



NEVÜS OLGULARINDA BRAF V599E MUTASYONU VARLIĞI

Ayşen ÇETİN

**Ağustos 2006
DENİZLİ**

NEVÜS OLGULARINDA BRAF V599E MUTASYONU VARLIĞI

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

Ayşen ÇETİN

Danışman: Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI

**Ağustos, 2006
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Ayşen ÇETİN tarafından Prof. Dr. Hüseyin Bağcı yönetiminde hazırlanan “**Nevüs Olgularında BRAF V599E Mutasyonu Varlığı**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI

Jüri Üyesi

Doç. Dr. A. Çevik TUFAN

Jüri Üyesi

Doç Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun / /
tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. A. Çevik TUFAN
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :
Öğrenci Adı Soyadı : Ayşen ÇETİN

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında maddi manevi desteklerini esirgemeyen, başta Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI olmak üzere Doç. Dr. N. Lale TUFAN ve Doç. Dr. A. Çevik TUFAN`a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmadaki örnekleri sağlayan ve patolojik bilgilerini esirgemeyen Doç Dr. Neşe DEMİRKAN`a ve Arş. Gör. Dr. Şermin ÇOBAN`a ayrıca tez süresince desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

ÖZET

NEVÜS OLGULARINDA BRAF V599E MUTASYONU VARLIĞI

Çetin, Aysen
Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji AD
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI

Ağustos 2006, 93 Sayfa

BRAF, RAF gen ailesindedir ve 7. kromozomun uzun kolunda lokalizedir (7q34). BRAF geni MAPK sinyal yolunda görevli ve serin/treonin kinaz aktivitesi olan bir protein kodlar. BRAF geninde meydana gelen çeşitli mutasyonların MAPK sinyal yolunun aktivitesini artırarak, çekirdek içi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile hücre çoğalmasına neden olduğu düşünülmektedir. Melanomlarda tanımlanmış olan BRAF ekzon 15, T1796A transversiyonu, 599 numaralı valin'in yerine glutamik asit'in kodlanmasına neden olur. Literatürde V599E mutasyonunun melanoma örneklerinde görülme sıklığının %90'ın üzerinde olduğu belirtilmektedir. Bu tez çalışmasının amacı, nevüs olgularında BRAF gen mutasyonu varlığının araştırılmasıdır.

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalında nevüs tanısı almış 30 olgu çalışma kapsamına alınmıştır. Parafin kesitlerden DNA izolasyonunu takiben, BRAF geninin 1796 nükleotid bölgesini içeren DNA parçası polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra DNA dizi analizi ile mutasyon varlığı araştırılmıştır. Ayrıca aynı olgular Anti-ACTİVE® MAPK pAb Rabbit, (pTEpY) antikorunu kullanılarak immunohistokimyasal yöntemle boyanarak olası MAPK sinyal yolu aktivasyonu araştırılmıştır.

30 olgunun 5 tanesinde (%16.6) T1796A transversiyonuna bağlı V599E mutasyonunun varlığı tespit edildi ve immunohistokimyasal analizde bu olgulardaki mutasyona bağlı MAPK sinyal yolu aktivasyonunun olmadığı gözlemlendi. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar nevüslerde BRAF V599E mutasyonu sıklığının melanomlardaki kadar yüksek olmadığını göstermektedir. Ancak Türk hasta popülasyonu yönünden kesin bir yargıya varılabilmesi için bu çalışmadaki örnek sayısının artırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nevüs, BRAF gen, mutasyon, PCR, dizi analizi.

ABSTRACT

BRAF V599E MUTATION INCIDENCE IN NEVI CASES

Çetin, Aysen

Thesis in Tibbi Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI

August 2006, 93 Pages

BRAF belongs to the family of RAF gene located at long arm of chromosome 7 (7q34). The BRAF gene encodes a protein that has function in MAPK signaling pathway with serin/threonin kinase activity. It has been thought that diverse mutations occurring in BRAF gene may activate MAPK signaling pathway which results in nuclear transcription factors activation. T1796A transversion of BRAF gene has been defined in melanomas that causes missense coding of glutamic acid rather than valin at aminoacid at position 599. It is suggested that incidence of the V599E mutation in the melanoma samples is nearly ninety percent (%90). The aim of this thesis study is to analyze incidence of BRAF T1796A gene mutation in nevi samples.

Thirty nevi cases, diagnosed at the department of Pathology Pamukkale University Medical Faculty, were included in this study. After DNA isolation from the paraffin blocks, presence of BRAF V599E mutation is investigated by the amplification of DNA segment including 1796. nucleotide region with polymerase chain reaction and direct DNA sequencing. The same samples also stained with Anti-ACTIVE[®] MAPK pAb Rabbit, (pTEpY) antibody in order to analyze MAPK signaling pathway activation.

The presence of V599E mutation depending on the T1796A transversion is determined in five of thirty cases (%16.6), and the immunohistochemistry does not support the MAPK signaling pathway activation depending on the mutation in these cases. Results of this thesis study suggest that the incidence of BRAF V599E mutation in nevi samples is not as high as described in melanomas. However, for a certain decision on the Turkish patient population, the number of samples included in this study should be significantly increased.

Key Words: Nevi, BRAF gene, mutation, PCR, sequence analysis.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Tez Onay Sayfası.....	i
Bilimsel Etik Sayfası.....	ii
Teşekkür.....	iii
Özet.....	iv
Abstract.....	v
İçindekiler Dizini.....	vi
Şekiller Dizini.....	vii
Tablolar Dizini.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1.Nevüsün Tanımı ve Nevüs Tipleri.....	2
1.2. Nevüs Sınıflaması.....	10
1.3. Derinin Yapısı ve Gelişmesi.....	13
1.4. UV Işık ve Deri Üzerine Etkileri.....	18
1.5 Mutasyon.....	20
1.6.Kanser Biyolojisi.....	23
1.7. BRAF Geni.....	25
1.8. BRAF Geni Mutasyonu, Melanom ve Nevüs İlişkisi.....	32
1.9. Hücre Uyarı Sistemleri, MAPK Sinyal Yolu ve ERK 1/2.....	35
1.10. Hücre Döngüsü ve Kontrolü.....	43
2. MATERYAL VE METOT.....	45
2.1. Örnekler.....	45
2.2. DNA İzolasyonu.....	47
2.3. Spektrofotometrik Ölçüm.....	49
2.4. Mutasyon Analizi-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	50
2.5. PZR Ürününün Görüntülenmesi.....	51
2.6. Dizi Analizi.....	51
2.7. İmmunohistokimya.....	51
2.8. İstatistiksel Analiz.....	52
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	53
4. SONUÇ.....	67
5. KAYNAKLAR.....	69
6. EKLER.....	78
7.ÖZGEÇMİŞ.....	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Raf Ailesi Üyelerinin Domain Yapısı.....	26
Şekil 1.2 BRAF Kinaz Domain Yapısı.....	28
Şekil 1.3 İnsan Kanserlerinde Somatik Mutasyonları Tanımlanmış Olan BRAF Gen Yapısı.	28
Şekil 1.4 RAS-ERK Sinyal Yolu.....	30
Şekil 1.5 Raf-1 Aktivasyon Modeli.....	37
Şekil 1.6 B-Raf Aktivasyon Modeli.....	38
Şekil 1.7 RAS/RAF/ERK/MAP Kinaz Sinyal Yolu.....	41
Şekil 3.1 %1.5`luk agaroz jeldeki görüntü.....	53
Şekil 3.2 %1`lik agaroz jeldeki görüntü.....	53
Şekil 3.3 BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonlu 5 numaralı örnek.....	56
Şekil 3.4 BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonlu 9 numaralı örnek.....	56
Şekil 3.5 BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonlu 18 numaralı örnek.....	57
Şekil 3.6 BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonlu 25 numaralı örnek.....	57
Şekil 3.7 BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonlu 28 numaralı örnek.....	58
Şekil 3.8 BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonu için pozitif kontrol olan melanoma hücre dizinine ait dizi analizi.....	58
Şekil 3.9 BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonu olmayan 1 numaralı örnek.....	59
Şekil 3.10 5 numaralı örneğe ait dizi analizi.....	59
Şekil 3.11 9 numaralı örneğe ait dizi analizi.....	60
Şekil 3.12 18 numaralı örneğe ait dizi analizi.....	60
Şekil 3.13 25 numaralı örneğe ait dizi analizi.....	61
Şekil 3.14 28 numaralı örneğe ait dizi analizi.....	61
Şekil 3.15 Yanak cildinden alınan intradermal nevüse ait stoplazmik ERK 1/2 pozitifliğini gösteren görüntüler.....	63
Şekil 3.16 Boyundan alınan intradermal nevüse ait stoplazmik ERK ½ pozitifliğini gösteren görüntüler.....	64
Şekil 3.17 Yüz derisinden alınan intradermal nevüse ait stoplazmik ERK ½ pozitifliğini gösteren görüntüler.....	64
Şekil 3.18 Hastalardaki yaş dağılımı.....	65
Şekil 3.19 ERK 1/2 pAb Pozitif Olan Hastalarda Yaş dağılımı.....	65

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Olguların yaş ve cinsiyet dağılımı.....	45
Tablo 2.2 Olgulardaki nevüs histolojisi ve lokalizasyonları	46
Tablo 2.3 DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri.....	49
Tablo 3.1 BRAF Mutasyon Varlığı ve Olguların Yaş ve Cinsiyet Dağılımı.....	54
Tablo 3.2 BRAF Mutasyon Varlığı ve Olgulardaki Nevüs Histolojisi ve Lokalizasyonları.....	55
Tablo 3.3 Olgulardan alınan nevüs lokalizasyonları ve stoplazmik ERK 1/2 pozitifliği.....	62

1. GİRİŞ

Hücre canlının en küçük birimidir ve bu birim birçok kompleks (çoklu) etkileşimin meydana geldiği yerdir. Bu çoklu etkileşimler içerisinde şüphesiz ki en kritik konumda bulunan moleküler etkileşim, hücre dışından hücrenin içerisine alınan sinyaller sonucu meydana gelen reaksiyonlardır. Bu reaksiyonları meydana getiren sinyaller, hücrenin kendi içindeki düzenini ve dış ortamdaki konumunu belirleyici özellikte olabilir. Eğer bu sinyallerin iletiminde herhangi bir sorun oluşursa hücrenin çalışma düzeni bozulabilir; örneğin, hücre ya sürekli olarak çoğalır (proliferasyon) ya da programlanmış hücre ölümü (apoptozis) yoluna girebilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar kanser olgularının artan insidansını ortaya koymaktadır. Kanser, genetik faktörlerin önemli rol oynadığı bir hastalıktır. Kanseri çoklu (multistep) bir yaklaşımla değerlendirdiğimizde, oluşumunda çevresel faktörlerin, özellikle radyasyon ve UV ışığın (fiziksel etki) etkisi yatsınamaz. UV maruziyeti özellikle deri kanserinin en önemli etkeni olarak gösterilmektedir (El Shabrawi vd 1999). UV radyasyon maruziyetinin melanomanın başlangıcı ve progresyonu ile bağlantılı olan bir faktör olabileceği düşünülmektedir (Koh vd 1990).

Deride görülen lezyonlar konjenital (doğumsal) lezyonlar ve edinsel (sonradan kazanılmış) lezyonlar şeklinde olabilmektedir. Bu lezyonlar içerisinde nevüsler önemli bir oranda bulunmaktadır; hatta nevüsün, derinin tüm kongenital lezyonlarını kapsadığını söyleyebiliriz. Derideki lezyonların bir çoğu çeşitli gen mutasyonu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Özellikle BRAF gen mutasyonu nevüsler ve melanomlar da artmış bir insidansa sahiptir.

1.1 Nevüsün Tanımı ve Nevüs Tipleri

Nevüs, hiperplazi sonucu yanyana gelen melanositlerin dendritik uzantılarını ve pigmenti komşu hücrelere iletme özelliğini kaybetmesiyle oluşur ve nevomelanosit ya da nevüs hücresi adını alan bu hücreler, başlangıçta bazal membranın üzerinde “jonksiyonel” odak adını verdiğimiz kuş yuvasına benzeten gruplar meydana getirirler. Zamanla bu gruplar yüzeysel dermaya inerek “kom-pound” nevüsleri ve son aşamada tümüyle dermaya inerek “dermal” nevüsleri oluştururlar (Kandiloğlu ve Gököz 1999).

Nevüs hücrelerinin dermoepidermal bileşkeden daha derindeki dermis içine doğru göç etmesi, “matürasyon” denilen bir olayla meydana gelir. Bu sayede daha az olgun, yüzeyle lokalize nevüs hücreleri daha büyük, melanin içeren ve yuvalanmalar tarzında bulunan hücreler iken, daha olgun, derinde lokalize nevüs hücreleri daha küçük, hiç veya çok az pigment içeren ve kordonlar tarzında dizilme eğilimi gösteren hücreler şeklini alırlar.

Nevüs hücreleri çekirdekleri üniform yuvarlak şekilli, nukleolusu belirgin olmayan, hiç veya çok seyrek mitoz gösteren hücrelerdir.

Epidermiste melanositler 4-10 bazal hücre arasında bir adet olacak şekilde dizilmiştir ve epidermal melanin ünitesini oluştururlar. Melanosit, embriyolojik yaşamda başlangıcını nöral çıkıntı (neural crest) dan alarak, aynı yaşam içinde epidermise göçerler ve çoklukla bazal kat hücreleri arasına yerleşirler. Normal bir melanosit, Hematoksilen Eozin boyamaları ile ufak ve koyu bazofilik çekirdekli yapısından dolayı çevredeki bazal hücrelerden kolayca ayrılırlar (Tüzün vd 1994). Melanositler UV ışınlarına karşı perde görevi yapan melanin sentez ederler ve bunu komşu keratinositlere verirler (Kandiloğlu ve Gököz 1999).

Güneş gören bölgelerde melanosit yoğunluğu, görmeyen bölgelere göre iki kat daha fazladır. Hormonal faktörler ve nevüs sıklığı da melanosit sayısını etkilemektedir. Ayrıca melanosit sayısı her 10 yılda %6-8 oranında eksilmekte, yaşla birlikte melanin pigmentinin koruyucu etkisi azalmaktadır (Kandiloğlu ve Gököz 1999, Koh vd).

Melanositin deri üzerindeki koruyucu etkisi düşünülduğünde, malign melanom melanositlerden ya da değişime uğramış melanositler olan nevüs hücrelerinden kaynaklanabilir. Melanositik lezyonlardan gelişen yeni klonlar normal hücrelere göre seçici bir çoğalma kapasitesi kazanırlar.

Malign transformasyonun çoğunlukla epidermal melanositlerden geliştiği, nevüs hücrelerinin ise daha az agresif davranan minimal deviasyon melanomlara öncülük ettiği düşünölmektedir (Kandiloğlu ve Gököz 1999).

Malign melanomların %25-50'si edinsel melanositik nevüslerden gelişir. Ancak bu nevüslerden daha fazla risk taşıyan 2 grup, konjenital nevüsler ve displastik nevüslerdir (Kandiloğlu ve Gököz 1999).

Konjenital Melanositik Nevüsler (KMN)

Tüm yeni doğanların %1'inde KMN vardır. KMN'lerde malign melanom gelişebileceği kesinlik kazansa da, malignensi insidansı değişim gösterebilmektedir.

Her 20.000 çocuktan birinde 10 cm.'den daha büyük olur. Klinik görünümü koyu pigmentli bir plak şeklinde olup yüzeyi nodüler komponentlerden dolayı düzgün değildir, ayrıca üzerindeki kılların varlığı dikkati çeker. 1 cm. büyüklükten, derinin büyük bir kısmını kaplayan dev görünüme kadar boyutlarda olurlar. Genelde 20 cm.'den büyük olanlarda malignite eğiliminin daha çok olduğu ileri sürölmektedir. Her yeni doğan çocukta görölen melanositik nevüsün kongenital melanositik nevüs olması gerekmez. Bunlardan ancak %1'inin histolojik olarak kongenital melanositik nevüs olduğu görülürken öbür yandan %3.9'u ise diğer nevüs tiplerinden oluşurlar (Kumar vd 2000). Bebeklik ve çocukluk çağında üzeri düz, hafif kahverengi, sınırları belirsiz lezyonlardan, tam tersine keskin sınırlı, koyu renkli, deriden kalkık, üzerinde yoğun ve kaba kılların bulunduğu tiplere kadar çeşitli klinik formlar gösterirler. Hastanın yaşı ilerledikçe tümör daha belirgin bir durum alır, üzerinde papöler, nodöler ve verrükoz değişiklikler göstermeye başlar. Puberteden sonra lezyonlarda bir gerileme görölebilir.

