,2MM	V	1,56MM	YÜKSEK 8/MM
	PLAZMOSİTOİD TİP MELANOM					
19	YÜZEYEL YAYILAN MALİGN MELANOM	V	12,8MM	R/V	0,8MM	YÜKSEK 13/MM
20	NODÜLER MALİGN MELANOM	V	1,48MM	R/V	0,5CM	7/MM
21	YÜZEYEL YAYILAN MALİGN MELANOM	IV	3,33MM	R/V	2MM	YÜKSEK 7/MM

5.3. GENETİK- MOLEKÜLER BULGULAR.

21 hastadan alınan tümürlü ve tümör içermeyen deri dokusu, tümör içeren ve tümörsüz lenf nodundan elde edilen 84 örnekte β aktin (house-keeping gen) ve ING2 değerleri her bir örnek için iki grup şeklinde karşılaştırıldı. Delta Ct değerleri her bir örnek için elde edilen ortalama gen ekspresyonları farkını, Delta-Delta Ct değerleri ise ortalama normal delta Ct değerinden farkı göstermektedir. Rölatif İfade ise Delta-Delta Ct değerinin logaritmik karşılığıdır.

Genetik- moleküler bulgular tablo 14 ve 15’de gösterilmiştir.

1.grup: Normal deri dokusu - Tümürlü deri dokusu

Tablo 17: Normal deri dokusu ve primer tümörün β aktin ve ING2 değerleri, Delta Ct, Delta-Delta Ct ve Rölatif İfadeler. T: tümürlü doku, N: sağlam doku.

Hasta	ING2	B-aktin	Delta Ct	Delta delta Ct	Rölatif İfade
N1	30,92864286	31,62984161	-0,701198741	-2,869528141	7,308260916
T1	29,79000836	31,09904986	-1,309041494	-3,477370894	11,13763408
N2	28,58210532	29,96654007	-1,384434749	-3,552764149	11,73514814
T2	31,56498756	30,11566505	1,449322513	-0,719006887	1,646048548
N3	33,94864395	31,39984654	2,548797412	0,380468012	0,768188349
T3	31,61235485	30,47808422	1,134270631	-1,034058769	2,047777216
N4	29,33987122	28,16506534	1,17480588	-0,99352352	1,991041815
T4	28,29476521	30,31677956	-2,022014346	-4,190343746	18,25656887
N5	33,34892216	30,00654025	3,342381914	1,174052514	0,443174718
T5	32,30673489	30,90818766	1,398547225	-0,769782175	1,705012333
N6	30,28309871	29,9185033	0,364595411	-1,803733989	3,491226576
T6	29,31146879	31,44323041	-2,131761616	-4,300091016	19,69955336
N7	33,45065053	28,46304506	4,987605472	2,819276072	0,141681562
T7	33,0086648	31,16581684	1,842847957	-0,325481443	1,253082536
N8	31,49165407	29,87860551	1,613048566	-0,555280834	1,469454649
T8	33,53807388	31,35541621	2,182657662	0,014328262	0,990117561
N9	34,31736508	31,2504555	3,066909582	0,898580182	0,53641438
T9	33,2567433	30,94496237	2,311780928	0,143451528	0,905350586
N10	33,37826054	30,5045539	2,873706637	0,705377237	0,613282106
T10	33,7497285	30,39509472	3,354633785	1,186304385	0,439427059
N11	31,20781577	30,77805501	0,429760757	-1,738568643	3,337039222
T11	33,12765385	30,59722322	2,530430629	0,362101229	0,778030583
N12	33,38109046	31,29345027	2,087640186	-0,080689214	1,057523127
T12	32,91044465	30,45533252	2,455112122	0,286782722	0,819728054
N13	33,19449905	30,18850078	3,005998272	0,837668872	0,559546963
T13	33,98853595	30,75725356	3,231282388	1,062952988	0,478651326

Tablo 17: Normal deri dokusu ve primer tümörün β aktin ve ING2 değerleri, Delta Ct, Delta-Delta Ct ve Rölatif İfadeler. T: tümörlü doku, N: sağlam doku. (Devamı)

Hasta	ING2	B-aktin	Delta Ct	Delta delta Ct	Rölatif İfade
N14	33,20985994	30,47805227	2,731807672	0,563478272	0,676668778
T14	34,09038132	31,01513906	3,07524226	0,90691286	0,533325103
N15	34,14272016	28,3722541	5,770466062	3,602136662	0,082347196
T15	33,08808009	30,87224587	2,215834217	0,047504817	0,967608389
N16	33,30508664	29,45079021	3,854296427	1,685967027	0,31079452
T16	33,53095632	31,60224496	1,928711359	-0,239618041	1,18068003
N17	31,6126801	31,87024632	-0,257566216	-2,425895616	5,37362489
T17	29,91141207	30,71225467	-0,800842604	-2,969172004	7,830866776
N18	34,31552691	28,64505478	5,670472126	3,502142726	0,088257169
T18	32,25684621	30,59948002	1,65736619	-0,51096321	1,425001275
N19	31,88326425	29,10244533	2,780818915	0,612489515	0,654067069
T19	29,64525101	31,08833676	-1,443085747	-3,611415147	12,22205647
N20	30,54879136	30,30242633	0,246365032	-1,921964368	3,789386691
T20	31,31695482	30,25605087	1,060903947	-1,107425453	2,154608056
N21	33,12046529	31,7708246	1,349640692	-0,818688708	1,763802112
T21	30,52035232	31,58108097	-1,060728648	-3,229058048	9,376555532

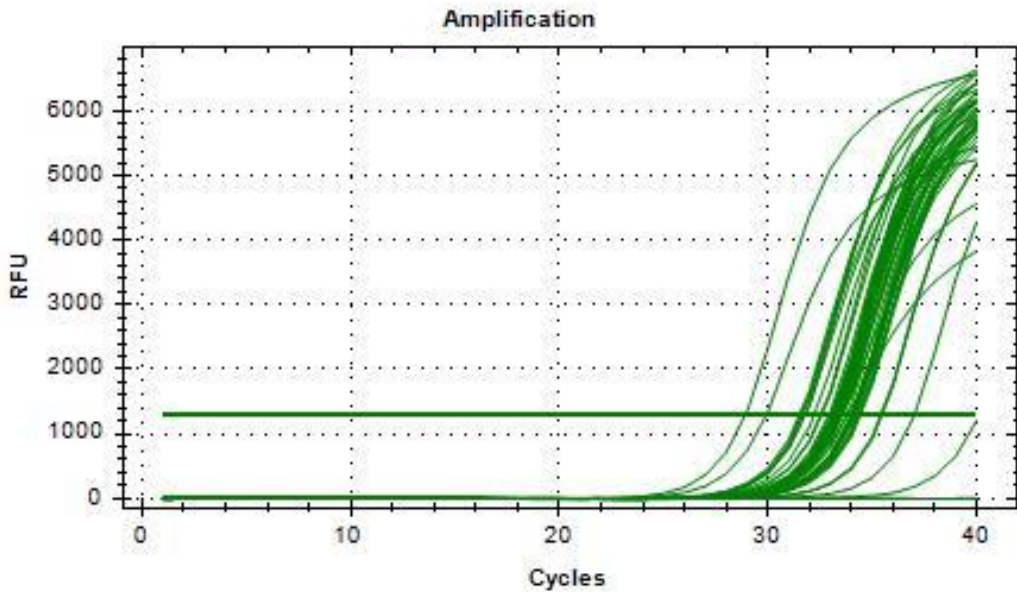
Grup 2: Tümör içermeyen (sağlam) lenf nodu dokusu - metastatik lenf nodu dokusu

Tablo 18: Sağlam lenf nodu ve metastatik lenf nodu dokularının β aktin ve ING2 değerleri, Delta Ct, Delta-Delta Ct ve Rölatif İfadeler. T: tümörlü lenf nodu dokusu, N: sağlam lenf nodu dokusu.