Displastik Nevüs

Clark ve arkadaşları displastik nevüsü matürasyon ve regresyon eğilimi taşımayan kalıcı lentijinöz hiperplazi olarak tanımlamışlardır. Tipik nevüs ile malign melanom (MM) arasında bir tümör gelişim aşaması olarak da adlandırılabilirler (Clark vd 1986).

Ailesel veya sporadik olarak görülür. Ailesel şekillerde otozomal dominant geçiş söz konusudur ve bu şeklinin malign melanom öncüsü olduğu kabul edilmektedir. Sporadik şeklinde ise malign melanoma transformasyon riski düşüktür. Genel populasyonun ortalama %2-8, %5-9`unda bulunur. En sık sırt, kalça, saçlı deri, göğüs gibi güneş görmeyen yerleri seçer. Tekil veya çoklu sayıda olabilir. Klinik özellikleri çapı 5 mm veya daha büyük, kenarları belirsiz veya düzensiz, renk alacası gösteren (kahve tonları, siyah, kırmızı), asimetrik şekilli ve eritemli bir zeminle bir derece inflamasyon göstermesi şeklinde sıralanabilir.

Klinik olarak displastik nevüsler, edinsel nevüslerin çoğunluğundan daha büyüktür ve vücut yüzeyinde yüzlerce sayıda bulunabilir. Sıradan nevüslerden farklı olarak displastik nevüsler, güneşe maruz kalan yerlerin yanısıra güneş görmeyen bölgelerde de görülürler. Bazı displastik nevüslerin, malign melanom gelişiminde öncü lezyon oldukları konusunda kanıtlar vardır. Yüz bölgesinde rastlanmaz. Üzerleri dikkatli bakıldığında kaldırım taşı görünümünü verir.

İki tip nevüs tipinden başka çeşitli nevüs tipleri de bulunmaktadır. Bunlar Spitz nevüs, Mavi (Blue) nevüs şeklinde sıralanabilir.

Spitz Nevüs

Genellikle benign olan bu nevüs çok çeşitli klinik görünümde olabilir. En sıklıkla soliter, pembe kırmızı, sert, yuvarlak bir nodül şeklinde görülür ve lezyon simetrisi önemlidir. Bazen de pek çok sayıda ya gruplaşmış (agmine) ya da yaygın (dissemine) papuller şeklinde görülebilir. Nadir görülen yoğun pigmente, siyah renkli, reed nevüs ismiyle de tanımlanan variantı ise, özellikle puberte sonrasında görüldüğünde MM ile karışabilir.

En çok alt ekstremitelerde veya yüzde rastlanır. Lezyonların çoğu 1 cm`den küçüktür. Kubbe biçiminde olup en karakteristik vasıflarından biri, gerek melaninin fazla olmaması ve gerekse birçoklarında dermisteki damar genişlemelerinden dolayı pembe görünümlüdür. Ancak hafif kahverengi veya siyah olabilirler. Çocuklukla tek olan tümör bazen bir arada birkaç tane hatta yaygın bir görünüm kazanabilir.

Spitz nevüs sıklıkla kompond nevüs görünümündedir. Ancak bazen intradermal bazen jonksiyonel nevüs yapısında da olabilirler. Tümör hücrelerinin pleomorfik yapıları ve çok defasında inflamatuvar hücrelerin varlığı yüzünden malign melanomaya benzerler. Bu yüzden birçok tümör, 1978 yılına kadar hep bu tanıyı almıştır. Bugün bile bazen, her iki tümörü birbirinden ayırmak olanaksızdır. Nevüs hücreleri dermiste oldukça keskin sınırlı hücre yuvalanmaları yaparlar. Jonksiyonel tip gösteren Spitz nevüslerinde epidermal-dermal bileşimin hemen altında ve bu hücre gruplarının üstünde yapay boşluklar bulunur ve bu görünüm yalnız Spitz nevüste görüldüğü için, hem tanı açısından hem de malign melanomadan ayırmak için önemli bir bulgudur. Jonksiyonel aktivite yaygındır, ancak nevüs hücrelerinin epidermise geçişi hem çok azdır ve hem de tek tük birkaç hücre veya hücre grubunu kapsar (Kumar vd 2000).

Mavi (Blue) Nevüs

Dermal melanositlerin nadir rastlanan pigmente bir lezyonudur. Daha sık görülen ve benign olan Jadasson-Tieche tipi ve malign potansiyel taşıyan sellüler tipi olmak üzere 2 tipik formu mevcuttur. Mavi-gri ya da koyu mavi-siyah renkte, hafif kabarık, nadiren noduler, 1 cm`den küçük nevüslerdir. Sellüler tip ise daha büyük olabilir. Başlangıç doğum sonrası veya daha geç yaşadadır. En sıklıkla ekstremiteler özellikle el, ayak sırtı, bazen de yüzde yerleşirler. Sellüler blue nevüsler MM öncülü olabilirler. MM`a transforme olunca malign mavi nevüs (MBN) adını alırlar.

Mavi nevüslerde melanositler daha çok sayıdadırlar. Çekirdekleri iğ şeklinde, oldukça uzun ve dalgalı bir görünüme sahiptirler. Dermiste kollagen lifler arasında dallanmış dendritleri ile oldukça yaygın olup bir yandan yukarılarda epidermise kadar çıkarlar, ancak kombine nevüs haricinde epidermise geçmezler, öbür yandan dermis derinliklerine kadar iner ve deri altı yağ dokusunu da etkileyebilirler. İğ şeklindeki hücrelerin içi, bazen melanin aklatma işlemine başvururacak kadar yoğun olabilirler.

Oldukça iyi gelişmiş ve uzamış bu hücrelerin uzun eksenlerinin deri yüzeyine paralel seyretmesi tipik bir karakter olur. Melanositler çevresinde daha yuvarlak ve dopa negatif melanofajlar vardır. Sellüler tip mavi nevüsler de ise yukarıdaki genel tipte görülenlere ek olarak ayrı gene iğ biçiminde, çekirdekleri daha oval, sitoplazmaları daha geniş ikinci bir tip hücre vardır ve bunlar bir araya gelerek büyük topluluklar yaparlar (Kumar vd 2000).

Nevüs malign melanoma transforme olabilmektedir ve melanomların büyük çoğunluğu deri kaynaklı olmakla birlikte, köken aldığı diğer doku ve organlar arasında oral ve anogenital mukoza, özafagus, meninksler ve göz sayılabilir.

Deride malign melanom oluşumunda güneş ışınlarının önemli rolü vardır. Bununla birlikte güneş ışınlarının tek predispozan faktör olmadığı; öncü bir nevüsün (örn; bir displastik nevüs) bulunması, herediter faktörler, hatta bazı karsinojen maddelere maruz kalmanın da lezyon gelişimi ve ilerlemesinde rolü olabileceğinin bilinmesi gerekir (Kumar vd 2000).

Yine melanomda spontan somatik mutasyonların neden olduğu çevresel ve endokrin faktörlerden gelen çeşitli silsilelerin olabilirliği de Abdel-Malek tarafından bildirilmiştir (Abdel-Malek 1998). Davies ve arkadaşları da nevüs oluşumunda; hormonal faktörlerin (özellikle gebelik sırasında) bu gelişimi ilerlettiğini bildirmektedir. Davies ve arkadaşları aynı zamanda, nevüslerdeki mutasyonlara dikkat çekildiğinde mevcut bilgilerin sınırlı olduğunu ve son günlerde BRAF genindeki mutasyonların tanımlandığını ama bu tanımlamaların biyolojik önemi açısından tartışmaya açık olduğunu belirtmişlerdir (Davies ve ark.,2002)

Benign Melanositik Nevüsler

Sellüler nevüs olarak da adlandırılan bu tip nevüsler, genel olarak herkeste görülen ve halk tarafından “ben” diye isimlendirilen iyi huylu melanosit tümörleridir.

Melanositik nevüsler düz veya deriden hafif kabarık lezyonlardır. Bazı kabarık lezyonların üzerleri düz iken diğerlerinin kubbe biçimini aldığı görülür. İleri derecede koyu olanlar malign melanoma ile karışabilir, bunun tam aksine bazıları ise tamamen

renksiz olabilirler. Kubbe biçimini gösterenlerin üzerinde çevredekilere oranla son derece iyi gelişmiş kıllar da görülebilir. Doğum esnasında çok az istisnalar hariç hemen hiçbir nevüs görülmez iken, buluğ çağında veya erken erişkinlik sırasında sayıları giderek artar, ancak bir süre sonra bu gelişmelerin durduğu görülür. Hayatın geç evrelerinde çıkan olursa bunu hemen bir maling melanoma olarak düşünmemek gerekir ama göz altında tutularak, gerekirse patolojik muayeneye başvurulabilir. (Tüzün vd 1994).

Benign melanositik nevüsler; jonksiyonel, kompond, intradermal (dermal) ve balon hücreli nevüsler şeklinde sınıflandırılabilir.

Jonksiyonel Nevüsler

Bunlar üzerleri düz, kılsız, hafif kahverenginden koyu siyah kahverengiye kadar değişim gösteren lekeler veya deriden hafif kalkık papüller halinde görülür. Büyüklükleri 1 mm-1 cm arasında değişir. Keskin sınırlı, yuvarlak veya elipsoid karakterde ve üzerindeki renk dağılımı muntazamdır. Bazen üstünde daha koyu kahverengi noktalar gösterse bile, bunlar da düzenli bir görünüme sahiptir. Çocukluk yaşlarında daha çok görülseler de daha sonra yeni jonksiyonel nevüslerde gözükabilir. Yaşlılıkta çıkanlarda ise her olasılığa karşın bu tanıyı histopatolojik muayene ile desteklenmelidir.

Histopatolojik muayenede nevüs hücreleri epidermin hemen alt sınırı içinde veya derminin çok üst katlarında hücre yuvalanmaları şeklinde kendini gösterir. Bunlardan çok azı iç hücreli olmakla beraber, hemen tamamına yakını küboidal görünümlüdür. Bu hücreler gümüşleme metotları ile dendritik bir yapı gösterirler. İçlerinde yeterli pigment varsa bazen direkt hematoksilen eozin (H.E.) boyaları bile yeterli olur (Tüzün vd 1994).

Kompond Nevüsler

Kompond nevüsler deriden kalkık, düzgün bir kahverengi renk gösteren, bazen üzerleri düz ve bazen verrüköz olan, üzerleri kıllı lezyonlardır. Klinik olarak görülen tümör, içindeki nevüs hücrelerinin çokluğu yüzündendir.

Histopatolojik olarak, jonksiyonel nevüsde görülen jonksiyonel aktiviteye ek olarak, dermis içinde de çok sayıda nevüs hücrelerinin dermisin alt sınırlarına kadar indiği görülür. Bir melanositik nevüste görülen üç tip hücre compound nevüslerde kendini daha demonstratif olarak belli eder. Bunlardan birincisi yukarı dermiste bulunur ve küpoidal hücrelerdir. Bunlara A tipi veya epitelyumoid nevüs hücreleri denir. İkinci grup hücreler yukarıdakilerden daha ufak, daha dersitoplazmalı hücreler olup, daha az melanin içerir ve B tipi hücreler veya lenfoid tip nevüs hücreleri adını alırlar ve dermisin orta bölümlerini tutarlar. Bunlar da A tipi hücreleri gibi yuvalanmalar yaparlar. Bu yuvalanmalar aslında olgunlaşma belirtisi ve işaretidir. Çünkü maling durumlarda derinlere inildikçe hücrelerde çap bakımından küçülme olmaz. Erken compound nevüslerde sadece A hücreleri vardır, ancak gösterdikleri pleomorfizm yüzünden iğ hücrelere rastlanır ve eğer arada bol miktarda melanofajlar ile yuvarlak hücre infiltratı da görülürse bu defa bir maling melanoma veya displastik nevüs ile karışma olasılığı doğar (Tüzün vd 1994).

Intradermal Nevüsler (Dermal Nevüsler)

Bunlar keskin sınırlı, muntazam pigment dağılımlı, kubbe biçimi lezyonlardır. Avuç içi ve ayak tabanı hariç bütün deri bölgelerinde oluşurlar. Bazıları ise tamamen renksiz görülür.

Histopatolojik olarak çoklukla jonksiyonel aktivite yoktur veya olsa da azdır. Gene de seri kesitler yapılırsa hemen her tümörde az da olsa bu aktiviteyi bulmak olasıdır. Üst katlarda hem hücre yuvaları vardır hem de rozet şeklindeki hücreler ile dev hücrelere rastlanır. Tespit esnasında hücre yuvalarının çevresindeki iğ şeklindeki hücreler ile orta bölümlerdeki daha çok yuvarlak veya küpoidal hücreler arasında oluşan boşluklar sanki tümör damarlar içine geçmiş veya metastaz yapıyor görünümü verirler. Hücreler daha çok C tipindedir. Bazen aralarında A tipi hücreleri de görmek mümkündür. Yukarı dermiste nevüs hücreleri görülmediği zamanlarda iğ şeklindeki nevüs hücreleri ve çevresinde gevşek bağ dokusu olduğu zaman bunlara neural nevüs dendiği de olur (Tüzün vd 1994).

Balon Hücresli Nevüs

Oldukça nadir görülür ve klinik belirti olarak diğer melanositik nevüslerden farklı değildir. Ancak soliter bir görünüme sahip olup, özel bir yerleşme yeri göstermezler ve çok defa ilk otuz yaş içinde oluşurlar. Aslında her nevüste ortalama %2 civarında balon hücresi bulunur. Onun için gerçekte bir melanositik nevüse balon hücreli nevüs olarak tanımlayabilmek için hücrelerinin çoğunluğunun balon hücresi karakterini göstermesi gereklidir. Balon hücreleri, nevüs hücrelerinden daha büyüktür, çekirdekleri yuvarlak ve hücrenin ortasındadır. Sitoplazmaları ya boşluk gösterir veya ince granüller vardır. Dermal nevüslerde olduğu gibi dev hücreleri vardır (Tüzün vd 1994).

1.2 Nevüs Sınıflaması

Nevüsler

Halk dilinde “ben” diye anılan nevüsler, embriyoner kökenli, konjenital veya doğumdan sonra ortaya çıkabilen, derinin bir veya bir çok elemanlarını ilgilendiren sınırlı displazilerdir. Klasik olarak nevüslerin konjenital olduğu söylenirse de, bu karakterlerini desteklemek olanağı pek yoktur. Çünkü çok geç olarak erişkin yaşlarda ortaya çıkabilen nevüslerde bulunmaktadır. Ayrıca nevüsleri sabit displaziler gibi görme olanağı da yoktur. Çünkü çok seyrek bile olsa bazı anjiomlar ve nevüsler gelişmeye, yayılmaya elverişlidirler. Hatta bunlardan bazılarının seyirleri sırasında dejenerasyonda görülebilmektedir. Diğer taraftan araya giren travmalar, güneş ışınları, gebelik, enfeksiyöz hastalıklar gibi bazı faktörler nevüslerin ortaya çıkmalarında ve gelişmelerinde rol oynayabilmektedir. Bazı hastalarda nevüsler çok sayıda ve çok yaygın bir şekilde görülürler. Bu gibi çok büyük bir evolüter potansiyeli bulunan olgularda nevik bir zeminden söz edilebilir.

Pigmanter nevüsler ya da diğer adıyla melanik nevüsler melaninin lokal birikimiyle oluşurlar. Melanik hücreli nevüslerde, nevik hücreler çok sayıda olarak dermanın içine girmişlerdir. Nevik hücrelerin ve melaninin yerine göre histopatolojik olarak üç şekil gözlenir. İntraepidermik, jonksiyonel ve dermik nevüsler. Pigmanter nevüslerin malignite potansiyellerini nevik hücrelerin ve pigmentin yerine göre değerlendirmek mümkündür (Tüzün vd 1994).

Bazı pigmenter nevüsler yuvarlak, oval veya band şeklinde uzun, siyah ve esmer renkte plakalar oluştururlar. Bunların yüzeyleri düz veya yer yer papillomatöz ve verrüköz görünümündedir, genellikle de kıllı nevüslerdir. Düz olan şekillerinde nevik hücreler görülmediği halde, diğerlerinde pigmentle yüklü Unna'nın nevik hücreleri bulunur. Böylece dejenere olmaya elverişlidirler.

Nevüsler;

- 1- Gerçek anlamda nevüsler
- 2- Anjiom ve lenfanjiomlar
- 3- Kompleks nevik hastalıklar olmak üzere üç grup içinde toplanabilir.

Nevüsler;

I-Gerçek anlamda nevüsler

- 1) Pigmenter nevüsler
 - a) Lentigo ve melanik hücreli nevüsler
 - b) Hepatik lekeler
 - c) Melanoz sirkonskrit prekanseröz
 - d) Mavi nevüsler
- 2) Prepuberter sellüler nevüs
- 3) Tuberöz ve sellüler naevi`ler, verrü mol
- 4) Verrüköz naevi
- 5) Epidermis eklerin nevüsleri
 - a) Naevi pilo
 - b) Nevüs komedoniyen
 - c) Nevüs sebase
 - d) Siringokistadenom papillifer
 - e) Hidradenom papillifer
- 6) Dermanın nevüleri
 - a) Nevüs molluskum
 - b) Nevüs elastikus
- 7) Nevüs tabiatında bölgesel pakidermiler
 - a) Kutis vertisis girata
 - b) Pakiperiostozlu plikatüre
- 8) Aplazik nevüsler
 - a) Nevi akromik plan
 - b) Naevi anemi?
 - c) Naevi alopesik
 - d) Naevi atrofik
- 9) Distrofik fistüller ve kistler, branşiyomlar
- 10) Kongenital deri aplazileri

II-Angiomlar ve lenfangiomlar

A) Angiomlar

- 1) Angiom planlar
 - a) Nevüs flammöz
 - b) Enenin angiomu

- c) Nevüs telengiektatikus lateralis
- 2) Tuberö ve derialtı angiomu
- 3) Subakut evolüsyonlu angiomlar
 - a) Süt çocuğunun ülsero-mutilan angiomları
 - b) Trombopeni ile seyreden angiom
 - c) Geç ortaya çıkan angiomlar
- 4) Nevüs areneus; Telenjiyektazy herediterya hemoraji (Rendu-Osler'in angiomatozu)
- 5) Angiokeratomlar
 - a) Angiokeratom de mibelli
 - b) Skrotum angiokeratomu
 - c) Angiokeratoz sirkonskrit nevivorm (Fabry), Angiom serpijinö (Hutchinson)
- 6) Visseral angiomlar
 - a) Sinir dokusunun angiomları
 - Ansefalo- tregeminal angiomatoz (Sturge-Weber- Krabbe hastalığı)
 - Retino-serebellar angiomatoz (von Hippel-Lindau has)
 - b) Sindirim sistemi angiomları
 - Blue rubber bleb naevus
- 7) Diğer distrofilerle asosiye angiomlar
 - a) Derin vasküler anomalilerle birlikte olan angiomlar
 - b) Osteo-distrofik angiodislazi (Klippel-Trenaunay veya Parkes-Weber sendromu)

B) Lenfangiomlar

III- Kompleks nevik hastalıklar

1) Recklinghausen nörofibratozu

Pringle hastalığı, epiloya (Bourneville'in tuberöz sklerozu).

1.3. Derinin Yapısı ve Gelişmesi

Biyolojik bir oluşumun herhangi bir birimi, kendisini çevreden ayıran yüzeyle sınırlanır. Deri, bu şekilde bir fonksiyon yaparak organizma için koruyucu bir örtü olup, aynı zamanda çevreye sinyal gönderip, çevreden sinyal alır. Derinin üç tabakası bulunmaktadır: 1. tabaka olan epidermis geçirgen olmayan çok katlı bir tabakadır. 2. tabaka kaba, sağlam ancak porları bulunan dermistir. Yumuşak, lipitten zengin, derin tabaka olan 3. tabaka ise subkutis adını alır. Bu tabakalardan başka temel düzeydeki fonksiyonlara yardımcı olmak amacıyla deri ekleri gelişmiştir. Genel olarak deri her ne kadar bilateral bir simetri gösterirse de, bölgeden bölgeye değişen bir heterojeniteye de rastlanır ve bunlar histolojik, sitolojik veya biyokimyasal düzeylerde tanımlanabilir. Örneğin saçlı deri, avuç içeri ve karın derisinin epidermal, dermal ve subkutan histolojileri farklılıklar göstermektedir (Tüzün vd 1994).

Derinin Embriyolojisi

Derinin tüm yapıları ya ektodermden veya mezodermden kaynaklanır. Epidermis, folikül-sebase-apokrin üniteler, erkin ünite ve tırnaklar ektoderm türevleridir. Melanositler, sinirler ve özelleşmiş duysal reseptörler nöroektoderm kökenlidirler. Langerhans hücreleri, makrofajlar, mast hücreleri, fibrositler, kan ve lenf damarları, kaslar ve yağ hücreleri gibi diğer deri elemanları ise mezodermden tüerler.

Diğer organlarda olduğu gibi derinin gelişmesi de iki dönem gösterir. Bunlardan birincisi embriyonik dönem olup 1. ve 2. aylardaki organogenez dönemidir. İkincisi ise 3. ay ile doğum arasında geçen ve fetal dönem adını alan büyüme ve farklılaşma periyodudur.

Genel olarak epidermis ve türevlerinin büyüme ve olgunlaşması dermisten önce olur ve yönleri de baştan kuyruğa, dorsalden ventrale doğrudur. Yaşamın ilk iki ayı içinde embriyonun basit bir derisi bulunur (Tüzün vd 1994).

Epidermis

Temel görevlerinden biri kornifikasyon olan epidermis, çok katlı skuamöz bir epitel olup, bir yandan şekil ve kalınlığını sürdürürken, nispeten hızlı büyür, bir yandan da dökülme ile kendi yüzeyini temizler ve dirençli bir yüzey örtüsü ve geçirgenliğe engel olarak hizmet eder. Epidermis hücrelerinin %95'i keratinositlerdir.

Epidermis en ince deri yapısıdır. Kalınlığı göz kapaklarında 0.04 mm.'den, avuç içlerinde 1.6 mm.'ye kadar varmakla birlikte, ortalama kalınlığı 0.1 mm.'dir. Genel olarak, epidermis hücrelerinin bazal tabakadan doğduğuna inanılırsa da, büyüyen hücrelerin %30'unun subrabazal olduğu ve bunların mitotik olarak aktif olduğu görülür.

Epidermis dört tabaka oluşturur: bazal tabaka, stratum spinosum, stratum granulozum ve stratum korneum. Avuç içi ve ayak tabanlarında stratum granulozum ve stratum korneumun arasında beşinci bir tabaka olarak stratum lusidum yer alır.

Histolojik olarak epidermis en az dört hücre tipinden oluşur. Bunları, sayıları en çoktan en aza doğru keratinositler, melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri şeklinde sıralayabiliriz (Tüzün vd 1994).

Keratinositler epidermisteki hücrelerin %80-95'ini oluşturan ektodermal kaynaklı hücrelerdir. Tüm keratinositlerin ortak özellikleri sitoplazmalarında keratin ara filamentleri içermeleri ve desmozomlar veya desmozomal bileşkelerle komşu hücrelere bağlanmalarıdır. Keratin filamentleri, en basit anlamda hücre içinde iskelet rolü oynarlar. (Tüzün vd 1994).

Melanositler, melanozom denilen melanom yüklü organeli yapan ve salgılayan dendritik hücrelerdir. Nöral yarıktan türemiş olan bu hücreler, epidermisin bazal tabakası boyunca, mukozalarda, kıl foliküllerinde, dermiste, leptomeninkste, iç kulakta bulunurlar. Hematoksilen ve eozin boyası ile berrak hücreler halinde görülürler. Melanositlerin bazal hücrelere oranı oldukça değişkendir. Örneğin bu oran yanakta 1:4 iken; kollarda 1:10'dur. Melanositler dendritik hücrelerdir. Melanin granülleri dendritik yapılarla çevredeki keratinositlere transfer edilir ve burada aktif olarak fagosite edilirler. Melanin pigmentinin deri ve saçların renklenmesinin yanı sıra, UV

ışınlarının zarar verici etkilerine karşı çok önemli bir koruma özelliği de vardır. Elektron mikroskobu ile incelendiğinde melanositin donuk bir sitoplazmasının bulunduğu gözlenir. Ne tonofilamente ne de desmozoma rastlanırken, elektron yoğun melanozomlar bulunmaktadır (Tüzün vd 1994).

Langerhans Hücreleri melanositlere benzerler. Dendritik yapıdaki bu hücreler epidermisin subabazal tabakasında, dermiste, timusta, tonsillalarda, lenf nodullerinde, oral ve genital mukozada bulunurlar. Epidermal hücre topluluğunun %1-4'ünü Langerhans hücreleri oluşturmaktadır. Bu hücreler dermiste de bulunurlar. Elektron mikroskobu ile, keratinositlerden desmozom ve tonofilamentlerinin bulunmaması ile ayrılırlar. Bu hücreler premelanozom veya melanozomda içermezler. Langerhans hücrelerinin tipik olarak lobüllü nükleusları ve karakteristik Langerhans granüllerini (çomak veya raket şeklinde inklüzyonlar) içeren berrak sitoplazmaları bulunur. Bu inklüzyonlar Langerhans hücreleri için oldukça karakteristiktir (Tüzün vd 1994).

Merkel hücresi, memelilerin epidermisinde bulunan, keratinositik olmayan belirgin bir hücredir. Özellikle kılsız deride ve ayrıca kıl folikülleriyle ilişkili olmak üzere, epidermisin bazal tabakasında bulunurlar. Merkel hücreleri dermiste, periferik sinir uçlarının Schwann hücreleri ile birlikte de bulunurken, epidermiste intraepidermal sinir uçlarının bulunduğu yerdedirler. Merkel hücreleri çevredeki keratinositlere desmozomlarla bağlanmıştır. Buna karşılık bazal sitoplazmik membranında ise hemidesmozom bulunmamaktadır. Berrak sitoplazması, lobüllü nüvesi, spesifik granülleri ve bağlantıları ile tipik bir hücredir (Tüzün vd 1994).

Mast hücreleri, diğer konnektif doku hücrelerinden bazik anilin boyaları ile metakromatik olarak boyanma özelliği göstermesi ile ayrılan hücrelerdir. Mast hücreleri deri, bronş, burun, ve barsak mukozasında bulunurlar. Konnektif doku ve mukozal mast hücresi olmak üzere iki ana tip mast hücresi vardır. Mast hücreleri kan damarları, sinirler ve eklerine yakın olarak bulunurlar (Tüzün vd 1994).

Epidermal Ekler

Epidermal ekler yağ bezleri apokrin bezler, erkin ter bezleri kıllar ve tırnaklardan oluşur. Yağ bezleri, gelişen kıl folikülünün dış kök yaprağının lateral bir çıkıntı yapmasıyla ortaya çıkarlar. Vücutta yaygın olarak bulunmalarına rağmen, avuç içi ve ayak tabanlarında yoktur, buna karşılık yüz ve saçlı deride ve sırtın orta kısmında yoğun olarak bulunurlar. Her ne kadar kesin değilse de, insandaki fonksiyonunun suyu geçirmeme, epidermal su kaybının kontrolü ve mantar ile bakterilerin üremelerine karşı koruma olduğu kabul edilmektedir.

Apokrin bezler, başlıca anogenital ve aksiler bölgelerde bulunur. Epidermisten türerler. Fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Sebace bezlere benzer şekilde çocukluk yaşlarında nispeten küçüktürler, pubertede büyür ve fonksiyonel olarak aktif hale gelirler.

Ekrin terbezleri intrauterin yaşamın yaklaşık olarak dördüncü ayında, epidermisin aşağı doğru özelleşmesiyle ortaya çıkar. Mukozalar dışında bütün deride bulunur. Maksimum sayıda buldukları yerler koltuk altları, avuç içleri, ayak tabanları ve alındır.

Kıllar, avuç içi ve ayak tabanı, parmakların ventral yüzü, prepusyumun iç yüzü, glans penis, kadın dış genitalinin iç kısımları dışında bütün deriyi kaplarlar. Kıl gövdesi kütikula, korteks ve medulladan oluşur. Sarışınlarda kısmi pigmentli melanozom sayısında bir azalma söz konusu iken; kızıl saçlardaki melanozomlar kimyasal ve yapısal olarak siyah saçlılardan farklıdır. Kılın insanlarda, hayvanlardaki gibi bir ısı tutma görevi bulunmamaktadır. Buna karşılık insanlarda dokunma reseptörü olarak kısmi bir görevi vardır; ayrıca sekonder seksüel karakteristiğe de yardımcı olur.

Kıllar gibi tırnaklar da, epidermisin dermis içine sokulmasıyla oluşmuştur. Burada ortaya çıkan keratin kaba ve yoğun bir şekilde yapışık olup, böylece tırnak plağı meydana gelir. Matriks, tırnak plağı ve serbest kenar, başlıca bölümlerini oluşturur.

Dermis

Dermis, epiderminin destekleyici tabakası olup, başlıca fibröz kısım ile birlikte temel maddeden oluşmuştur. Dermisin içinde epidermal ekler, sinirler, damarlar ve çeşitli hücreler bulunur. Dermisteki temel hücreler fibroblastlardır. Dermis iki bölümden oluşur: Papiller dermis ve retiküler dermis. Dermisin kalınlığı anatomik bölgeye bağlı olmak üzere, epiderminin 15-40 katı olabilecek şekilde değişkenlik gösterir (Tüzün vd 1994).

1.4. UV Işık ve Deri Üzerine Etkileri

Işık, elektromagnetik spektrumun bir bölümünü oluşturmaktadır. Dermatolojide ışık duyarlılığı ve buna bağlı tablolardan bahsedildiğinde, güneş ışığı (ultraviyole radyasyonu=UVR) yani iyonize olmayan radyasyon ve görünen ışığın yol açtığı biyolojik değişiklikler kastedilir.

UV'nin fotosentez, görmeye yardımcı olmak, D vitamini sentezi, ısı sağlamak, patojenleri öldürmek gibi yararlı etkilerinin yanı sıra; güneş yanığı ve deri kanserlerine yol açması, ışık duyarlılığı tabloları, foto-immunolojik değişiklikler, mutasyonu oluşumunu uyarması, deri yaşlanması ve katarakt gibi zararlı etkileri vardır.

Yeryüzüne ulaşan ışığın %99'unu görünen ışık, kırmızı ötesi ışınlar ve elektromanyetik spektrumun uzun dalga boylu ışınları, %1'lik bölümünü ise ultraviyole oluşturur. UVC stratosferden yansırken, 290-400 nm. arasındaki dalga boyları derideki reaksiyonlara yol açar. Xenon lambaları ve cıva buharlı lambalar gibi yapay kaynaklar da UVC yayarlar. UVC, filtrelerle engellenebilir. Havanın strelizasyonu gibi teknik amaçlarla kullanılmaktadırlar.UVC, 6 saate belirginleşen bir eriteme ve çok hafif bronzlaşmaya yol açar. Bilinen güneş yanığının en güçlü biyolojik uyarıcısı UVB'dir. UVB etkisiyle oluşan eritem ve bronzlaşma UVA'dakinden çok daha şiddetlidir. UVB yapay kaynaklar (ör. cıva buharlı lambalar) tanı ve tedavi amacıyla kullanılırlar. UVB'ye bağlı güneş yanığı, güneşe çıkıldıktan 12-24 saat sonra başlayıp, 48-72 saatte en üst düzeye ulaşır. UVA ile eritem oluşabilmesi için UVB'nin 100 katı enerjiye ihtiyaç vardır. Buna karşılık pencere camından geçebilen UVA derinin daha derin tabakalarına ulaşabilme özelliğine sahiptir. UVA'nın dermise penetre olarak yapısal değişikliklere yol açıcı etkisinden fototerapide yararlanılır.