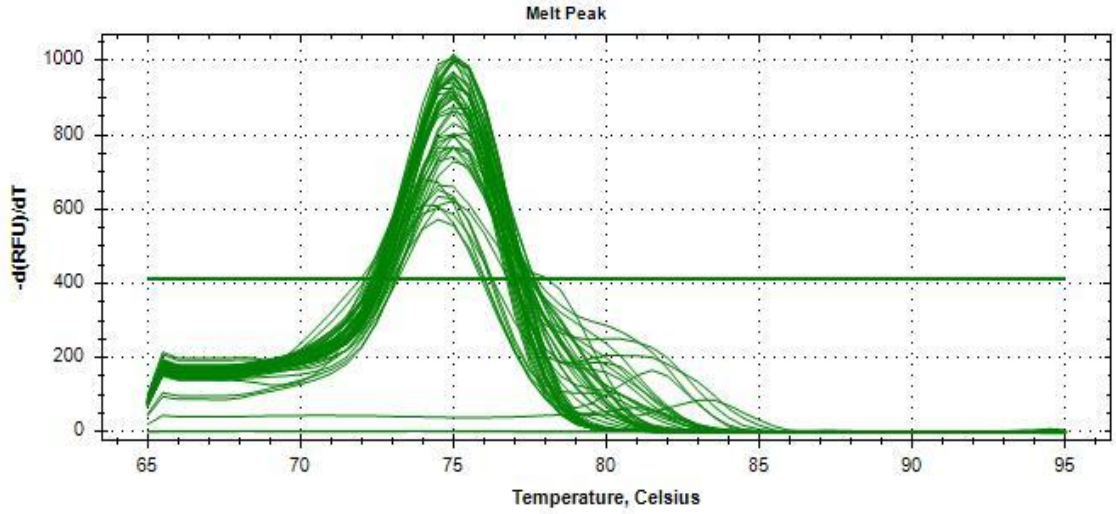
Hasta	ING2	B-aktin	Delta Ct	Delta delta Ct	Rölatif ifade
N1	30,16689871	30,2361478	-0,069249086	-2,18140274	4,535943721
T1	28,35056219	31,9534508	-3,602888609	-5,715042263	52,52900174
N2	29,58465795	27,6061486	1,978509352	-0,133644302	1,097061422
T2	28,95908285	28,7404557	0,218627154	-1,8935265	3,715423076
N3	31,58613449	28,1634909	3,422643587	1,310489933	0,403183937
T3	30,60882235	28,3140654	2,294756948	0,182603294	0,881111625
N4	29,13056677	29,20346244	-0,072895664	-2,185049318	4,547423341
T4	28,12648759	29,42205413	-1,295566538	-3,407720192	10,61270261
N5	32,21669543	29,3614868	2,85520863	0,743054976	0,597472834
T5	31,34426195	29,1054197	2,238842253	0,126688599	0,915931366
N6	29,31548796	31,5891405	-2,27365254	-4,385806194	20,90543552
T6	28,36876943	30,8051462	-2,436376775	-4,548530429	23,40152152
N7	34,14928156	28,6363148	5,512966762	3,400813108	0,094678909
T7	33,84016031	31,52102905	2,319131253	0,206977599	0,866350308
N8	33,56153593	27,60646187	5,955074059	3,842920405	0,069689233
T8	33,1779495	27,4026183	5,775331202	3,663177548	0,078935739

Tablo 18: Sağlam lenf nodu ve metastatik lenf nodu dokularının β aktin ve ING2 değerleri, Delta Ct, Delta-Delta Ct ve Rölatif İfadeler. T: tümörlü lenf nodu dokusu, N: sağlam lenf nodu dokusu. (Devamı)

N9	34,08307831	28,93059081	5,152487501	3,040333847	0,121553737
T9	34,0160398	26,9870517	7,028988099	4,916834445	0,033104372
N10	33,10252111	27,8054963	5,297024808	3,184871154	0,109965955
T10	32,50845058	27,6054986	4,902951984	2,79079833	0,144506037
N11	34,34900093	29,4012548	4,94774613	2,835592476	0,140088217
T11	33,15118529	29,3305497	3,820635586	1,708481932	0,305981868
N12	34,02515609	30,5605807	3,464575393	1,352421739	0,391634092
T12	33,2489486	31,40584507	1,843103534	-0,26905012	1,205014177
N13	33,44158618	30,7614082	2,680177978	0,568024324	0,674539894
T13	34,24972926	32,1025126	2,147216663	0,035063009	0,975989134
N14	34,42277651	32,9315022	1,491274314	-0,62087934	1,53781221
T14	33,08564019	30,4026013	2,683038889	0,570885235	0,673203585
N15	33,15970053	30,9279068	2,231793725	0,119640071	0,920417251
T15	33,31220783	30,2206489	3,091558928	0,979405274	0,507188777
N16	28,90721457	30,71005385	-1,802839281	-3,914992935	15,0844787
T16	32,5562101	31,4054977	1,150712403	-0,961441251	1,947254229
N17	32,19734147	32,1905434	0,006798071	-2,105355583	4,303038008
T17	31,76942207	30,9063491	0,863072968	-1,249080686	2,37689914
N18	33,65489502	31,4204637	2,234431321	0,122277667	0,918736043
T18	32,97663104	28,6065461	4,370084942	2,257931288	0,209071557
N19	31,23425956	31,20112636	0,033133206	-2,079020448	4,225202387
T19	30,36218492	30,4446213	-0,08243638	-2,194590034	4,577595656
N20	30,31144796	32,0648185	-1,753370539	-3,865524193	14,57601247
T20	33,28497621	32,8546124	0,430363815	-1,681789839	3,208257277
N21	33,42394781	30,36055881	3,063388995	0,951235341	0,517189417
T21	32,16205685	31,6615842	0,50047265	-1,611681004	3,056077234



Şekil 13: ING2 ve β aktinin ekspresyon sonuçları



Şekil 14: Sybr green ayrılması (MELTING CURVE).

5.4. İSTATİSTİKSEL BULGULAR

Çalışmamıza katılan 21 kişinin 13'ü erkek (%61,9) 8'i kadın (%38,1) olup yaş ortalaması $62,05 \pm 16,9$ ortalanca yaş 66'dır (min-max:19-87). Çalışmaya dahil edilen örnekler 9 ölmüş olan hastalara (%42,85) ve 12 hayatta kalan hastalara (%57,15) aitti. Ölen hastaların primer tümör tanı anından ölene kadar olan en kısa süre 7 ay, en uzun sağkalım süresi ise 55 ay olarak görüldü.