UVA ile oluşan eritemi izleyen kararmaya erken pigmentasyon (ani pigmentasyon) denir. 5-20 j/cm dozunda UVA ile oluşabilir. Erken pigmentasyonun patogenezi, ışık uyarısıyla melaninin renksiz öncü bileşiklerinin oksiklenmesi ve melanositin merkezinde bulunan melanozomların dendritlere ve keratinositlere transferidir. Erken pigmentasyon doğaya uyumu sağlayan bir korunma mekanizmasıdır ve sinirsel yolla da uyarılabilmektedir. Erken pigmentasyon birkaç saatte solabildiği gibi, geç pigmentasyon (kalıcı pigmentasyon = bronzlaşma) gelişebilir. Yüksek dozda UVA;

eritem oluşturmaksızın doğrudan kalıcı pigmentasyona yol açar. Geç pigmentasyon, minimal eritem dozunun 2 katı şiddetindeki orta dalga boyu UV'ye (297 nm) maruz kaldıktan 24-72 saat sonra ortaya çıkan pigmentasyondur. Günler veya haftalarca kalabilir. Pigmentasyonun derecesi genetik ve hormonal faktörlere de bağlı olduğundan bu tabloya fakültatif pigmentasyon da denilmektedir.

Fotobiyoloji

Fotobiyolojik reaksiyon, hücre içinde fotokimyasal değişikliklerin oluşmasıyla başlar. İyonize olmayan radyasyon deriye ulaştığında bir bölümü yansırken bir bölümü emilir. Deride, elektromanyetik dalgayı emerek ilk fotobiyolojik olayları başlatan moleküllere kromofor adı verilir. Derideki kromoforlar, keratin proteinleri, kan, hemoglobin, porfirinler, karoten, nükleik asitler, melanin, lipoproteinler, peptid bağları, tripsin, tritofan ve histidindir.

Işık ürünleri, iyon akımlarının çoğalması, DNA replikasyonu, enzimlerin uyarılması veya etkisiz hale gelmesi gibi çeşitli biyokimyasal olaylardan sorumludur. Bu olaylar sonucunda hücreler çoğalır, mutasyona uğrar ve hücre yüzeyi işaretleri değişir. Kromoforun uğradığı yapısal değişikliğin bir başka sonucu DNA'daki hasardır.

Işığın deride iki tür etkisi vardır: 1- Normal deride ultraviyolenin uyardığı erken ve geç değişiklikler, 2- Güneş ışığı ve yapay ışığın uyurabildiği anormal deri reaksiyonları (Tüzün vd 1994).

1.5. Mutasyon

Mutasyon, DNA'nın nükleotid dizilerinde veya nükleotidin düzenlenmesinde meydana gelen değişiklikler olarak tanımlanır. Hücrede mutasyonlar, kromozom sayılarını etkileyen mutasyonlar (genom mutasyonları), tek tek kromozomların yapılarını değiştiren mutasyonlar (kromozom mutasyonları), ve her bir genin değişimine neden olan mutasyonlar (gen mutasyonları) olmak üzere 3 sınıfa ayrılırlar. Genom mutasyonları, toplam kromozom sayısının değişimidir (örn. anöploidi). Mayoz ve mitoz bölünme esnasında kromozomların ayrılma hatalarından dolayı ortaya çıkar. Kromozom mutasyonları, kromozomların sadece bir kısmını içeren duplikasyonlar, delesyonlar, inversiyonlar ve translokasyonlardır. Kromozom bölünme mutasyonları, ya kendiliğinden ya da mayoz sırasında translokasyona uğrayan kromozomların anormal ayrımı nedeniyle olabilmektedir. Gen mutasyonları, DNA nükleotid dizilerindeki değişikliklerdir. Tek bir nükleotid (nokta mutasyonu, baz çifti yer değişimleri, delesyon, insersiyon) veya binlerce baz çiftini etkileyecek değişikliklerdir.

Delesyon ve duplikasyon gibi toplam kromozom sayısında oluşan değişiklik genom mutasyonlarında, gen dozajı etkisinden dolayı yüzlerce/binlerce genin ekspresyonunu değiştirebilir. Benzer olarak, bir veya birden fazla kromozomu etkileyen mutasyonlarda da delesyon ve duplikasyon yüzlerce genin ekspresyonunu da etkileyebilmektedir.

Hatta tek bir nokta mutasyonu, ilgili gene ve genin ekspresyonu üzerindeki etkisine bağlı olarak hücre fonksiyonu üzerinde çok geniş etkilere sahip olabilir. Bir genin kodlanan dizisinde tek nükleotid değişimini oluşturan bir gen mutasyonu, genin ekspresyonunun tamamen kaybına veya özellikleri değişmiş (örn. fonksiyonu artmış) bir proteinin oluşmasına neden olabilir.

Mutasyon Tipleri

1) Gen Mutasyonları

Gen mutasyonlarına dahil olan baz çifti yer değişimleri, insersiyonlar ve delesyonlardır. Bu mutasyonlar, 2 temel mekanizmadan biriyle oluşur. Hatalar ya DNA replikasyonu sırasında ya da hasarlı olan DNA'nın tamirinin yapılamamasından

kaynaklanabilir. Bazı mutasyonlar kendiliğinden (spontan) olurken diğeri mutajen adı verilen çeşitli fiziksel veya kimyasal ajanlarla oluşmaktadır. Mutajenler mutasyon oluşum sıklığını büyük derecede artırmaktadır. UV ışık muamelesi mutajen olarak BRAF mutasyonunun ortaya çıkmasında bir etken olarak düşünülse de yapılan çalışmalarla bu etken tam olarak kanıtlanmamıştır.

DNA replikasyon hatalarında hataların büyük bir çoğunluğu bir seri DNA tamir enzimleriyle doğru hale getirilir. Bu enzimler ilk önce yeni sentezlenmiş çift iplikteki yanlış bazı taşıyan ipliği tanır ve daha sonra onun doğru komplementer baz ile yerini değiştirir. Bu işlem “proofreading” olarak adlandırılır. DNA replikasyonu belirgin bir biçimde doğru bir işlem olmalıdır.

Replikasyon hatalarına ek olarak; gen, UV veya iyonize ışınlarla maruz kalırsa ve çevrede bulunan kimyasal mutajenler ile reaksiyona girerse, depürinasyon, demetilasyon gibi kendiliğinden kimyasal işlemler meydana gelir ve bu, mutasyonlara neden olur.

Proofreading mekanizması ile genellikle düzeltilen replikasyon bağımlı DNA değişikliklerinin tersine, fiziksel veya kimyasal ajanlarla oluşan nükleotid değişiklikleri, genellikle kalıcı mutasyonlardır.

Nükleotid Değişimleri

Bir DNA dizisindeki tek bir nükleotid değişimi (veya nokta mutasyonu) üçlü bazdaki kodu değiştirebilir ve gen ürününde bir aminoasitin diğeriyle yer değiştirmesine neden olur. Bunun gibi mutasyonlara yanlış anlamlı mutasyonlar “missense mutasyonlar” adı verilir; çünkü bunlar genin kodlayan dizisinin anlamını değiştirip farklı bir aminoasit oluşturur. Bir çok hastalıkta saptanmış olan mutasyonların büyük çoğunluğu yanlış anlamlı mutasyonlardır. İnsanlarda genetik hastalığa neden olan ve rapor edilen tüm mutasyonların yarısı, hemen hemen yanlış anlamlı mutasyonlardır.

Bir genin kodlayan dizinin içinde veya dışında oluşan diğeri baz değişimleri de, gen ürünleri üzerinde geniş etkiye sahip olabilir veya transkripsiyonu direkt olarak engelleyebilir.

Bir pürinin diğeri bir pürinle (A-G) veya bir pirimidinin diğeri bir pirimidinle (T-C) olan nükleotid değişiklerine “transisyon” adı verilir. Ters olarak, bir pürinin yerini bir pirimidin almasına (ya da tam tersi) ise “transversiyon” adı verilir. Eğer nükleotid değişimleri rastgele olsaydı transversiyonların transisyonlara oranla iki katı fazlalığında olması gerekirdi. Çünkü her bir baz için, tek bir transisyona karşılık iki transversiyon oluşur. Bu nedenle bir mutant aleller kümesi arasında transisyonun beklenenden daha yüksek sıklıkla bulunması, kendiliğinden veya rastgele oluşan baz değişimlerinden daha çok tercih edilen bir mutasyon mekanizmasıdır.

Genetik hastalığa sebep olan tek baz çifti değişikliklerinde transisyonların fazla olduğunun anlaşılması, insan genomunda DNA modifikasyonlarının meydana geldiğini göstermektedir. Sitozin bazlarının metilasyonu, (5-metilsitozin) özellikle bir guaninin 5' ucuna çok yakın yerleştikleri zaman gerçekleşmektedir.

Bir çok kalıtsal hastalıkta saptanan bütün tek nükleotid değişikliklerinin %30'undan fazlası, bu tipe aittir ve bunlar herhangi bir nükleotid mutasyonlarından 25 kat daha fazla oluşmaktadır. Bu nedenle CG dinükleotidi, insan genomunda mutasyon için gerçek bir “hotspot” temsil etmektedir. (Nussbaum vd 2005)

2) Genom Mutasyonları

Hücre bölünmeleri sırasında bir kromozom çiftinin hatalı ayrılması, genom mutasyonlarına neden olur. Genom mutasyonu, anöploid meydana getirir ve insanlarda en sık görülen mutasyon tipidir. Hatalı ayrılma her, 25-50 mayotik hücre bölünmesinde meydana gelir. Genom mutasyonları, kanser hücrelerinde de çok sık görülür.

3) Kromozom Mutasyonları

Kromozom mutasyonlarının genom mutasyonlarından çok daha az olduğu düşünülmektedir. Her 1700 hücre bölünmesinde yaklaşık olarak 1 oranında görülür. Her ne kadar genom ve kromozom mutasyonlarının sıklığı yüksek olsa da bu mutasyonlar kuşaktan kuşağa nadir olarak süreklilik gösterir çünkü genellikle yaşama ve üreme ile uyumsuzluk göstermektedir. Kromozom mutasyonları sıklıkla kanser hücrelerinde de görülmektedir.

1.6. Kanser Biyolojisi

Kanser çok aşamalı bir hastalık olup, daha çok bir kitle ya da tümör oluşuma yol açan kontrolsüz hücre proliferasyonu ile karakterize edilir. Hücre proliferasyonu ile ortaya çıkan neoplazinin kanser olabilmesi için malign özellik göstermesi dolayısıyla kontrolsüz büyümesi, komşu dokuları istila edebilmesi ve metastaza yapması gerekmektedir. Tümörler metastaz yapmıyorlarsa kanseröz değildir ve bu durumda, benign tümör olarak adlandırılırlar.

Anormal hücre akümüasyonu olan neoplazi, hücre proliferasyonu ile hücre yok oluş arasındaki dengesizlik nedeniyle oluşur. Prolifere olan hücreler, hücre siklusuna girer ve mitozu uğrarlar. Programlanmış hücre ölümü nedeniyle oluşan hücre yok oluş ise, normal bir işlem olan DNA fragmanlarının bir dokudan uzaklaştırılmasıdır ve bu, apoptozis olarak adlandırılan hücre ölüm şeklinde gerçekleşir.

Kanserin Genetik Yapısı

Hücre bölünmesi ve hücre ölümünü kontrol eden çok çeşitli genler bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan yoğun araştırmalar, hücre proliferasyonu ve hücre ölümünü kontrol eden genlerin mutasyonlarının kanser oluşumunda önemli rol sahibi olduğunu göstermiştir. Bir çok kanserde, mutasyonlar tek bir somatik hücrede oluşur ve daha sonra klonal gelişme ile bölünerek kanser gelişimine yol açarlar. Daha nadir tipi ise, herediter kanser sendromunda izlenmekte, kanserin başlamasına neden olan mutasyonlar germ hücrelerine aktarılmakta ve böylece vücudun tüm hücrelerinde yer almaktadır. Mekanizma ne olursa olsun kanser bir kez başladığında, sitogenetik yapısının korunmasından ve DNA'da oluşabilecek hasarı tamirden sorumlu hücre mekanizmaları kodlayan genlerdeki mutasyonlar kümülatif olarak bir artış göstererek kanseri yaygınlaştırır.

Kanser oluşumunda rol alan genler, 2 temel alt gruba ayrılmaktadır: Onkogenler ve Tümör Supresör Genler. Onkogenler, çoğunlukla proto-onkogen olarak adlandırılan normal hücre genlerinin mutant (aktif olan) allelleri olmakla birlikte telomerazları kodlayan veya apoptozisi bloke eden genlerde olabilirler. Onkogenler genellikle fonksiyon kazandıran mutasyon özelliğine sahip olup, proliferasyonu stimüle etme,

tümörün kanlanması artırma ve apoptozu engelleme gibi mekanizmalarla malign transformasyonu gerçekleştirmektedir. Tümör supressör genler ise, hücre büyümesini sınırlayarak tümör gelişimini engelleyen genlerdir. Tümör supressör genler tarafından kodlanan proteinlerin fonksiyon kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine ve/veya defektif apoptozise neden olmaktadır.

Mutasyonlar hücre bölünmesi sırasında devamlı olarak meydana gelmektedir ve onkogenler ile tümör supressör genler diğer genlere nazaran daha fazla mutasyona uğramaya meyilli değillerdir. Kanserdeki mutasyonları diğer mutasyonlardan farklı yapan, bu genlerdeki mutasyonların güçlü bir şekilde hücrel proliferasyon ve uzun hücrel yaşam için pozitif seleksiyona yol açmasıdır. Kanseri hücre fenotipik olarak kontrolsüz ve aşırı proliferasyon özelliğine sahip olup tek bir mutant hücre yaşamı tehdit eden bir hastalık gelişimine yol açmaktadır. Bazen hücre kayıplarının organ veya dokudaki sağlıklı hücreler tarafından maskelenmesi nedeniyle, mutasyonlar hücrenin fonksiyon kaybına ya da ölümüne neden olmalarına rağmen herhangi bir fenotipik etki oluşturmayabilir (Nussbaum vd 2005).

1.7 BRAF Geni

BRAF bir RAF gen ailesi üyesidir ve v-raf mürin sarcoma viral onkogen homolog B1 olarak tanımlanır, kodladığı protein kinaz (stoplazmik serin/treonin kinazı), MAPK sinyal yolunda yani dolayısıyla hücre farklılaşması ve proliferasyonunda görev alır (Davies vd 2002, Pollock vd 2002, Mercer vd 2003). BRAF bir serin/threonin kinaz olarak retrovirüs-ilişkili sekans proteinleriyle aktive olur. (Palmedo vd 2004, Pollock vd 2002).

Mutant BRAF aleller sıklıkla fazlalaşmış kopya sayısında kromozom 7q`da (7. kromozomun kısa kolu) bulunmaktadır (Maldonado vd 2003).

BRAF geninde içinde bulunduğu Raf genleri ilk olarak fare ve tavuklarda tümör ajanlarına neden olan retrovirüslerin onkogenleri olarak tanımlanmıştır. İlk Raf gen, v-Raf ile beraber tanımlanmıştır. v-Raf`ın protoonkogen olarak homologue raf-1`dir (Rapp vd 1983). İnsan kanserlerinde Raf genlerinin aktive olmuş varyasyonu tanımlanmaya çalışılmış ama korelasyon oluşmamıştır (Rapp vd 1983, Sutrave vd 1984, Jansen vd 1984). Raf genleri, yüksek ve düşük ökaryotları yani, C. Elegans, Drosophila melanogaster, Xenopus leavis, tavuk, fare, rat ve insanları içeren canlılarda bulunmaktadır (Mercer ve Pritchard 2003).

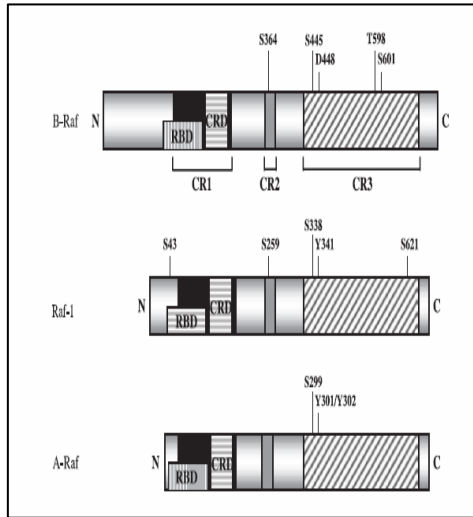
Fare ve tavuk embriyosu raf genlerinin, onkogen olarak tanımlanmasından sonra insan kanserleri, dolayısıyla insan genlerindeki bağlantılı aktive mutasyonların varlığı tanımlanmaya çalışılmıştır (Storm 1990). İnsan kanserlerinde BRAF gibi serin/treonin kinazlar genellikle somatik nokta mutasyonu ile aktive olur (Davies vd 2002).

Raf proteinleri, aktive olmuş Ras proteinlerinin efektörü olan kanserlerle indirekt olarak ilişkilidir (Mercer vd Pritchard 2003). BRAF ve RAS mutasyonlarından her ikisi de nadiren aynı kanserde bulunabilir ve BRAF mutasyonlu kanser tipleri RAS mutasyonlularla benzerlik gösterebilir (Mercer ve Pritchard 2003).

Memeli Raf-1 geninin, ilk olarak v-raf`ın hücre sel homologue olarak tanımlandıktan sonra, raf-1`e yüksek homoloji gösteren diğer iki genin A-Raf ve B-raf olduğu belirlenmiştir (şekil 1.1). Bu 3 Raf gen de serin/treonin protein kinazları kodlar ve 3 raf

genin de sekans benzerliği yüksek derecededir. Bu gen de N-terminal b3lge reg3lator domaini kodlar ve Ras'ı içeren başlıca kofakt3re bağlanır ve C-terminal b3lgede katalitik kinaz domaini içerir.  gende de N-terminal reg3lator b3lgenin delesyonu proteinin yapısal olarak aktive olmasına neden olur ve h3cre tiplerinin geniş varyeteleri için onkogenik bir hal alır (Storm 1990, H3ser vd 2001, Pritchard vd 1995, Barnier vd 1995).

3 Raf izotipi içerisinde, model olarak Raf-1'in 3zerinde bir çok biyokimyasal çalışmaya odaklanılmıştır. Bu alışmalarda Raf-1'in aktivasyon mekanizması anlaşılmaya çalışılmıştır. İnaktif Raf-1 normalde sitozoliktir ve Ras'a bağlanma 3zelliği g3sterir. GTP, in-vitro ve in-vivo olarak aktif Ras varlığında plazma membranını geçebilir (Marais ve Marshall 1996). Bununla birlikte, GTP Ras'a bağlanır ama bu bağlanış tamamıyla Raf-1'in aktivasyonu için yeterli değildir. Ek olarak plazma membranında bir takım sinyaller ve fosforilasyon da aktivasyon için gereklidir (Traverse 1993, Marais vd 1995,1997; Mason 1999;). Ras-GTP ve Raf'ın N-terminal b3lgesi çeşitli gruplar içermektedir. (Vojtek ve Hollenberg 1993, Koide vd 1993, Van Aelst vd 1993, Warne vd 1993, Zhang vd 1993).



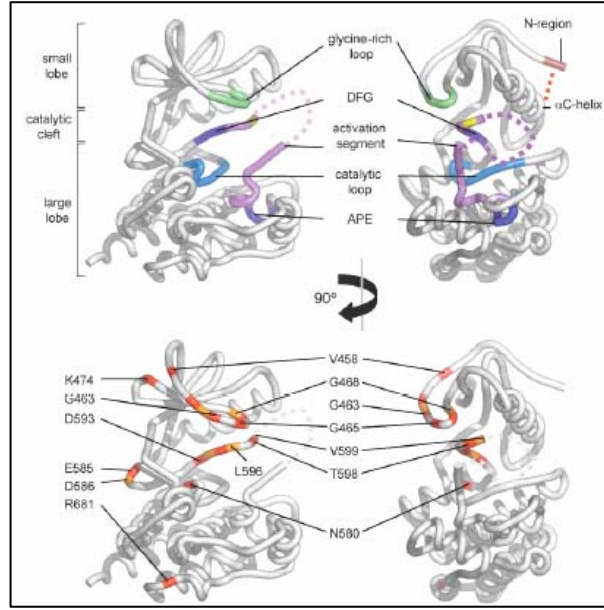
şekil 1.1 Raf Ailesi yelerinin Domain Yapısı: Aktivasyonlarının d3zenlenmesinde fosforillenme b3lgeleri 3nem taşır (Mercer ve Pritchard 2003).

Son alışmalar Raf-1`in serin 338 pozisyonunun fosforilasyonunun Raf-1`in aktivasyonu için gerekli olduğu, kompleks fosforilasyonda Raf-1`in bu bölgesiyle gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Bununla birlikte bu fosforilasyonun fizyolojik önemi henüz bilinmemektedir. (Diaz vd 1997, Barnard vd 1998, Mason vd 1999). Raf protein kinazın temel fonksiyonu yüksek korunumlu Ras/Raf/MEK/ERK intraselüler sinyal yolunda aktivasyonu meydana getirmektedir. Bu yol, reseptör tirozin kinazları içine alan (RTKs) hücre yüzey reseptörlerinin farklı sınıflarıyla aktive olur ve bunlar G protein bağımlı 7 transmembran reseptörlerdir ve hepsi biyolojik etkilerini Ras`la birlikte yaparlar. (Ras`la beraber biyolojik etkilerini gösterirler) (Dickson ve Hafen 1994, Marshall 1994). ERK aktivasyonu Ras aktivasyonu ile ilişkilidir ve Raf proteinler aktive Ras proteinleriyle, ERK`ler arasında bir vital bağlantı oluştururlar (Hüser vd 2001).

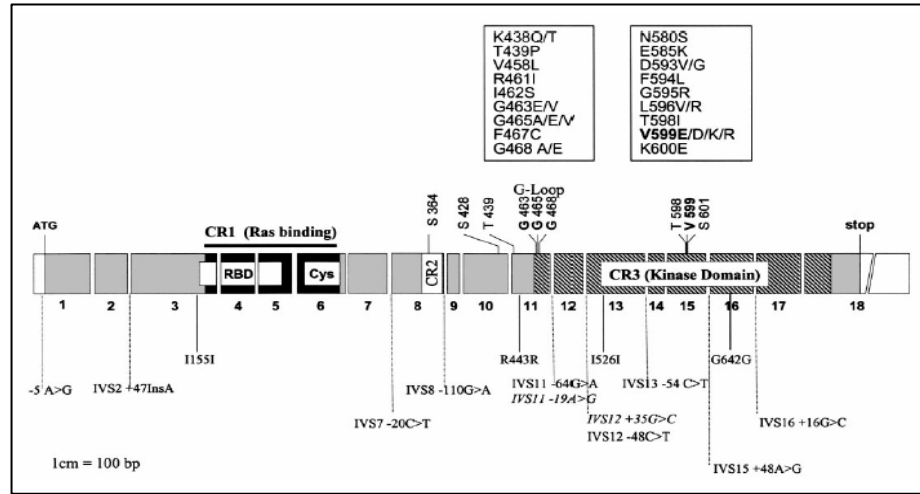
Raf-1 protein kinaz, memelilerdeki Ras-Raf-MEK-ERK sinyal yolunun integral komponentleri olarak tanımlanır. Raf-1`in aktivasyonunu Ras gerçekleştirir. GTP ilk olarak Raf-1`e bağlanır ve ondan sonra plazma membranında Raf`ın tirozin fosforilasyon bölgesini içeren 340/341. rezidüye Ras bağlanır. (Hüser vd 2001)

Raf-1`in MEK kinaz aktivitesinin artışında bir etkisi olduğu, kanıtlanmamış olmakla birlikte, apoptozisin önlenmesinde anahtar bir rol oynadığını söyleyebiliriz (Hüser vd 2001).

Son günlerde insan kanserlerinde BRAF geninin somatik olarak mutant olduğu rapor edilmiştir (malign melanoma, kolorektal karsinoma v.b.). BRAF genindeki kansere neden olan somatik mutasyonlar, BRAF kinaz domaininin 2 bölgesinde görülmektedir (şekil 1.2 ve şekil 1.3). Bunlar, G loop (ATP`nin bağlanması aracılık eder) ve aktivasyon segmenti (substrat bağlanan bölgeyi korur) olarak tanımlanır (Davies vd 2002).



Şekil 1.2 B-Raf Kinaz Domain Yapısı (Garnett ve Marais 2004).



Şekil 1.3 İnsan Kanselerinde Somatik Mutasyonları Tanımlanmış Olan BRAF Gen Yapısı (Laud vd 2003).

BRAF'ın ekzon 15'indeki kinaz aktivasyon domaininde bir 1796 T-A transversiyonu V599E (valinin glutamik asite değişimi) yanlış anlamlı mutasyonu (missens mutasyon) tek bir spesifik aminoasit değişimiyle sonuçlanır ve bu da melanoma örneklerindeki mutasyonlarda belirlenmiştir (Davies vd 2002, Brose vd 2002, Palmedo vd 2004). Bu özel yanlış anlamlı mutasyonun orijinal adı V599E (GTG-

GAG) mutasyonudur (Papp vd 2005) ve bu mutasyon son olarak Kumar ve arkadaşları tarafından yeniden adlandırılarak V600E mutasyonu adını almıştır (Kumar vd 2003).

Nevüs olgularında BRAF aktive gen mutasyonu, melanosit ile ilişkili çeşitli faktörlerin işin içine girmesi sonucu ortaya çıkar. MAPK sinyal yolu BRAF genin içinde bulunduğu bir yoldur. MAPK sinyal yolunun aktivasyonu, melanosit proliferasyonunda önemli rol oynar, bu durumda hücre çekirdeğinden ekstraselüler mitojenik sinyallerin geçişi ve bu sinyallerin yapısal aktivasyonu ile kontrolsüz hücre bölünmesini promote etmesi şeklinde açıklanabilir. İkinci faktörde UVB radyasyonuna yanıt olarak, alfa-melanosit-stimüle edici hormon, insan melanositlerindeki melanocortin reseptör I (MC1R)'e bağlanarak, siklik adenozin monofosfatın (cAMP) ileri düzenlenmesine neden olurlar. Yüksek cAMP konsantrasyonu melanin senteziyle sonuçlanır ve melanosit proliferasyonunu meydana getirir. Melanositlerdeki cAMP-bağımlı sinyal kaskadı da aynı zamanda BRAF'ı aktive eder (Papp vd 2005).

BRAF tek nokta mutasyonu, son günlerde konjenital, kompozit, intradermal ve displastik nevi gibi benign melanositik lezyonlarda da rapor edilmiştir. T1796A mutasyonunun bu lezyonlarda hücre proliferasyonunu promote edici özellik gösterdiği düşünülmektedir (Bastian vd 2000, Pollock vd 2003, Yazdi vd 2003). BRAF mutasyonlarının çoğunluğu ekzon 15'de görülmesine karşın az bir kısmı ekzon 11'de de görülmektedir (Omholt vd 2003).

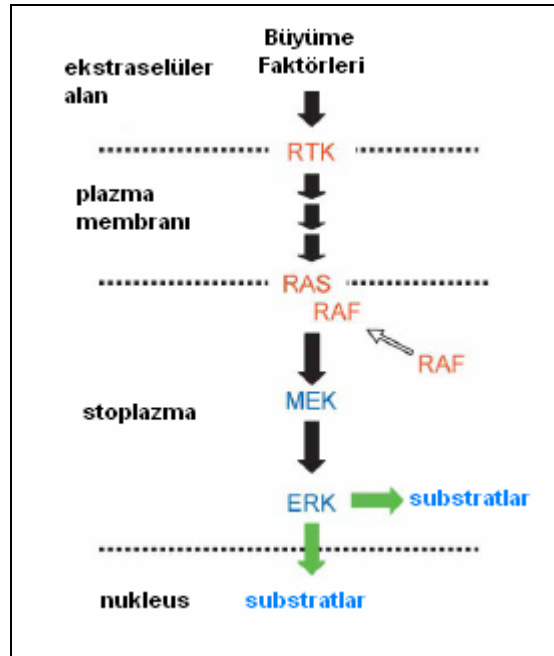
Tanımlanan BRAF mutasyonlarının %90'ı için mutasyon T1796A'nın etkisi altında olan bir bir yeniden düzenlenme (V599E) rapor edilmiştir (Davies vd 2002, Pollock vd 2002, Dong vd 2003, Uribe vd 2003, Cohen vd 2003).

Val599Glu mutasyonlu B-Raf, yabani tip B-Raf'dan daha yüksek kinaz aktivitesine sahiptir ve Val599Glu ve Val599Lys'deki değişimlerin her ikisi de indüklenmiş transformasyonda B-Raf'ın potansiyelini artırıcı etki yapar (Davies vd 2002, Dong vd 2003).

BRAF'ın kodladığı serin/treonin kinaz, RAS'dan ERK'ya kadar uzanan (RAS-RAF-ERK-MAP kinaz sinyal transdüksiyon yolu) ara sinyallerde görev alır (Palmedo vd 2004). Melanomda, Ras-Raf-mitogen-aktive protein kinaz/ekstraselüler sinyal-

düzenleyici (ERK) kinaz (MEK)-ERK sinyal yolunun (şekil 1.4) aktivasyonu RAS ve RAF mutasyonlarının her ikisinin de oluşumunda etken olarak görülmektedir. (Omholt vd 2003).

Mitojen-aktive protein kinaz (Ras-mitojen-aktive protein/ekstraselüler sinyal-düzenleyici kinaz kinaz-mitojen-aktive protein kinaz) yolu membrandan-nukleusa kadar giden bir sinyal sistemidir ve bu sistem hücre proliferasyonun kontrolü, farklılaşma ve memeli hücrelerindeki apoptozisi kontrol eder. Bu yolun aktivasyonu, melanoma proliferasyonu ve melanosit ile ilişkilidir (Jiveskog vd 1998, Peyssonau ve Eychene 2001, Maldonado vd 2003).



Şekil 1.4 RAS-ERK Sinyal Yolu (Garnett ve Marais 2004).

MAPK sinyal yolunda, RAS'dan MEK'e doğru ilerleyen BRAF'ın kodladığı serin/treonin kinaz sinyalleri görev alır, yine G-protein bağımlı reseptörler ve reseptör tirozin kinazların her ikisi de MAPK sinyal yolunda aktiftirler ve hücre büyümesi, hücrenin hayatta kalması ve invazyon ile melanosit proliferasyonunda önemli bir rol oynarlar (Avruch vd 2001, Peyssonau ve Eychene 2001, Palmedo vd 2004). 3 RAF geninin her biri stoplazmik serin/treonin kinazları kodlarlar ve RAS'ın bağlanmasıyla kontrol edilirler (Peyssonau ve Eychene 2001, Kolch 2000). RAS proteinleri de,

RAS-RAF-MEK-ERK-MAP kinaz yoluna katılarak, büyüme sinyalizasyonunun hücrel yanıtında aracı rol oynarlar (Peyssonnaud ve Eychene 2001).

BRAF kinazın somatik mutasyonları, malignant melanoma ve nevüsde (%65`inden fazla) sıklıkla rapor edilmiştir (Bulliard 2000, Davies vd 2002, Pollock vd 2002, Dong vd 2003, Omholt vd 2003, Shinozaki vd 2004). Yine Davies ve Palmedo tarafından da melanoma örneklerinde mutasyonların %92`sinde BRAF mutasyonu tespit edilmiştir (Davies vd 2002, Palmedo vd 2004). Mercer ve arkadaşlarının son raporlarına göre; kolon kanserleri (%15`inde) ve insan malign melanomların (%70`inde) büyük oranında BRAF genindeki aktive mutasyonların varlığı gösterilmiştir (Mercer vd 2003).

Yapılan diğer çalışmalarda B-raf onkogen (BRAF) mutasyonunun melanomların %92`inde (Davies vd 2002, Brose vd 2002, Brose vd 2003, Dong vd 2003), farklı histopatolojili nevüslerin %82`sinde (Pollock vd 2002), ve primer melanomların %65`inden fazlasında bulunmuştur (Davies vd 2002).