Tablo 19: Tümörlerin klinik ve histolojik özellikleri.

		n	%
Perinöral invazyon	Var	3	15
	Görülmedi	17	85
Lenfatik invazyon	Var	5	25
	Görülmedi	15	75
Kan damar invazyonu	Var	2	10
	Görülmedi	18	90
Regresyon	Fokal/Kısmı	3	15,8
	Görülmedi	16	84,2
Lenfositik aktivite	Var	12	63,2
	Görülmedi	7	36,8
Mikroskopik Satellite	Var	2	11,1
	Görülmedi	16	88,9
Zeminde Neiüs	Var	3	16,7
	Görülmedi	15	83,3

5.4.1. ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLEN 21 HASTANIN SONUÇLARI

Normal doku örneklerinde Delta Ct ölçümleri, -1,4 ile 5,8 arasında değişmekte olup, ortalama $2,17 \pm 1,99$; Tümörlü doku örneklerinde ise Delta Ct ölçümleri -2,13 ile 3,35 arasında değişmekte olup, ortalama $1,10 \pm 1,79$ olarak saptanmıştır. Normal dokular ve tümörlü dokular, Delta Ct ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekte olup normal doku hücrelerinin ortalamasının daha yüksek olduğu gözlenmektedir ($p=0,033$).

Normal doku örnekleri Delta-Delta Ct ölçümleri, -3,6 ile 3,6 arasında değişmekte olup, ortalama $0,00 \pm 1,99$; Tümörlü doku Delta-Delta Ct ölçümleri ise -4,3 ile 1,2 arasında değişmekte olup, ortalama $-1,07 \pm 1,79$ olarak saptanmıştır. Normal dokular ile tümörlü dokular, Delta-Delta Ct ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmış olup normal dokunun Delta Delta Ct değerin daha yüksek olduğu gözlenmektedir ($p=0,033$).

Normal doku örnekleri Rölatif İfadeleri 0,08 ile 11,74 arasında değişmekte olup, ortalama $2,20 \pm 2,91$ iken; Tümörlü doku Rölatif İfadeleri ise 0,4 ile 19,7 arasında değişmekte olup, ortalama $4,56 \pm 6,04$ olarak belirlenmiştir. Normal dokular ile tümörlü dokular Rölatif İfade ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p=0,063$; $p>0,05$).

Tablo 20: Sağlam deri dokusu ve primer tümörün delta Ct, Delta Delta Ct, Rölatif ifade değerleri.

N=21		Tümör	Normal	p
Delta Ct	Min-Max (Medyan)	-2,13-3,15(1,68)	-1,4-5,8(0,38)	0,033
	Ort±SD	1,10±1,79	2,17±1,99	
Delta Delta Ct	Min-Max (Medyan)	-4,30- 1,19 (-0,51)	-3,55-3,60(0,39)	0,033
	Ort±SD	-1,07±1,79	0±1,99	
Rölatif ifade	Min-Max (Medyan)	0,44-19,70(1,43)	0,08-11,74	0,063
	Ort±SD	4,56±6,04	2,20±2,99	

Normal normal lenf nodu örneklerinde Delta Ct ölçümleri, -2,77 ile 5,96 arasında değişmekte olup, ortalama $2,11 \pm 2,52$; Tümörlü lenf nodu örneklerinde ise Delta Ct ölçümleri -3,60 ile 7,02 arasında değişmekte olup, ortalama $1,82 \pm 2,59$ olarak saptanmıştır. Normal lenf nodları ve tümörlü tümörlü lenf nodları, Delta Ct ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p=0,461$; $p>0,05$).

Normal lenf nodu örnekleri Delta-Delta Ct ölçümleri, -4,39 ile 3,84 arasında değişmekte olup, ortalama $0,00 \pm 2,52$; Tümörlü lenf nodu Delta-Delta Ct ölçümleri ise -5,72 ile 4,92 arasında değişmekte olup, ortalama $-0,29 \pm 2,59$ olarak saptanmıştır. Normal lenf nodları ile lenf nodları arasında, Delta-Delta Ct ölçümleri istatistiksel ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p=0,461$; $p>0,05$).

Normal lenf nodu örnekleri Rölatif İfadeleri 0,07 ile 20,90 arasında değişmekte olup, ortalama $3,61 \pm 5,87$ iken; Tümörlü lenf nodu Rölatif İfadeleri ise 0,03 ile 52,53 arasında değişmekte olup, ortalama $5,34 \pm 12,02$ olarak belirlenmiştir. Normal dokular ile tümörlü dokular Rölatif İfade ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p=0,322$; $p>0,05$).

Tablo 21: Sağlam lenf nodu dokusu ve primer tümörün delta Ct, Delta Delta Ct, Rölatif ifade değerleri

	N=21	Tümör	Normal	p
Delta Ct	Min-Max (Medyan)	-3,60-7,02(2,15)	-2,27- 5,96(2,23)	0,461
	Ort±SD	1,82±2,59	2,11±2,52	
Delta Delta Ct	Min-Max (Medyan)	-5,72- 4,91 (2,15)	-4,39- 3,84(0,92)	0,461
	Ort±SD	1,82±2,59	0±2,52	
Rölatif ifade	Min-Max (Medyan)	0,03-52,53(0,98)	0,07-20,90	0,322
	Ort±SD	5,34±12,02	3,61±5,87	

Tablo 22: Sağlam deri ve primer tümör hücrelerinde ekspresyon farkı ve Breslow tümör kalınlığı ilişkisi.

No.	Delta Delta Ct	BRESLOW (mm)	p
1	-,60784275	1,5	0,424
2	2,83375726	3,65	
3	-1,41452678	6,4	
4	-3,19682023	9	
5	-1,94383469	13	
6	-2,49635703	5,03	
7	-3,14475752	6,48	
8	,56960910	65	
9	-,75512865	7,58	
10	,48092715	3,01	
11	2,10066987	10,46	
12	,36747194	13,05	
13	,22528412	4,4	
14	,34343459	14,2	
15	-3,55463185	4,96	
16	-1,92558507	3,56	
17	-,54327639	3,4	
18	-4,01310594	17,2	
19	-4,22390466	12,8	
20	,81453891	1,48	
21	-2,41036934	3,33	

Tümör (+) deri ile normal deri delta ct farkları ile Breslow kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (p=0,424).

Tablo 23: Sağlam ve metastatik lenf nodunda ekspresyon farkı ve Breslow tümör kalınlığı ilişkisi.

No.	Delta Delta Ct	BRESLOW (mm)	p
1	-3,53363952	1,5	0,695
2	-1,7598822	3,65	
3	-1,12788664	6,4	
4	-1,22267088	9	
5	-0,61636638	13	
6	-0,16272424	5,03	
7	-3,19383551	6,48	
8	-0,17974286	65	
9	1,8765006	7,58	
10	-0,39407283	3,01	
11	-1,12711054	10,46	
12	-1,62147186	13,05	
13	-0,53296132	4,4	
14	1,19176458	14,2	
15	0,8597652	4,96	
16	2,95355168	3,56	
17	0,8562749	3,4	
18	2,13565362	17,2	
19	-0,11556959	12,8	
20	2,18373436	1,48	
21	-2,56291635	3,33	

Breslow ortalama : \pm SD 9,98 \pm 13,41 min- max: 1,48-65 medyan :6,4.

Tümör (+) lenf nodu ile normal lenf nodlarının delta Ct farkları ile Breslow kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (p=0,695).

Primer tümör kalınlığına göre hastalar ince kalınlıkta (Breslow kalınlığı <2mm), orta kalınlıkta (Breslow kalınlığı 2-4mm) ve kalın (Breslow kalınlığı >4mm) olarak 3 gruba ayrıldı. Herbir grup hem primer tümör ve sağlam deri tümörü arasında olan ekspresyon farkı (delta Ct), hemde metastatik ve metastatik olmayan lenf nodu arasındaki ekspresyon farkı (delta Ct) karşılaştırılarak tümör kalınlığı ile ekspresyon arasında korelasyon olup olmadığı araştırıldı.

Tablo 24: Primer tümör ve sağlam deri dokusu delta Ct değerleri ile primer tümör kalınlığı karşılaştırılması.

Breslow	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
<2mm (n=2)	0,10	1,01	0,10	-0,61	0,81	0,270
2-4mm (n=5)	-0,31	2,10	-0,54	-2,41	2,83	
>4mm (n=14)	-1,51	2,01	-1,68	-4,22	2,10	

Primer tümör ve sağlam deri dokusu delta Ct değerleri ve primer tümör kalınlığına göre gruplarla karşılaştırıldığı zaman üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı (p= 0,270).

Tablo 25: Metastatik ve metastaz olmayan lenf nodu dokusu delta Ct değerleri ile primer tümör kalınlığı karşılaştırılması.

Breslow	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
<2cm (n=2)	-0,68	4,04	-0,68	-3,53	2,18	0,98
2-4cm (n=5)	-0,18	2,19	-0,39	-2,56	2,95	7
>4cm (n=14)	-0,27	1,44	-0,36	-3,19	2,14	

Metastatik ve metastaz olmayan lenf nodu dokusu delta Ct değerleri ve primer tümör kalınlığına göre gruplarla karşılaştırıldığı zaman üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı (p=0,987).

6.TARTIŞMA

Kutanöz malign melanom ciddi ve bazen hayatı tehdit eden bir kanserdir. Malign melanom oluşumunun moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Apoptozis mekanizmalarının temelinde duran moleküler mekanizmaların bozulması muhtemelen melanomun ilerlemesine katkıda bulunan başlıca faktörlerden biridir.

Malign melanom insidansı dramatik olarak artan hastalıklar arasındadır. Malign melanomun risk faktörleri arasında fenotipik faktörler (mavi gözler, sarışın veya kırmızı saç, açık ten, güneş hassasiyeti, bronzlaşmama), malign melanom öyküsü, displastik nevüs varlığı, pozitif aile hikayesi ve nadiren de olsa genetik mutasyonlar bulunur (3–6). Genetik faktörlere ek olarak fazla güneşe maruz kalma ve UV bazlı suni bronzlaşma gibi çevresel faktörler melanom gelişmesine neden olabilir (7).

Primer malign melanom non-metastatik radial faz ve dermise invaze olarak metastaz kapasitesi kazanan vertikal fazlardan oluşmaktadır (8). Hastaların büyük bir kısmı erken tanı konulduktan sonra basit cerrahi müdahaleler ile tedavi edilebilse de, uzak metastaz gelişen hastaların %50-si tanı konulduktan 6 ay içerisinde hayatlarını kaybediyorlar (9). Tümörün histopatolojik özellikleri, lokalizasyonu, çapı, hastanın özgeçmiş, kliniği, prekanseröz durumların varlığı, hastalığın prognozunu etkiler.

Birçok deri kanserleri gibi,malign melanomunda primer tedavisi sağlam sınırlarla cerrahi eksizyondur. Melanom, konvansiyonel radyoterapi veya kemoterapiye karşı oldukça dirençlidir. Melanom tedavisi için tek FDA onaylı ilaç olan Dacarbazine (DTIC) yanıt oranı sadece %16'dır(10). Bu nedenle, yeni tedavi rejimlerinin tasarlanması için melanom progresyonunun ve kemorezistansının daha iyi anlaşılması istenir. Malign melanomun başlangıcı ve gelişiminde moleküler etkilerin ortaya konulması malignitenin önlenmesi ve tedavisine yardımcı olacaktır.

Hücre siklüsünün tüm aşamaları bir takım kontrol mekanizmalarının denetimi altındadır. Bu mekanizmalar arasında tümör süpressor genler ve onkogenler başlıca role sahiptir. Tümör süpressor genler ve onkogenler sağlam hücrelerde denge halindedir. Kontrol mekanizmalarında olan ve onarılmayan mutasyonlar kontrolsüz hücre bölünmesi- kanserle sonuçlanır. Cilt kanserlerinde en sık p53 mutasyonuna rastlanır (11). Apoptozise karşı kazanılan direnç, kanser hücrelerinin kanser önleyici ajanların

neden olduğu apoptotik ölümden kaçmasına ve metastazın gelişmesine olanak tanıyan başlıca kanser belirleyicidir. DNA hasarını apoptozise bağlayan merkezi bir sensör olan p53, birçok tümör tipinde tümör baskılanmasında ve kemoresistivitesinde önemli rol oynar. Bununla birlikte, mutasyon analizi p53 geninin melanomların sadece yaklaşık % 11'inde değiştiğini ortaya koymaktadır (12). P53'ün düşük mutasyon oranı, diğer tümör supressör genlerin melanom patogeneziinde önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir (13).

ING gen ailesinin bugüne kadar 5 bireyi tanımlanmıştır ve 5 ayrı kromozomlarda yerleşmektedir. ING proteinleri apoptozu destekleme, DNA hasarının onarılması, hücre yaşlanmayı kontrol etme, hücre proliferasyonu üzerinde negatif etki, kromatin yapının yeniden düzenlenmesi, hormon yanıtı kontrolü, NF-kB ve hipoksi ilişkili neoplazi yollarında görev alırlar (15).

ING proteinlerinin p53 etki mekanizması için gerekli olduğu düşünülmektedir. Ancak, literatürde ING proteinlerinin p53'ten bağımsız çalıştığı yönünde yayınlar vardır (14). Unoki ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada ING ailesinin üyelerinden ING2'nin bir alt varyantını izole etmişlerdir. ING-2b olarak adlandırdıkları bu gen ING-2a ile aynı ekzon üzerinde yer almakta ve p53 bağlandığı bir N-terminali içermemektedir. p53 aktivasyonlarında ING-2a süprese olurken ING-2b etkilenmemektedir. ING-2a yalnızca p53 varlığında hücre büyümesini engellerken; ING2b hücre büyümesi üzerinde etkili olmayıp hücre çoğalma siklusunda duraklama ve apoptozisde aşağı yönde bir regülasyona neden olmakta ve bunu p53'den bağımsız olarak yapmaktadır. ING-2b'nin promoter bölgesi p53 bağlanma bölgesi içermediğinden p53'ten bağımsız olarak fonksiyon görmektedir. Wang ve ark.'ları ING2'nin N terminalinde lösün fermuar modeline benzer bir bölgenin bulunduğunu ve bu bölgenin p53'ün modülasyonu ile p53 aracılığı ile kromatin remodelizasyonda ve apoptozisin baslatılmasında da etkili olduğu gösterilmiştir. ING2a ve ING2b hücre siklus arresti ve apoptoziste kompensatuar bir rol oynamakta ve belkide kemoterapötiklere rezistanstans gelişiminde sorumlu olmaktadır. Nutlin-3a ve Adriamisin'in indüklediği p53 salınımı sonucu ING2a salınımı azalırken ING2b'nin değişmediği gösterilmiştir. Bu bilgiler insan fibroblast kültürlerinde yapılan çalışmalarla da doğrulanmıştır.