Bu sonuçlar primer tümör progresyonu ve metastaz gelişimi esnasında kazanılmış BRAF mutasyonlarının ihtilafına yol göstermektedir. Çünkü melanomdaki BRAF mutasyon sıklığı nevüs, primer tümörler ve metastazlara kadar uzanan durumlarda da rapor edilmiştir. Dolayısıyla burada önemli olan tümör progresyonu ve bunun hastalık üzerine etkisinin ilişkisinde BRAF mutasyonlarını araştırmaktır (Davies vd 2002, Pollock vd 2002). Keza son günlerdeki çalışmalar da, melanomada B-Raf nokta mutasyonlarının aktivitesinin sıklığına dikkat çekmektedir (Alsina vd 2003).

1.8. BRAF Geni Mutasyonu, Melanom ve Nevüs İlişkisi

Kanser oluşumunda tek gen mutasyonu yeterli olmamakla birlikte birkaç yoldaki farklı genetik değişimlerin birkaç yol üzerindeki etkisine sıklıkla rastlanmaktadır (Hanahan vd 2000). Raf genlerinin aktivasyonunda görev alan Ras genleri kendi başlarına tumorigenezi indüklemeyebilirler ama onkogenlerin birlikte çalışması veya transforme olmuş hücrelerdeki p53 ve/veya p16'nın inaktivasyonunu sağlarlar (Weinberg vd 1989). Bu durumda melanositik proliferasyonda MAPK sinyal yolunun farklı komponentlerle aktivasyonunu göstermektedir (Palmedo vd 2004).

İnsan kanserlerinde sıklıkla saptanan RAS mutasyonu, RAS/RAF/ekstraselüler sinyal-düzenleyici kinaz-mitogen-aktive protein kinaz /ekstraselüler sinyal-düzenleyici kinaz/mitogen-aktive protein kinaz yolunu aktive eder (Chan vd 2002). RAS gen ailesinin, çeşitli genleri melanositik lezyonlarda mutasyonlu olarak bulunmuştur (Herlyn ve Salyamoorthy 1996). Ras/Raf/MEK/ERK yolu, büyüme sinyallerin kontrolünde, hücrenin hayatta kalmasında ve invazyonda görev yapan major bir yoldur. Melanomlarda RAS ve BRAF'ın her ikisinde de aktive mutasyonların varlığı bilinmektedir, bu da bu tümörlerin onkogenik işleyişinde alt efektör ERK'in major bir rol oynadığını akla getirmektedir (Smalley 2003). RAS mutasyonları, primer melanomların yaklaşık %25'inde ve konjenital melanositik nevüslülerin %50'sinde tespit edilmiştir (Papp vd 1999).

Son çalışmalar, nevüslerde ve aynı şekilde melanomalarda RAS-RAF-MEK-ERK-MAP-kinaz yolundaki genlerde oluşan aktive edici mutasyonlarının nevüs ve melanom oluşumuyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Maldonado vd 2004). MAP kinaz yolunun aktivasyonunun melanosit transformasyonu ile ortaya çıktığı ilişkilendirilse de, melanoma gelişimi için zorunlu değildir (Maldonado vd 2004).

BRAF genindeki mutasyonlar, benign ve malignant melanositik lezyonlarda bulunur ve bunların %90'ından fazlasında da ekzon 15'deki V599E mutasyonu bulunmaktadır. Bu mutasyon, aktif kinaz fonksiyonu içeren durumlarda meydana gelir (Brose vd 2002, Loewe 2004).

BRAF V599E mutasyonu, melanomaların kısa süreli kültürlerinde tanımlanmıştır. Bu mutasyonun somatik olduğu düşünülmektedir (Meyer vd 2003a, Meyer vd 2003b).

Çevresel ve genetik faktörler, melanomanın etiyojisini etkiler ve çok kuvvetli UV radyasyonun deriyle aşırı muamelesi melanoma oluşumunda çok önemli bir faktördür (Elwood vd 1997, Cohen vd 2004). UV radyasyon maruziyetini takiben melanositte moleküler değişimle invaziv melanomada hasarın en son noktaya ulaşması henüz tam olarak anlaşılammıştır, ama bunun anlaşılmasında UV tarafından oluşturulan mutasyonlar olan C-T ve CC-TT dimerleri anahtar öneme sahiptir (Lang vd 2003). CC-TT veya C-T değişimi, pirimidin dimer formasyonu ile ilişkilidir, genellikle bu değişimlerde de UV ışık etkisi bulunmaktadır. Örneğin non melanoma deri kanserinde TP53 geninde bu durum vardır (Daya-Grosjean vd 1995, Zuo vd 1996, Rizos vd 1999).

Maldonada ve arkadaşları tarafından son günlerde BRAF V599E mutasyonunun oluşumuyla güneşe maruz kalma arasında bir ilişkinin olamayacağına dair bir bilgi verilse de, UV ışığın mutajen etkisi mutasyon oluşumunda gözden kaçırılmayacak bir durum olarak değerlendirilmelidir (Maldonada vd 2003).

Son zamanlarda fare modellerinden sağlanan epidemiyolojik kanıtlar da, melanoma gelişimi için UV ışık maruziyetinin önemine dikkat çekerek, Güneş maruziyetinin bir risk faktör olduğunu düşündürmektedir (Noonan vd 2001, Davies vd 2002).

Son günlerde, melanomalar, kolorektal kanserler ve ovarian tümörlerinde BRAF mutasyonunun bu sinyal yolunun aktivasyonu için alternatif bir rota olduğu ve bu tümörlerde bulunduğu rapor edilmiştir (Chan vd 2002, Rajagopalan vd 2002, Singer vd 2003, Kimura vd 2003). Konjenital nevüslerde BRAF mutasyonlarının yanında, NRAS mutasyonları, Spitz nevüsde de HRAS mutasyonları bulunmuştur (Carr ve Mackie 1994, Bastian vd 2000).

Pollock ve arkadaşları, son günlerde BRAF aktive edici mutasyonlarının insidansının nevi, konjenital, kazanılmış, karışık ve displastik içeren durumlarda %70`den %88`e doğru değiştiğini rapor etmişlerdir. Bu hipotezle beraber bu mutasyonun melanositik neoplazinin başlangıç basamağında görüldüğünü söylemişlerdir. Bununla birlikte, melanomanın erken evresinde BRAF mutasyonlarının

bulunduğu rapor edilmiştir (Pollock vd 2002). Nevüslerde BRAF aktivasyonu melanositik neoplazilerin başlangıcındaki erken ve kritik basamakta kendini göstermektedir (Laud vd 2003). Mutasyonların tümünde kinaz domaininde ve nevüs ve primer melanomanın %80`ninde ve melanoma hücre düzeninin %60`ında ekzon 15`deki bir hotspot tek değişiklik gösteren V599E`li mutasyonlar belirlenmiştir (Davies vd 2002, Pollock vd 2002) Melanoma ve nevüsdeki BRAF somatik yanlış anlamlı mutasyonlar BRAF geninin kinaz domainli ekzon 11 ve ekzon 15`inde belirlenmiştir (Davies vd 2002, Brose vd 2002, Laud vd 2003).

Bu bilgi, melanositik neoplazilerin başlangıcındaki erken ve kritik aşamada BRAF aktivasyonunu göstermektedir. Buna göre, BRAF`ın melanomadaki hassas genlerden biri olduğu düşünölmektedir (Laud vd 2003).

Melanoma tiplerinde BRAF mutasyonlarının çok sık olduğu ve epidemiyolojik verilerde, aralıklı güneş muamelesinin kronik güneş muamelesinden zıt olarak bu olayda patojenik bir rol oynadığı düşünölmektedir. Bununla birlikte BRAF mutasyonları ve güneş muamelesi arasındaki ilişki karmaşıktır (Holman vd 1986, Elwood 1996, Bulliard 2000). Epidemiyolojik çalışma sonuçları benign kazanılmış nevüs ve displastik nevüsün yüksek sayıda olmasının melanoma insidansının yüksek sayıda olmasını akla getirir (Ackerman ve Mihara 1985, Armstrong 1996). Melanomadaki mutasyonların yüksek sıklıkta olması melanosit biyolojisinin daha ileri safhasıyla alakalı olabilir (Halaban vd 2000).

1.9. Hücre Uyarı Sistemleri, MAPK Sinyal Yolu ve ERK 1/2

Çok hücreli organizmalarda, hücreler arası bilgi ve iletişim, çok sayıda farklı molekülle sağlanır. Sinyal molekülleri (ligand) olarak adlandırılan bu moleküller uyarı oluşturmak isteyen hücre tarafından üretilir. Ligand, reseptör olarak adlandırılan bir proteine bağlanarak istenen etkinin oluşmasını sağlar. Bu sinyal molekülleri, uzak bölgelerdeki hücrelere sinyal taşıdıkları gibi, hemen yakınındaki komşu hücreye de taşıyabilirler. Bu hücre dışı sinyaller hedef hücrenin uzaklığına bağlı olarak 4 farklı uyarı mekanizması gösterir. Bunlar;

- Endokrin uyarı
- Parakrin uyarı
- Sinaptik uyarı
- Otokrin uyarı şeklinde sınıflandırılır.

Bu uyarı sistemlerinden başka bütün prokaryotik ve ökaryotik hayvan hücrelerinde bulunan bir ikincil haberci olan cAMP hücre içinde faaliyet göstererek hücre içi iletişimde etkili hale gelir. cAMP'in bir hücre için haberci olarak faaliyet gösterebilmesi için, hücre içi konsantrasyonunun (normalde $\leq 10^{-7}$ M) artması veya azalması gerekir. cAMP, hücre zarına bağlı bir enzim olan adenil siklaz tarafından ATP'den sentezlenir ve devamlı olarak cAMP fosfodiesteraz tarafından adenozin 5' monofosfata (5'-AMP) hidroliz edilir. Farklı hücreler, hücre içi cAMP seviyelerini değiştiren dış uyarılara farklı cevap verirler.

Hücresel uyarı, hücre yüzey reseptörleri olarak; iyon kanallarına bağlı reseptörler, G proteinine bağlı reseptörler ve enzime bağlı reseptörler ile de gerçekleştirilmektedir.

Enzime Bağlı Hücre Yüzey Reseptörleri İle Uyarı

Enzime bağlı reseptörler, ligand bağlanan kısımları hücre zarının ekstraselüler yüzeyinde olacak şekilde zara yerleşmiş transmembran proteinlerdir. Sitozolik bölgeleri bir G proteini ile ilişki kurma yerine ya bir intrinsik enzim aktivitesine sahiptir ya da kendileri doğrudan bir enzim ile ilişkilidirler. Genel olarak G proteinine bağlı

reseptörler 7 transmembran segmente sahipken, katalitik reseptörler sadece 1 segmente sahiptir.

Enzime bağlı reseptörlerin bilinen 5 sınıfı vardır;

- 1) Guanil siklaz reseptörleri: Sitozolde cGMP oluşumunu katalizlerler.
- 2) Tirozin kinaz reseptörleri: Hücre içi uyarı proteinlerinin küçük bir grubunun üzerindeki özel tirozin rezidüleri fosforlarlar.
- 3) Tirozin kinazla birleşmiş reseptörler: Tirozin kinaz aktivitesine sahip proteinlerle birleşmişlerdir.
- 4) Tirozin fosfotaz reseptörleri: Hücre içi uyarı proteinlerinin üzerindeki tirozin rezidülerden fosfat gruplarını uzaklaştırırlar.
- 5) Serin-treonin kinaz reseptörleri: Bazı hücre içi proteinler üzerindeki serin veya treonin rezidüleri fosforlarlar.

Kinazlar hücre içerisinde değişik faaliyet yolları kullanarak uyarının etkisinin güçlenmesini ve cevabın oluşmasını sağlarlar. Bu faaliyet yolları arasında; Ras faaliyet yolu, MAPK sinyal yolu, cAMP ve CREB aktivasyonu, JAK-STAT faaliyet yolu sayılabilir.

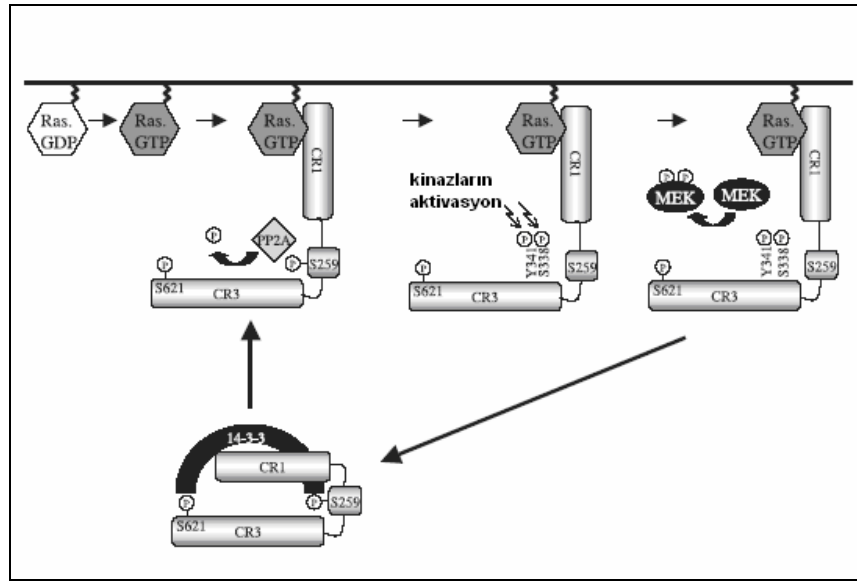
Ras Faaliyet Yolu

Kinazlar içerisinde faaliyet yolu iyi bilinenlerden birisi sitozolik kinazların aktivitesini sağlayan reseptör tirozin kinazlarca başlatılan yoldur. Hücre zarındaki reseptörün otofosforilasyonu ve aktivasyonu, doğrudan veya dolaylı olarak sitozolik bir kinazın (özellikle serin/treonin kinaz) SH2 bölgesi aracılığıyla aktifleşmesini sağlar. Böylece aktifleşen kinaz bir başka kinazı aktifleştirerek olaylar serisinin devamını sağlar.

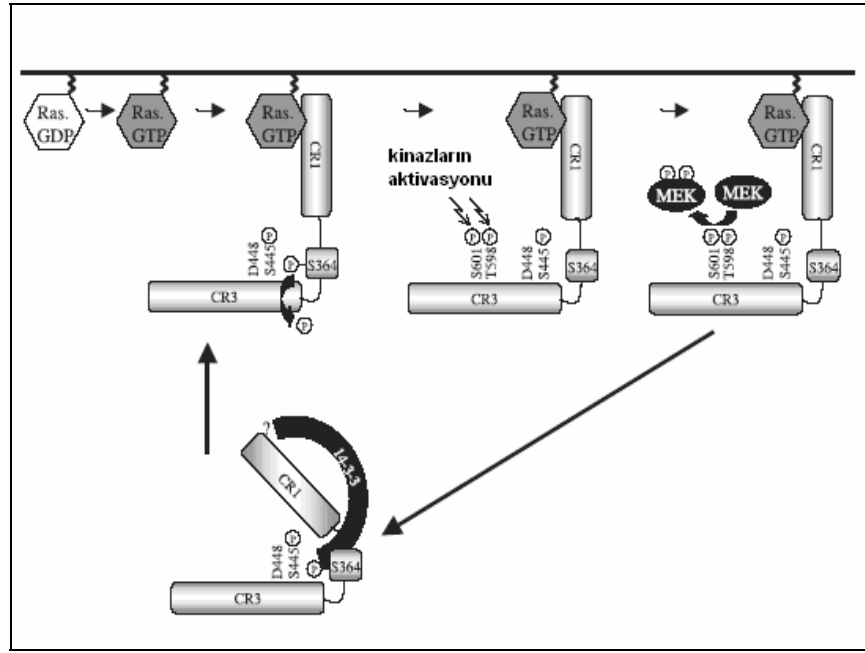
Faaliyet yolundaki bileşenler arasındaki ilişki, bu yolda görev yapan bir bileşenin diğer bir bileşenin faaliyeti üzerine olan etkisi araştırılarak açıklanmıştır. Kinazların bu faaliyet yolu birkaç farklı yapıda incelenmiştir. Örneğin; bu faaliyet yolu D. Melanogaster`de göz gelişimi, C. Elegans`da vulval gelişime etki etmektedir. İncelenen

örneklerde faaliyet yolu değişik şekillerde aktive olmakta ve bu aktivasyonun sonucu da farklı olmaktadır.

Ras faaliyet yolundaki bileşenlerin bazıları memeli canlılarda onkogenlerle ilişkili olup bu yolun aktivasyonundaki sapmalar genellikle tümör gelişimine neden olur. Memeli hücrelerinde bu faaliyet yolu genellikle EGF veya PDGF reseptörü gibi bir tirozin kinaz reseptörünün aktivasyonu ile başlar. Reseptör bir adaptör protein aracılığıyla Ras faaliyet yolunu aktive eder. Ras'ın aktivasyonu, Raf Serin /Treonin kinazın aktivasyonunu, o da MEK (daha önce adlandırıldığı şekliyle MAP kinaz kinaz= mitojen activated protein kinase kinase)'i aktive eder. MEK`de bir MAP kinazı fosforlar ve aktifleştirir (şekil 1.5 ve şekil 1.6).



Şekil 1.5 Raf-1 Aktivasyon Modeli (Mercer ve Pritchard 2003).



Şekil 1.6 B-Raf Aktivasyon Modeli (Mercer ve Pritchard 2003).

JAK-STAT Sinyal Yolu

JAK-STAT faaliyet yolu birkaç sitokin reseptörü tarafından aktive edilmektedir. Bu reseptörler intrinsik kinaz aktivitesine sahip değildir. Bununla beraber sitokinlerin (interlökin 2, eritropoietin gibi) bu reseptörlere bağlanması, reseptörlerin dimerleşmesine neden olur. Dimerleşen reseptör JAK kinaz ile ilişki kurar ve JAK kinazın aktifleşmesini sağlar. JAK kinaz (Janus kinaz), bir nonreseptör tirozin kinaz olup molekülünde 2 kinaz bölgesi bulunur. Aktifleşmiş (dimerleşmiş) sitokin reseptörü ile JAK kinaz arasındaki ilişkinin etkisi, ligand tarafından oluşturulan tirozin kinaz reseptör dimerizasyonu ile aynı sonucu üretir. Aralarındaki fark reseptör ve kinaz aktivitesinin aynı protein yerine farklı proteinler üzerinde olmasıdır. JAK kinazların ana substratı STAT (Signal Transducer and Activator of Transcriptase) olarak adlandırılan tirozin kinazlardır. STAT, proteinleri SH2 bölgesi içeren transkripsiyon faktörlerinin bir familyasıdır. STAT proteinler, uyarılmamış hücrelerde sitozolde yer alır ve inaktif haldedir. Sitokin reseptörünün uyarılması ile JAK kinazlar aktifleşir. JAK kinaz hücre zarında reseptörle birleşmiş durumdayken fosforlanır. Aktifleşmiş (dimerleşmiş)

reseptörle bir çift JAK kinaz birleşir. Reseptörle birleşmiş ve aktif hale gelmiş JAK kinaz çifti, kendileri ile temas kuran STAT proteinlerinin dimerleşmelerine (bir araya gelmelerine) neden olur. Bu dimerleşen STAT proteinler daha sonra bu halde nukleusa geçerek hedef genin transkripsiyonunu başlatır.

MAP Kinaz Sinyal Yolu

Sinyal iletimi uyarılara farklı cevaplar oluşmasını sağlar. Bu farklılık ya farklı faaliyet yollarını aktifleştirerek ya da aynı faaliyet yolunu farklı şiddette aktifleştirerek sağlanır. MAPK sinyal yolunda farklı kinazların işin içine girdiği bir çok yol vardır.

MAP kinazlar, “Mitojen-aktive protein kinazlar” süper ailesinde yer alırlar. Ökaryotik hücrelerin tümünde mevcut olan bu proteinler hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında çok önem taşımaktadır. Bu sinyal iletimi kaskadları, embriyogenezis, yaşama, çoğalma, diferansiasyon ve apoptozis işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır. MAP kinazlar üç ana gruba ayrılır (Bakınız Ek 1.14).

Extrasselüler signal regulated kinase (ERK) ailesi

P38 MAP kinaz ailesi

C-Jun NH2- terminal kinase (JNK) ailesi

Bir tirozin kinaz reseptörünün aktivasyonu kendi kendine birkaç faaliyet yolunu aktifleştirebilir. Farklı faaliyet yollarının etkilerinin üst üste binmesi MAP kinazların aktivasyonunu başlatan farklı uyarı sinyalleri ile gösterilmiştir. Bunlar içerisinde en iyi tanımlanmış olan Ras aktivasyonunu içeren MAP kinaz faaliyet yoludur. Bu faaliyet yolunda Ras`dan sonraki bileşen Raf`dır (bir sitozolik Ser/Thr kinazdır.). Ras ile Raf aynı faaliyet yolu üzerinde yer alır. Çünkü her ikisine de faaliyet yolunda daha sonraki bir aşamada görev yapan bir proteinin (örneğin MAP kinaz) fosforlanması için ihtiyaç duyulur. Ras hücre dışı liganda (uyarı molekülü) cevap olarak Raf`ı aktifleştirir. Raf doğrudan MEK`in üzerindeki 2 serin rezidüyü fosforlayarak MEK`in aktifleşmesini sağlar. MEK, çift etkili bir enzim olup hem treonini hem de tirozini fosforlamaktadır (Dent vd 1992, Crevs vd 1992). MEK`in bu faaliyet yolundaki hedefi de ERK MAP kinazdır (Güneş 2003).

MAP kinazlar birkaç şekilde faaliyet gösterir. Başka kinazları aktifleştirip değişik yolların aktifleşmesini sağladıkları gibi bazı MAP kinazlar doğrudan nukleusa geçerek etkilerini oluştururlar. Klasik yolda ERK1 ve ERK2, MEK`in hedefidir.

MAP kinaz faaliyet yolunda MEK (MAK kinaz kinaz) birleşme noktasıdır. Ras Raf ı aktive eder. Raf da MEK`i aktifleştirir. MEK`i aktifleştiren diğer bir kinaz bir G proteini tarafından aktifleştirilen MEKK (MEK Kinaz)`dır. Bu da MAP kinaz faaliyet yolunun 2 tip hücre yüzey uyarı tipi tarafından aktifleştirildiğini gösterir. Bu hücre yüzey uyarı tipleri; tirozin kinaz reseptörünün uyarılması ve bir G proteinini aktifleştiren bir hücre yüzey reseptörünün uyarılmasıdır (Güneş 2003).

Ras/Raf/MEK/ERK Sinyal Yolu ve Kanser

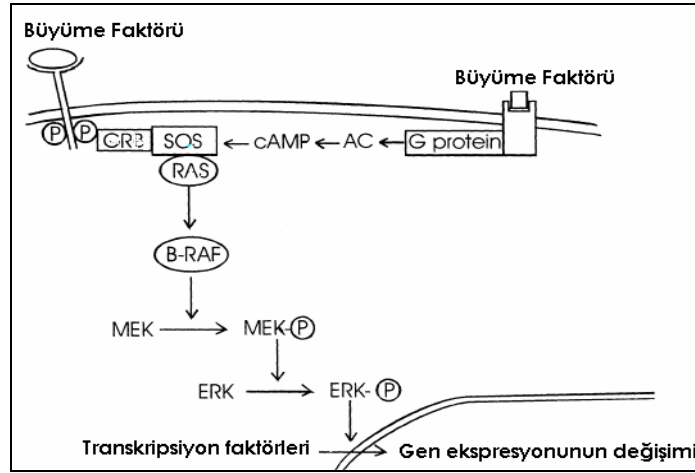
Hormonlar, büyüme faktörleri, diferansiyasyon faktörleri ve tümör promoter maddeler bu sinyal yolunu kullanırlar.

Bu iletim yolu Ras aktivasyonu ile başlar ve sırasıyla Raf (= MAPKKK), MEK (= MAPKK) ve ERK (= MAPK) proteinleri ile kinaz kaskadı ilerler .

Hücrel proliferasyon, farklılaşma ve ölümünde genlerin kompleks bütünlüğüyle organ ve dokuların bütünlüğü sağlanır. Kanserler, mutasyonların ortaya çıkmasında anahtar rol oynayan genlerin bu kompleks bütünlüğünün bozulması ile meydana gelir. (Pollock vd 2002)

Ras ve Raf protoonkogendir. Protoonkogen olan Ras proteinlerinin aktif hale gelmesi için translasyon sonrası modifikasyondan (farnezilasyon) sonra membrana yerleşmesi gerekir.

Aktive olan Ras proteinleri Raf kinazlara yüksek afinite ile bağlanırlar ve Raf kinazların hücre membranına yerleşimini ve aktivasyonunu sağlarlar (Smalley ve Eisen 2000). İnsan tümörlerinin %30`unda Ras/Raf/MEK/ ERK yolunun (şekil 1.7) aşırı aktivasyonu söz konusudur. Bu oran tümörlerdeki Ras mutasyonu sıklığı ile uyumludur. Mutant Ras proteinleri, aktif RAS-GTP formunda kalırlar; bu nedenle, hücrenin kontrolsüz uyarılmasından sorumlu tutulmaktadır (Cobb 1999, Kolch 2000).



Şekil 1.7 RAS/RAF/ERK/MAP Kinaz Sinyal Yolu

Ras/Raf/MAPK sinyal yolu, ekstraselüler mitojenik sinyallere yanıt olarak hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde moleküllerin membran-nükleus sinyal kaskadında kullanılır. Bu yol melanomanın gelişiminde önemli rol oynar (Peyssonaux ve Eychene 2001, Alsina vd 2003). Aktif hale gelmiş MAPK sinyal yolunda, reseptör tirozin kinazlar ve G-protein-coupled reseptörler, melanosit proliferasyonunda rol alırlar (Busca vd 2000, Halaban 2000). Davies ve arkadaşları, son günlerde, melanomların MAPK sinyal yolunun yapısal aktivasyonunda BRAF`daki mutasyonun varlığını rapor etmişlerdir (Davies vd 2002).

Melanomanın onkogenik işleyişini içine alan Ras/Raf/MEK/ERK yolun aktivasyonu vücutta melanoma gelişiminin kanıtı olduğunu akla getirebilir. İn-vitro çalışmalar, melanoma hücre dizinlerinde ve tümör dokularında ERK aktivitesinin yüksek bir oranda meydana geldiğini göstermiştir (Smalley ve Eisen 2000, Kortylewski vd 2001, Smalley ve Eisen 2002, Ge vd 2002, Satyamoorthy vd 2003).

Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz ERK1 ve ERK2 (tirozin/treonin) fosforlayarak tirozin/treonine döndürür (Kyriakis vd 1992). Aktivasyonda, ERK`ler diğer stoplazmik hedefleri fosforlarlar veya çekirdeğe göç ederler (Lenormand vd 1993). Çekirdekte ERK`ler c-Fos, Elk-1 gibi transkripsiyon faktörlerini fosforlayarak aktive ederler (Treisman 1994). MAP kinaz yolunun aberrant aktivasyonu kanser hücrelerinin patolojik işleyişiyle ve gelişimiyle ilişkilidir. Ras, Raf ve MEK`in aktive

olmuş mutasyonu in-vitro ortamda fibroblastların onkogenik olarak transforme olmasına neden olur (Cowley vd 1994, Mansour vd 1994).

Melanomlardaki yüksek yapısal ERK kinaz aktivitesi MAP kinaz yolunun üst bileşenlerinde meydana gelen mutasyonların sonucunda çok fazla görülmektedir. Aktive Ras mutasyonları bütün kanserlerin %25`inde bulunmuştur (Bos 1989), pankreas ve kolon kanseri gibi kanserlerde, bu oran %50-%90 arasında değişmektedir. Ras mutasyonları melanomların %9-%15`inde tanımlamıştır (Carr ve Mackie 1994, van Elsas vd 1995, Tsao vd 2000, Davies vd 2002) . Ras mutasyonlarının bir çoğu N-Ras`ın kodon 61`inde K-Ras ve H-Ras mutasyonlarıyla beraber nispeten aynı sıklıktadır (van Elsas vd 1995, Carr ve Mackie 1994, Padua vd 1984). Bununla birlikte, Ras`a ek olarak Raf-ailesi proteinleri ayrıca insan kanserlerinde aday onkogenlerdir (Storm ve Rapp 1993).

RAS/RAF/MAPK sinyal yolunun yeniden düzenlenmesi melanositik neoplazide erken evreyi akla getirmektedir (Gill vd 2004). ERK`ların regülasyonu bu kanserlerin gelişiminde önemli bir yardımcı faktördür (Mercer ve Pritchard 2003). ERK1 ve ERK2, RAS-RAF-MEK-ERK-MAP kinaz yolunun alt bileşen efektörü olarak görev yaparak (Muneer 2002, Satyamoorthy vd 2003), nukleus ve/veya sitoplazmada ikili fosforile şekliyle (ERK 1/2`nin varlığında 1/2 hedeflerinin göreceli boyanması) melanomdaki ERK 1/2 hedefleri hakkında önemli bir ipucu vermektedir .

1.10 Hücre Döngüsü ve Kontrolü

Hücre döngüsünün kontrolünün G1/S geçiş ve G2/M geçiş noktalarının yakınında yapıldığı bilinmektedir. Her iki noktada döngünün ilerlemesine veya durmasına karar verilmektedir. Bu kararların verilmesinin kontrolü, iki sınıf protein tarafından yapılmaktadır; birincisi, protein kinazlar olarak bilinen enzimlerdir ve bu enzimler hedef proteinleri seçip fosforile ederler. Hücrelerde çok sayıda, farklı protein kinazlar olmasına karşın, bunlardan sadece birkaçının hücre döngüsünün kontrolünde görev yaptığı bilinmektedir. İkinci grup proteinler ise siklinlerdir. Siklinler hücre döngüsünün işlevini kontrol ederler. Siklinler ilk kez, gelişmekte olan omurgasız embriyolarında tanımlanmıştır. Hücre döngüsünün farklı evrelerinde aynı zamanda sentezlenip aynı zamanda yıkılabilen bir model oluşturmaktadır. Kinazların ve siklinlerin birbiriyle etkileşimi sonucu hücrenin hücre döngüsüne girişini düzenleyen bir kontrol molekülü üretilmektedir.

Kromatinin kromozom oluşturmak için yoğunlaşması, çekirdek zarının parçalanması ve hücre iskeletinin yeniden organizasyonu gibi pek çok olay G2 evresinden mitoz (M) girişi simgeler. Bu geçişin önde gelen olayları aktif CDK1/siklin B kompleksinin oluşumuyla kontrol edilir ve düzenlenir.

Hücre döngüsünde diğer bir denetim merkezi M kontrol noktasıdır. M kontrol noktası ile bağlantılı olan proteinler iğ ipliklerinin oluşumu ve bunların kromozom sentromellerinin kinetokoruyla yaptığı bağlanmayı engelleyerek hücrelerin anafaza girişini inhibe eder. Pek çok sayıda kinaz enzimi ve diğer proteinler iğ ipliklerini kurulduğu bu kontrol noktasında işe karışır (Klug ve Cummings 2003).

Hücre döngüsü kontrolünün herhangi bir basamakta bozulmasını sağlayan mutasyonlar kansere neden olan genlerin çalışılmasında önemlidir. Örneğin; kinazları ya da siklinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar hücrelerin malignan transformasyonun gelişiminde önemli olabilir. Bulgular, G1 kontrol noktasının pek çok kanserde hatalı olduğunu göstermektedir. Bu yüzden mutant G1 siklinler ve kinazlar kanser geliştirici genlerin en iyi adaylarıdır.

Normal fonksiyonu hücre fonksiyonunu teşvik etmek olan genler, proto-onkogenler olarak adlandırılır. Bu genler ifade edildiğinde hücre bölünmesini teşvik ederler. Hücre bölünmesinin düzenlenmesi için bu genler ve/veya bu gen ürünleri inaktifleştirilmiş olmalıdır. Eğer proto-onkogenler sürekli çalışır halde gelirse kontrolsüz hücre bölünmesine neden olur, bu da tümör oluşumuna öncülük eder. Proto-onkogen mutasyonlarının bir sonucu olarak böyle bir durum oluştuğunda bu genlere onkogenler adı verilir; çünkü bu genler kanserle ilişkili olarak bu genler hücre çoğalması uyarırlar. Kanser gelişimini uarmak için bir genin her iki allelinde de mutasyon olmasının gerektiği tümör baskılayıcı genlerin tersine, malignansinin indüklenmesi için bir proto-onkogenin iki kopyasının sadece birinde mutasyon olması gereklidir. Proto-onkogenlerin onkogenlere nasıl dönüştürüldüğünü en az üç mekanizma açıklayabilmektedir: Nokta mutasyonları, translokasyonlar, aşırı gen ifadesi. Bunların bazıları virüsler aracılığıyla olmasına rağmen, diğerleri, retrovirüslerin yokluğunda hücre içi olaylar tarafından gerçekleşir (Klug ve Cummings 2003).