Son zamanlarda ING proteinlerinin hücre proliferasyonunu, apoptozu, tümör süpressif özellikleri, anjiyogenezi ve DNA tamirini düzenlediği mekanizmalar, yoğun

bir araştırmanın konusu olmuştur. Önceki çalışmalar kolorektal karsinomda ING2'nin p53 ile işbirliği yaparak hücre döngüsü G1-fazda tutulmasını ve apoptozisi artırdığını göstermiştir. ING2 p300 ile birlikte p53 asetilasyonu yoluyla replikatif yaşlanmayı ve PHD alanından fosfoinositidle (PtdInsPs) etkileşerek DNA hasarına karşı nuklear cevabı düzenlediği bildirilmiştir. Bundan başka ING2 ya nükleotid eksizyon onarımını güçlendirerek yada melanom hücrelerinde UV kaynaklı apoptozu teşvik ederek UV ışınlarına karşı hücrel stres yanıtında önemli rol oynar (16). UV ışınlarına maruz kalmış hücrelerde ING2'nin ekspresyon artışı Bcl2 ekspresyonunun baskılanmasına, Bax proteinlerinin mitokondri içerisine translokasyonuna ve bunun sonucu olarak sitokrom c serbestlenmesi ile kaspas- 3 ve kaspas- 9 aktivasyonuna sebep olur. ING2'nin ekspresyonunda azalma UV ile indüklenmiş apoptoziste gecikmeye neden olmaktadır (13).

Yapılan çeşitli çalışmalarda baş-boyun SCC'lerinde, hepatosellüler karsinomda, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, malign melanomda ING2'nin ekspresyon azalması gösterilmiştir. Genel kaide olarak tümör supressor gen olarak düşünülse, kolorektal karsinomda, servikal kanserde, Burkitt lenfomada ING2'nin aşırı ekspresyonu farklı tümörlerde farklı şekilde davrandığını göstermektedir (74).

Bu çalışmanın temel amacı tümör baskılayıcı ING2 geninin metastatik malign melanom hastalarında sağlam deri ve primer tümörde, sağlam lenf nodu ve metastatik lenf nodunda anormal şekilde eksprese olup-olmadığını araştırmaktır. İkinci amaç sağlam ve metastatik lenf nodu dokularında ING2 ekspresyonları arasındaki farkla primer tümörün Breslow kalınlığı arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır. Daha önce yapılan çalışmalarda nukleer ING2 ekspresyonunun, displastik nevusla karşılaştırıldığında, radyal büyüme fazında (RGP), vertikal büyüme fazında (VGP) ve metastatik melanomlarda anlamlı derecede azaldığını gösterilmiştir (P <0.05). Aynı çalışmada ayrıca nukleer ING2 ekspresyonunun hastanın cinsiyet, yaş veya tümör kalınlığı, ülserasyon, Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) evresi, tümör alt tipi, yeri ve 5 yıllık sağkalımı ile ilişkili olmadığını da ortaya konulmuştur.

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar primer tümör ve sağlam deri dokusu arasında ING2 ekspresyon düzeyi karşılaştırıldığında ING2'nin tümör hücrelerinde baskılandığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu sonuçlar daha önce yapılan

çalışmalarla benzerdir ve ING2'nin bir tümör süpresör gen olduğunu desteklemektedir (p=0,033).

Ythier D ve ark.'larının yaptığı çalışmaya göre SCC'de ING2'nin ekspresyon seviyesi lenf nodu metastazı ve TNM evresi arasında ters ilişki mevcuttur (130). ING2 ekspresyonunun azalması SCC gelişmesi ve ilerlemesinde rol aldığı gösterilse de daha önce primer deri melanomlarının lenf nodu metastazları ile sağlam lenf nodu arasındaki ING2 düzeyi farkına bakılan çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız çalışmada sağlam lenf nodu ve metastatik lenf nodu ING2 ekspresyon düzeyi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (p=0,461 ; p>0,05).

Primer malign melanomda tümör kalınlığı lenf nodu metastazı için en önemli prediktör değerlerdendir. Breslow sınıflamasına göre tümör kalınlığının her bir ünite artışı, pozitif sentinel lenf nodu (SLN) metastaz riskini %13 artırmaktadır (131). Biz bu çalışmamızda sağlam ve metastatik lenf nodu arasındaki ING2 ekspresyon farkı ile primer tümörün Breslow sınıflamasına göre kalınlığı arasındaki korelasyonu araştırdık. Ancak bu iki parametre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (p=0,695).

F Lu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada primer tümör kalınlığı ve ING2 ekspresyon farkı arasında korelasyon olmadığı görülmüştür (13). Bizim yaptığımız çalışmada da primer tümör ve sağlam deri doku hücrelerinde bakılan ING2 ekspresyon farkı ile primer tümörün Breslow kalınlığı arasında ilişki saptanmamıştır (p=0,424).

Primer tümör kalınlığına göre hastalar ince kalınlıkta (Breslow kalınlığı <2mm), orta kalınlıkta (Breslow kalınlığı 2-4mm) ve kalın (Breslow kalınlığı >4mm) olarak 3 gruba ayrıldı. Herbir grup hem primer tümör ve sağlam deri tümörü arasında olan ekspresyon farkı (delta Ct), hemde metastatik ve metastatik olmayan lenf nodu arasındaki ekspresyon farkı (delta Ct) karşılaştırılarak tümör kalınlığı ile ekspresyon arasında korelasyon olup olmadığı araştırıldı. Primer tümör ve sağlam deri dokusu delta Ct değerleri ve primer tümör kalınlığına göre gruplarla karşılaştırıldığı zaman üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı (p= 0,270). Metastatik ve metastaz olmayan lenf nodu dokusu delta Ct değerleri ve primer tümör kalınlığına göre gruplarla karşılaştırıldığı zaman üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı (p=0,987).

ING gen ekspresyonu farklı organlarda farklı düzeylerde eksprese olduğu bilinmektedir (132). Bu bilgi göz önünde bulundurularak farklı dokular değil, aynı dokuların tümörlü ve tümör içermeyen hücrelerinde ING2 ekspresyon düzeyi karşılaştırılmıştır.

Özet olarak, bu çalışma ile ING2 geninin tümör süpressör gen olması konusunda diğer çalışmalar desteklense, primer tümör kalınlığı ve metastatik lenf nodunda ekspresyon düzeyi arasında herhangi bir korelasyonun olmadığı, ayrıca primer tümör kalınlığı ve primer tümörde ING2 ekspresyon seviyesi arasında ilişkinin olmadığı ortaya konuldu. İstatistiksel olarak daha güvenilir sonuçların elde edilmesi için geniş serili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



7.KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(1):7–30.
2. Jemal A, Saraiya M, Patel P, Cherala SS, Barnholtz-Sloan J, Kim J, et al. Recent trends in cutaneous melanoma incidence and death rates in the United States, 1992-2006. *J Am Acad Dermatol.* 2011;65(5 Suppl 1):17-25. e1-3.
3. Williams ML, Sagebiel RW. Melanoma risk factors and atypical moles. *West J Med.* 1994;160(4):343–50.
4. Evans RD, Kopf AW, Lew RA, Rigel DS, Bart RS, Friedman RJ, et al. Risk factors for the development of malignant melanoma—1: review of case-control studies. *J Dermatol Surg Oncol.* 1988;14:393–408.
5. Naeyaert JM, Brochez L. Clinical practice. Dysplastic nevi. *N Engl J Med.* 2003;349(23):2233–40.
6. Rigel DS, Rivers JK, Kopf AW, Friedman RJ, Vinokur AF, Heilman ER, et al. Dysplastic nevi. Markers for increased risk for melanoma. *Cancer.* 1989;63(2):386–9.
7. Ivry GB, Ogle CA, Shim EK. Role of sun exposure in melanoma. *Dermatol Surg.* 2006;32(4):481–92.
8. Elder D. Tumor progression, early diagnosis and prognosis of melanoma. *Acta Oncol.* 1999;38(5):535–47.
9. 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. *J Clin Oncol [Internet].* 2001;19(16):3622–34.
10. Atallah E, Flaherty L. Treatment of metastatic malignant melanoma. *Curr. Treat. Options in Oncol.* 2005;6(3):185–93.
11. Glogau RG. The risk of progression to invasive disease. *J Am Acad Dermatol [Internet].* 2000;42(1 Pt 2):23–4.
12. Hussein MR. The TP53 tumor suppressor gene and melanoma tumorigenesis: Is there a relationship? *Tumor Biol.* 2004;25:200–7.
13. Lu F, Dai DL, Martinka M, Ho V, Li G. Nuclear ING2 expression is reduced in human cutaneous melanomas. *Br J Cancer.* 2006;95(1):80–6.
14. Ythier D, Larrieu D, Brambilla C, Brambilla E, Pedeux R. The new tumor suppressor genes ING: genomic structure and status in cancer. *Int J Cancer.* 2008;123(7):1483–90.
15. Guérillon C, Bigot N, Pedeux R. The ING tumor suppressor genes: Status in human tumors. *Cancer Lett [Internet].* 2013;345(1):1-16.

16. Lu F, Dai DL, Martinka M, Ho V, Li G. Nuclear ING2 expression is reduced in human cutaneous melanomas. *Br J Cancer*. 2006;95(1):80–6.
17. Gloster HM, Brodland DG. The epidemiology of skin cancer. *Dermatologic Surg*. 1996;22(3):217–26.
18. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. Jan;60(5):277–300.
19. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: Epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*. 2014;28(6):1005–12.
20. MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AMM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol*. 2009;20(SUPPL. 6):vi 1-7.
21. Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, McWilliams RR, Kottschade LA, Creagan ET, et al. Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 1: Epidemiology, Risk Factors, Screening, Prevention, and Diagnosis. *Mayo Clin Proc [Internet]*. 2007;82(3):364–80.
22. Lasithiotakis K, Leiter U, Kruger-Krasagakis S, Tosca A, Garbe C. Comparative analysis of incidence and clinical features of cutaneous malignant melanoma in Crete (Greece) and southern Germany (central Baden-Wurttemberg). *Br J Dermatol*. 2006;154(6):1123–7.
23. Türkmen A, Temel M, Bekerecioglu M. Primary mucosal malignant melanoma of the oral cavity. *Eur J Plast Surg*. 2011;34(5):325-9.
24. Khan AQ, Travers JB, Kemp MG. Roles of UVA radiation and DNA damage responses in melanoma pathogenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2018;59(5):438-60.
25. Brem R, Guven M, Karran P. Oxidatively-generated damage to DNA and proteins mediated by photosensitized UVA. *Free Rad Biol Med*. 2017;107:101–9.
26. Stern RS. The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44(5):755–61.
27. Stern RS, Nichols KT, Väkevä LH. Malignant Melanoma in Patients Treated for Psoriasis with Methoxsalen (Psoralen) and Ultraviolet A Radiation (PUVA). *N Engl J Med [Internet]*. 1997;336(15):1041–5.
28. Kennedy C, Ter Huurne J, Berkhout M, Gruis N, Bastiaens M, Bergman W, et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J Invest Dermatol*. 2001;117(2):294–300.
29. Turkmen A, Isik D, Bekerecioglu M. Comparison of classification systems for congenital melanocytic nevi. *Dermatol Surg*. 2010;36(10):1554-62.
30. Massi D, Carli P, Franchi A, Santucci M. Naevus-associated melanomas: Cause or chance? *Melanoma Res*. 1999;9(1):85–91.

31. Skender-Kalnenas TM, English DR, Heenan PJ. Benign melanocytic lesions: Risk markers or precursors of cutaneous melanoma? *J Am Acad Dermatol.* 1995;33(6):1000–7.
32. Berwick M, Erdei E, Hay J. Melanoma Epidemiology and Public Health. *Dermatol Clin.* 2009;27(2):205–14.
33. Kopf AW, Hellman LJ, Rogers GS, Gross DF, Rigel DS, Friedman RJ, et al. Familial malignant melanoma. *J Am Med Assoc.* 1986;256(14):1915–9.
34. Lynch HT, Shaw TG. Familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM) syndrome: history, genetics, and heterogeneity. *Fam Cancer.* 2016;15(3):487–91.
35. Greene MH, Clark WH, Tucker MA, Kraemer KH, Elder DE, Fraser MC. High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann Intern Med.* 1985;102(4):458–65.
36. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *Vivo - Int J Exp Clin Pathophysiol Drug Res [Internet].* 2014;28(6):1005–12.
37. Millikan RC, Hummer A, Begg C, Player J, de Cotret AR, Winkel S, et al. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and risk of multiple primary melanoma: The Genes Environment and Melanoma Study. *Carcinogenesis.* 2006;27(3):610–8.
38. Giles G, Staples M, McCredie M, Coates M. Multiple primary melanomas: an analysis of cancer registry data from Victoria and New South Wales. *Melanoma Res.* 1995;5(6):433–8.
39. Kong Y, Kumar SM, Xu X. Molecular pathogenesis of sporadic melanoma and melanoma-initiating cells. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(12):1740–9.
40. Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol.* 2008;1(4):395–405.
41. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949–54.
42. Sapio MR, Posca D, Troncone G, Pettinato G, Palombini L, Rossi G, et al. Detection of BRAF mutation in thyroid papillary carcinomas by mutant allele-specific PCR amplification (MASA). *Eur J Endocrinol.* 2006;154(2):341–8.
43. Flaherty K, Puzanov I, Sosman J, Kim K, Ribas A, McArthur G, et al. Phase I study of PLX4032: Proof of concept for V600E BRAF mutation as a therapeutic target in human cancer. *ASCO Meet Abstr [Internet].* 2009;27:9000.
44. Zhou XP, Gimm O, Hampel H, Niemann T, Walker MJ, Eng C. Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. *Am J Pathol.* 2000;157(4):1123–8.

45. Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, Hassan M, Tannapfel A, Ruzicka T, et al. Epigenetic Silencing of the *PTEN* Gene in Melanoma. *Cancer Res* [Internet]. 2006;66(13):6546–52.
46. Madhunapantula S V., Robertson GP. The PTEN-AKT3 signaling cascade as a therapeutic target in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22(4):400–19.
47. Ashida A, Takata M, Murata H, Kido K, Saida T. Pathological activation of KIT In metastatic tumors of acral and mucosal melanomas. *Int J Cancer.* 2009;124(4):863–8.
48. Hodi FS, Friedlander P, Corless CL, Heinrich MC, Mac Rae S, Kruse A, et al. Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J Clin Oncol.* 2008;26(12):2046–51.
49. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature.* 2005;436(7047):117–22.
50. Denat L, Larue L. [Malignant melanoma and the role of the paradoxal protein Microphthalmia transcription factor]. *Bull Cancer* [Internet]. 2007;94(1):81–92.
51. Sherr CJ. Principles of Tumor Suppression. *Cell.* 2004;116:235–46.
52. Akslen LA, Monstad SE, Larsen B, Straume O, Øgreid D. Frequent mutations of the p53 gene in cutaneous melanoma of the nodular type. *Int J Cancer.* 1998;79(1):91–5.
53. Temel M, Turkmen A, Dokuyucu R, Cevik C, Oztuzcu S, Cengiz B, et al. A novel tumor suppressor gene in basal cell carcinoma: inhibition of growth factor-2. *Tumour Biol.* 2015;36(6):4611–6.
54. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 2008;68(10):3645–54.
55. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature.* 2005;438(7069):820–7.
56. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Practice Guidelines in Oncology: Melanoma Version 1, Available from https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/melanoma.pdf (accessed 2017)
57. Cornelison R. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *Dermatol Cryosurg Cryother.* 2016; 695–700.
58. Bastian BC. The Molecular Pathology of Melanoma: An Integrated Taxonomy of Melanocytic Neoplasia. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2014;9(1):239–71.

59. Kao GF, Helwig EB, Graham JH. Balloon cell malignant melanoma of the skin. A clinicopathologic study of 34 cases with histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural observations. *Cancer*. 1992;69(12):2942–52.
60. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long G V., Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2017;67(6):472-92.
61. Wrightson WR, Wong SL, Edwards MJ, Chao C, Reintgen DS, Ross MI, et al. Complications Associated With Sentinel Lymph Node Biopsy for Melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2003;10(6):676–80.
62. Morton DL, Cochran AJ, Thompson JF, Elashoff R, Essner R, Glass EC, et al. Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: Accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. *Ann Surg*. 2005;242(3):302–13.
63. Wasserberg N, Tulchinsky H, Schachter J, Feinmesser M, Gutman H. Sentinel-lymph-node biopsy (SLNB) for melanoma is not complication-free. *Eur J Surg Oncol*. 2004;30(8):851–6.
64. Andtbacka RHI, Gershenwald JE. Role of sentinel lymph node biopsy in patients with thin melanoma. *J Natl Compr Canc Netw* [Internet]. 2009;7(3):308–17.
65. Ortega Candil A, Rodríguez Rey C, Carreras Delgado JL. Malignant Melanoma. *ISRN Dermatol* [Internet]. 2012;2012:1–7.
66. Mays MP, Martin RCG, Burton A, Ginter B, Edwards MJ, Reintgen DS, et al. Should all patients with melanoma between 1 and 2 mm Breslow thickness undergo sentinel lymph node biopsy? *Cancer*. 2010;116(6):1535–44.
67. Rondelli F, Vedovati MC, Becattini C, Tomassini GM, Messina S, Noya G, et al. Prognostic role of sentinel node biopsy in patients with thick melanoma: a meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* [Internet]. 2012;26(5):560–5.
68. Bartlett EK, Karakousis GC. Current staging and prognostic factors in melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(2):215–27.
69. Thompson JF, Soong SJ, 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. *J Clin Oncol*. 2011;29(16):2199–205.
70. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Ding S, Byrd DR, et al. Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: Comparison of nodal micrometastases versus macrometastases. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2452–9.
71. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *N Engl J Med* [Internet]. 2012;366(8):707–14.

72. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003 Jun;36(3):131–49.
73. Cabadak, H. Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi.* 2008;9(3):51–61.
74. Unoki M, Kumamoto K, Takenoshita S, Harris CC. Reviewing the current classification of inhibitor of growth family proteins. *Cancer Sci.* 2009;100(7):1173–9.
75. Jafarnejad SM, Li G. Regulation of p53 by ING family members in suppression of tumor initiation and progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31(1–2):55–73.
76. Coles AH, Jones SN. The ING gene family in the regulation of cell growth and tumorigenesis. *J Cell Physiol.* 2009;218(1):45–57.
77. Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K. Suppression of the novel growth inhibitor p33(ING1) promotes neoplastic transformation. *Nat Genet.* 1996;14(4):415–20.
78. Ythier D, Larrieu D, Brambilla C, Brambilla E, Pedoux R. The new tumor suppressor genes ING: genomic structure and status in cancer. *Int J Cancer [Internet].* 2008;123(7):1483–90.
79. Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF. The PHD finger: Implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci.* 1995;20(2):56–9.
80. Pascual J, Martinez-Yamout M, Dyson HJ, Wright PE. Structure of the PHD zinc finger from human Williams-Beuren syndrome transcription factor. *J Mol Biol.* 2000;304(5):723–9.
81. Ragvin A, Valvatne H, Erdal S, Årskog V, Tufteland KR, Breen K, et al. Nucleosome binding by the bromodomain and PHD finger of the transcriptional cofactor p300. *J Mol Biol.* 2004;337(4):773–88.
82. Bienz M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(1):35–40.
83. Ha S, Park S, Yun CH, Choi Y. Characterization of nuclear localization signal in mouse ING1 homolog protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293(1):163–6.
84. Gong W, Suzuki K, Russell M, Riabowol K. Function of the ING family of PHD proteins in cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(85):1054–65.
85. Soliman MA, Riabowol K. After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(11):509–19.
86. Wang Y, Wang J, Li G. Leucine zipper-like domain is required for tumor suppressor ING2-mediated nucleotide excision repair and apoptosis. *FEBS Lett.* 2006;580(16):3787–93.

87. He GHY, Helbing CC, Wagner MJ, Sensen CW, Riabowol K. Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Mol Biol Evol.* 2005;22(1):104–16.
88. Shiseki M, Nagashima M, Pedoux RM, Kitahama-Shiseki M, Miura K, Okamura S, et al. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res.* 2003;63(10):2373–8.
89. Zhang X, Wang K-S, Wang Z-Q, Xu L-S, Wang Q-W, Chen F, et al. Nuclear localization signal of ING4 plays a key role in its binding to p53. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331(4):1032–8.
90. Campos EI, Chin MY, Kuo WH, Li G. Biological functions of the ING family tumor suppressors. *Cell Mol Life Sc.* 2004;61(19-20):2597–613.
91. Garkavtsev I, Kozin S V., Chernova O, Xu L, Winkler F, Brown E, et al. The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature.* 2004;428(6980):328–32.
92. Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Côté V, Selleck W, et al. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell.* 2006;21(1):51–64.
93. Helbing CC, Veillette C, Riabowol K, Johnston RN, Garkavtsev I. A Novel Candidate Tumor Suppressor, ING1, Is Involved in the Regulation of Apoptosis. *Cancer Res [Internet].* 1997;57(7):1255–8.
94. Vieyra D, Toyama T, Hara Y, Boland D, Johnston R, Riabowol K. ING1 isoforms differentially affect apoptosis in a cell age-dependent manner. *Cancer Res.* 2002;62(15):4445–52.
95. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science.* 1996;274(5288):787–9.
96. Wijnhoven SWP, Hoogervorst EM, de Waard H, van der Horst GTJ, van Steeg H. Tissue specific mutagenic and carcinogenic responses in NER defective mouse models. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2007;614(1–2):77–94.
97. Aylon Y, Oren M. Living with p53, Dying of p53. *Cell.* 2007;130(4):597–600.
98. Garkavtsev I, Grigorian IA, Ossovskaya VS, Chernov M V., Chumakov PM, Gudkov A V. The candidate tumour suppressor p33(ING1) cooperates with p53 in cell growth control. *Nature.* 1998;391(6664):295–8.
99. Leung KM, Po LS, Tsang FC, Siu WY, Lau A, Ho HTB, et al. The candidate tumor suppressor ING1b can stabilize p53 by disrupting the regulation of p53 by MDM2. *Cancer Res.* 2002;62(17):4890–3.
100. Feng X, Bonni S, Riabowol K. HSP70 induction by ING proteins sensitizes cells to tumor necrosis factor alpha receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol [Internet].* 2006;26(24):9244–55.

101. Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 20):4589–92.
102. Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: Revisiting old friends from the NF-κB pathway. *Trends Immunol.* 2005;26(9):469–76.
103. Perkins ND. NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol.* 2004;14(2):64–9.
104. Shimada Y, Saito A, Suzuki M, Takahashi E, Horie M. Cloning of a novel gene (ING1L) homologous to ING1, a candidate tumor suppressor. *Cytogenet Cell Genet.* 1998;83(3–4):232–5.
105. Nagashima M, Shiseki M, Miura K, Hagiwara K, Linke SP, Pedeux R, et al. DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(17):9671–6.
106. Pedeux R, Sengupta S, Shen JC, Demidov ON, Saito S, Onogi H, et al. ING2 regulates the onset of replicative senescence by induction of p300-dependent p53 acetylation. *Mol Cell Biol.* 2005;25(15):6639–48.
107. Kumamoto K, Spillare EA, Fujita K, Horikawa I, Yamashita T, Appella E, et al. Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. *Cancer Res.* 2008;68(9):3193–203.
108. Sarker KP, Kataoka H, Chan A, Netherton SJ, Pot I, Huynh MA, et al. ING2 as a novel mediator of transforming growth factor-beta-dependent responses in epithelial cells. *J Biol Chem.* 2008;283(19):13269–79.
109. Chin MY, Ng KCP, Li G. The novel tumor suppressor p33ING2 enhances UVB-induced apoptosis in human melanoma cells. *Exp Cell Res.* 2005;304(2):531–43.
110. Unoki M, Kumamoto K, Harris CC. ING proteins as potential anticancer drug targets. *Curr Drug Targets.* 2009;10(5):442–54.
111. Borkosky SS, Gunduz M, Nagatsuka H, Beder LB, Gunduz E, Al Sheikh Ali M, et al. Frequent deletion of ING2 locus at 4q35.1 associates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135(5):703–13.
112. Okano T, Gemma A, Hosoya Y, Hosomi Y, Nara M, Kokubo Y, et al. Alterations in novel candidate tumor suppressor genes, ING1 and ING2 in human lung cancer. *Oncol Rep.* 2006;15(3):545–9.
113. Zhang H kun, Pan K, Wang H, Weng D sheng, Song H feng, Zhou J, et al. Decreased expression of ING2 gene and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2008;261(2):183–92.
114. Kumamoto K, Fujita K, Kurotani R, Saito M, Unoki M, Hagiwara N, et al. ING2 is upregulated in colon cancer and increases invasion by enhanced MMP13 expression. *Int J cancer.* 2009;125(6):1306–15.

115. Binda O, Nassif C, Branton PE. SIRT1 negatively regulates HDAC1-dependent transcriptional repression by the RBP1 family of proteins. *Oncogene*. 2008;27(24):3384–92.
116. Wang Y, Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of nuclear ING3 expression in human cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13(14):4111–6.
117. Nagashima M, Shiseki M, Pedoux RM, Okamura S, Kitahama-Shiseki M, Miura K, et al. A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene*. 2003;22(3):343–50.
118. Wang Y, Li G. ING3 promotes UV-induced apoptosis via Fas/caspase-8 pathway in melanoma cells. *J Biol Chem*. 2006;281(17):11887–93.
119. Gorrini C, Squatrito M, Luise C, Syed N, Perna D, Wark L, et al. Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. *Nature*. 2007;448(7157):1063–7.
120. Liu E, Wu J, Cao W, Zhang J, Liu W, Jiang X, et al. Curcumin induces G2/M cell cycle arrest in a p53-dependent manner and upregulates ING4 expression in human glioma. *J Neurooncol*. 2007;85(3):263–70.
121. Colla S, Tagliaferri S, Morandi F, Lunghi P, Donofrio G, Martorana D, et al. The new tumor-suppressor gene inhibitor of growth family member 4 (ING4) regulates the production of proangiogenic molecules by myeloma cells and suppresses hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) activity: Involvement in myeloma-induced angiogenesis. *Blood*. 2007;110(13):4464–75.
122. Unoki M, Shen JC, Zheng ZM, Harris CC. Novel splice variants of ING4 and their possible roles in the regulation of cell growth and motility. *J Biol Chem*. 2006;281(45):34677–86.
123. Ozer A, Wu LC, Bruick RK. The candidate tumor suppressor ING4 represses activation of the hypoxia inducible factor (HIF). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(21):7481–6.
124. Avvakumov N, Côté J. The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene*. 2007;26(37):5395–407.
125. Contzler R, Regamey A, Favre B, Roger T, Hohl D, Huber M. Histone acetyltransferase HBO1 inhibits NF- κ B activity by coactivator sequestration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;350(1):208–13.
126. Iizuka M, Sarmiento OF, Sekiya T, Scrabble H, Allis CD, Smith MM. Hbo1 Links p53-Dependent Stress Signaling to DNA Replication Licensing. *Mol Cell Biol*. 2008;28(1):140–53.
127. Champagne KS, Saksouk N, Peña P V., Johnson K, Ullah M, Yang XJ, et al. The crystal structure of the ING5 PHD finger in complex with an H3K4me3 histone peptide. *Proteins Struct Funct Genet*. 2008;72(4):1371–6.

128. Temel M, Turkmen A, Dokuyucu R, Cevik C, Oztuzcu S, Cengiz B, et al. A novel tumor suppressor gene in basal cell carcinoma: inhibition of growth factor-2. *Tumor Biol.* 2015;36(6):4611–6.
129. Türkmen A, Küçüksucu MA. (2016) *Skvamöz hücreli karsinomda ING-2 gen fonksiyonlarının çalışılması.* (Yayınlanmamış Tez) İstanbul Üniversitesi, Türkiye.
130. Pan YQ, Zhang X, Xu DP, Bao WG, Lin AF, Xu HH, et al. Decreased expression of ING2 gene and its clinicopathological significance in chinese NSCLC patients. *Neoplasma.* 2014;61(4):468-75.
131. Cadili A, Dabbs K. Predictors of sentinel lymph node metastasis in melanoma. *Can J Surg.* 2010;53(1):32-6.
132. Coles AH, Jones SN. The ING gene family in the regulation of cell growth and tumorigenesis. *J Cell Physiol.* 2009;218(1):45–57.