P53 (protoonkogen) normalde tümör baskılayıcı bir gen olarak, hücrelerin hücre döngüsünün G1'den S fazına geçişini kontrol eder. P53 mutasyonları meme, akciğer, mesane ve kolon kanserini içeren pek çok kanser çeşidinde bulunmuştur. Tüm kanser olgularının yarısını p53 genindeki mutasyonlarla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Edmunds vd 2002). Hücre döngüsünün kontrolünde P53 geninin esas rolü kanser ve hücre döngüsüyle, kanser ve hücre büyümesini düzenleyen genler arasındaki ilişkilerin önemini ortaya koymaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında nevüs olgularında BRAF gen mutasyonunu incelerken sadece mutasyon oluşumunu ve onun diğer organ ve dokulara etkisini tek bir faktör etkisinde düşünmeyip çeşitli faktörlerinde bu mutasyonun ortaya çıkmasında bir etken olabileceğini unutmamak gerekir. Keza bu faktörler UV ışık muamelesiyle tetiklenebileceği gibi, genetik bir takım değişimlerinde etkisiyle oluşabilmektedir.

Bu tez çalışması, UV maruziyeti varlığında ve yokluğunda ortaya çıkan nevüs olgularındaki BRAF geni V599E mutasyonunu araştırmak amacıyla yapılmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1 Örnekler

Pamukkale Üniversitesi Patoloji AD`na 2000-2005 yılları arasında tanı alma amacı ile gelen toplam 30 parafine gömülmüş nevüs örneği çalışma kapsamına alındı. Bu olgular güneş gören, güneş görmeyen olarak iki gruba ayrılarak incelenmesi yapıldı. Toplam 30 olgunun 5 tanesi erkek, 25 tanesi kadındı. Olgular arasındaki yaş dağılımı 14-57 arasında değişmektedir. (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 Olguların yaş ve cinsiyet dağılımı.

Olgular	Cinsiyet	Yaş
1	K	26
2	E	21
3	K	44
4	K	30
5	K	24
6	K	34
7	E	57
8	K	44
9	K	48
10	K	48
11	K	14
12	K	34
13	K	27
14	E	55
15	K	22
16	K	49
17	K	24
18	K	24
19	K	24
20	K	28
21	K	?
22	K	15
23	K	51
24	E	?
25	K	50
26	K	49
27	K	37
28	E	33
29	K	19
30	K	14

Bu olgulardan histolojik olarak; 5 tane konjenital nevüs, 13 tane intradermal nevüs, 5 tane kompond nevüs, 6 tane dermal nevüs ve 1 tane jonksiyonel nevüs olarak tanı almıştır (Tablo 2.2). Olgulardaki nevüs lokalizasyonlarına bakıldığında; interscapuler bölge sırt derisi, sırt, yüz, mons pubis derisi, yanak cildi, saçlı deri, burun, alın, ense, boyun, umblikus laterali, sol aksilla, sağ crista iliaca derisi, vulva-vagina, sol scapula iç kısmı, karın örnekler arasında yer almaktadır (Tablo 2.2). Bu örnekler dışında melanoma hücre dizini, pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Tablo 2.2 Olgulardaki nevüs histolojisi ve lokalizasyonları

Olgular	Histoloji	Lokalizasyon
1	Konjenital nevüs	İnter scapuler bölge, sırt derisi
2	Konjenital nevüs	Sırt
3	İntradermal nevüs	Yüz, yüz derisi
4	İntradermal nevüs	C/S Abdominal sırasında insizyon yerinin inferiorundan nevüs eksizyonu, deri
5	İntradermal nevüs	Mons pubis derisi
6	İntradermal nevüs	Yanaktan alınan nevüs, yanak cildi
7	İntradermal nevüs, Kompond nevüs	Saçlı deri, yüz derisi
8	İntradermal nevüs	Yüz, yüz derisi
9	Dermal nevüs	Burun kanadı, alın
10	Dermal nevüs	Burun kanadı, alın
11	Kompond nevüs	Ense
12	Dermal nevüs	Yüz derisi
13	İntradermal nevüs	Yüz derisi
14	İntradermal nevüs	Alın ve boyun kayıtlı materyal
15	Dermal nevüs	Alın
16	İntradermal nevüs	Yüz kodlu materyal
17	İntradermal nevüs	Yüz, Yüzeysel cilt-cilt altı biyopsi materyali
18	İntradermal nevüs	Yüz, Yüzeysel cilt-cilt altı biyopsi materyali
19	İntradermal nevüs	Yüz, Yüzeysel cilt-cilt altı biyopsi materyali
20	Kompond nevüs	Umblikus laterali
21	Kompond nevüs	Sol aksilla
22	Melanositik dermal nevüs	Sağ crista iliaca derisi üzerinde hiperpigmente papül
23	Dermal nevüs	Vulva-vajina
24	İntradermal nevüs	Sol scapula iç kısmında sınırları net seçilemeyen üzerinde 2-3 adet kıl olan nevüs
25	Junctional nevüs	Yaklaşık 10 yıldır mevcut olan sırttaki lezyon
26	İntradermal nevüs	Karın kodlu materyal
27	Konjenital nevüs	Sağ burun kenarı, sağ kulak altı
28	Konjenital nevüs	Alın
29	Konjenital intradermal nevüs	Sırt derisi
30	Kompond nevüs	Karın

2.2. DNA İzolasyonu

Parafine gömülü nevüs örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için, 5 mikronluk kesitlerden her örnek için 1,5 ml'lik ependorf tüpüne 3 kesit kondu. Kesitlerden parafini uzaklaştırmak için; 50 °C'de ksilenle muamele edildi. Daha sonra, alkol serilerinden geçirilerek ksilen dokulardan uzaklaştırıldı. Bu işlemlerden sonra, Qiagen DNA Tissue Mini Kit (katalog no: 51106) protokolü kullanılarak dokudan DNA izolasyonu yapıldı.

Parafine Gömülü Dokudan DNA izolasyonu

Parafine Gömülü Dokudan DNA izolasyonunda uygulanan aşamalar aşağıda maddeler halinde verilmiştir;

- 1) Parafine gömülü dokudan 5 mikronluk kesitler alındı ve 1,5 ml'lik tüpe konuldu.
- 2) 1200 µl ksilen eklendi ve kısa karıştırma yapılarak bir gece (16 saat) 50 °C'de inkübe edildi.
- 3) Oda sıcaklığında 5 dakika tam devirde (13 000 rpm) santrifüj yapıldı.
- 4) Pipetle supernatant kısmı atıldı (pellet kısmına dokunulmaz).
- 5) 1200 µl etanol eklendi (%96-100). Kısa karıştırma yaparak ksilenin uzaklaşması sağlandı. (Karıştırma 5-10 dakika aralarla yapılarak etanolün doku içine daha iyi girmesi sağlandı).
- 6) Oda sıcaklığında (15-25 °C), 5 dakika tam devirde santrifüj yapıldı.
- 7) Pipetle etanol üstten atıldı ve pellet kısma dokunulmadı.
- 8) Etanolle yıkama 5-7 kez tekrarlandı.
- 9) Etanolün evapore olması için mikrosantirfüj tüpleri, 10-15 dakika 37 °C'lik etüvde kapakları açık şekilde inkübasyona bırakıldı.
- 10) Doku pelletinin üstüne 180 µl Buffer ATL eklendi.
- 11) 20 µl Proteinaz K eklenerek karıştırıldı, (gerekirse kısa santrifüj yapıldı) doku tamamen lize olana kadar 56 °C'de 1 saat-1 gece inkübe edildi.
- 12) Örneğe 200 µl Buffer AL eklendi ve 15 saniye boyunca sürekli karıştırıldı ve 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonrası, kısa santrifüj yapıldı.
- 13) Örneğe 200 µl etanol (%96-100) eklendi ve 15 saniye boyunca sürekli karıştırıldı. İyice homojenize olduktan sonra, kısa santrifüj yapıldı.

- 14) Örnek (presipitatu içerecek şekilde) dikkatli bir biçimde 2 ml toplama tüpü içindeki koluma, kenarını ıslatmaksızın, dikkatli bir biçimde aktarıldı. Tüpün kapağı kapatıldı ve 8 000 rpm`de 3 dakika santrifüj edildi. Kolum, temiz bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve filtrat içeren tüp atıldı.
- 15) Kolum dikkatlice açıldı ve kenarına değdirmeden 500 µl Buffer AW1 eklendi. Kapağı kapatıldı ve 8 000 rpm`de 3 dakika santrifüj edildi. Kolum temiz bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve filtrat içeren toplama tüpü atıldı.
- 16) Kolum dikkatlice açıldı ve kenarına değdirmeden 500 µl Buffer AW2 eklendi. Kapağı kapatıldı ve yüksek devirde, 13 000 rpm`de 5 dakika santrifüj edildi.
- 17) Kolum temiz bir 1,5 ml ependorf tüpüne yerleştirildi ve filtrat içeren toplama tüpü atıldı. Kolum dikkatlice açıldı ve 200 µl Buffer AE veya distile su eklendi. Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi ve 8 000 rpm`de 3 dakika santrifüj edildi.

2.3. Spektrofotometrik Ölçüm

DNA izolasyonu yapılan örneklerin, 1/100 sulandırma ile “Eppendorf BioPhotometer” spektrofotometre cihazı ile spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Sonuçlar tablo 2.3`de verilmiştir.

Tablo 2.3 DNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri

ÖRNEKLER	µg/µl	260/280 A°	260 A°	280 A°
1	0.53 µg/µl	1,74	0,105	0,060
2	0.49 µg/µl	1,74	0,098	0,056
3	0.47 µg/µl	1,74	0,096	0,055
4	0.49 µg/µl	1,74	0,099	0,057
5	0.57 µg/µl	1,76	0,115	0,065
6	0.47 µg/µl	1,71	0,095	0,055
7	0.48 µg/µl	1,73	0,096	0,056
8	0.49 µg/µl	1,75	0,098	0,056
9	0.48 µg/µl	1,77	0,097	0,055
10	0.68 µg/µl	1,72	0,137	0,079
11	0.45 µg/µl	1,72	0,090	0,052
12	0.54 µg/µl	1,76	0,107	0,061
13	0.50 µg/µl	1,75	0,100	0,057
14	0.46 µg/µl	1,75	0,093	0,053
15	0.79 µg/µl	1,64	0,158	0,096
16	0.56 µg/µl	1,78	0,098	0,055
17	0.56 µg/µl	1,75	0,111	0,064
18	0.45 µg/µl	1,73	0,090	0,052
19	0.49 µg/µl	1,77	0,098	0,056
20	0.36 µg/µl	1,87	0,071	0,038
21	0.42 µg/µl	1,74	0,084	0,049
22	0.45 µg/µl	1,71	0,089	0,052
23	0.55 µg/µl	1,64	0,094	0,058
24	0.45 µg/µl	1,78	0,089	0,050
25	0.48 µg/µl	1,58	0,095	0,060
26	0.44 µg/µl	1,72	0,089	0,051
27	0.39 µg/µl	1,71	0,077	0,045
28	0.51 µg/µl	1,72	0,102	0,059
29	0.39 µg/µl	1,89	0,079	0,042
30	0.45 µg/µl	1,77	0,091	0,051
Pozitif kontrol	0.47 µg/µl	1,75	0,095	0,054

2.4. Mutasyon Analizi-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

BRAF genin 15. ekzonundaki 599. kodonu içeren DNA parçasını çoğaltmak amacıyla Kademeli (Step-Down) PZR uygulandı. Kademeli PZR`da BRAF genin 15. ekzonundaki 599. kodonunu çoğaltmak amacıyla tasarlanan primerler;

İleri dizi (Forward) primeri;

5'-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA-3'

Geri dizi (Reverse) primeri;

5'-GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A-3' şeklindedir.

PZR reaksiyonu ile ilgili DNA parçasının çoğaltılmasında; 25 µl HotStar Tag PZR Karışımı (2.5 ünite HotStar Tag DNA polimeraz, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, katalog no # 203445) 2 µl BRAF primer karışımı, 10 µl H₂O ve 20 µl DNA kullanıldı.

Kademeli PZR amplifikasyonunda kullanılan PZR döngü basamakları aşağıda verilmiştir;

Enzim Aktivasyonu; 95 C° de 15 dakika

PZR Reaksiyonu;

95 C° de 2 dakika, 1 döngü Ön Denatürasyon

95 C° de 1 dakika Denatürasyon,
59 C° de 1 dakika Primer Eşleme,
72 C° de 1 dakika Uzama, } 2 döngü

95 C° de 1 dakika Denatürasyon,
57 C° de 1 dakika Primer Eşleme,
72 C° de 1 dakika Uzama } 2 döngü

95 C° de 1 dakika Denatürasyon,
55 C° de 1 dakika Primer Eşleme,
72 C° de 1 dakika Uzama, } 40 döngü

Son Uzama; 72 C° de 5 dakika şeklindedir.

2.5. PZR Ürününün Görüntülenmesi

PZR reaksiyonu sonucu elde edilen PZR ürünlerinin görüntüleme işlemi “Vilber Lourmat” UV görüntüleme cihazı ile yapıldı. PZR ürünlerinin yükleneceği agaroz jel %1`lik olarak, 0.5 gram tartılan toz agarın 50 ml. 1× TAE solusyonunda çözülmesiyle hazırlandı (% 1.5`luk agaroz jel için 0.75 gram toz agar 1× TAE solusyonunda çözülür). Hazırlanan toz agar-TAE çözeltisi, 400 W`lık mikrodalga fırında ısıtılarak hazır hale getirildikten sonra 2 µl etidyum bromid ile boyanması yapıldı. Agaroz jelde her bir kuyucuğa 10 µl PZR ürünü gelecek şekilde 6× (yaklaşık 2 µl) yükleme tamponuyla yükleme yapıldı.

2.6. Dizi Analizi

DNA nükleotid dizi analizi, Otomatik Kapiler Jel Elektroforez cihazı ile (ABI PRISM 310 Genetik Analizör Applied Biosystems, Foster City, USA) İontek'te (İontek A.Ş. İstanbul, Türkiye) saptanmıştır.

Uygulanan yöntemde, boya terminasyon işaretleme adı verilen bir metot kullanılarak farklı bazlarda (A, G, T, C) sonlanan DNA sentez ürünlerine floresan işaretli boyalar iliştilir. Elektroforez, örnekler bir kapillerden geçirilirken uygulanır. Floresan işaretli boyları uyarmak için bir lazer, boyların yaydığı ışığı toplamak içinse bir CCD kamera kullanılır. Böylece, lazer uyarımının ardından dört boya tarafından yayılan farklı dalga boylarındaki ışık tek kulvarda ayırılabilir. Floresan miktarlarının ölçülmesi ve yorumlanmasının ardından DNA örneğindeki baz dizisi saptanır.

2.7. İmmunohistokimya

Toplam 30 olgu, Anti-ACTİVE® MAPK pAb Rabbit, (pTEpY) (katalog no:V8031, Promega) antikoru kullanılarak immunohistokimyasal yöntemle boyandı. Anti-ACTİVE® MAPK pAb, bir poliklonal tavşan antikordur. Bu antikor, MAP kinaz enzimlerinin aktif formuna uygunluk gösteren ikili olarak fosforillenmiş peptide karşı affinite gösterir. Antikor 1/500 dilüsyonda çalışıldı. İmmunohistokimya çalışmasında uygulanan protokol aşağıda verilmiştir;

- 1) 30 örneğe ait olan, 5 mikron kalınlığında lizinli lama alınan kesitler bir gece boyunca 37 °C`de etüvde bekletildi.
- 2) Ertesi gün lamalar 67 °C`lik etüvde 1 saat kadar bekletildi.
- 3) Etüvden çıkan lamalar 1 saat ksilende bekletildikten sonra % 90, %80, %70, %60 alkol serilerinden geçirildi ve su ile yıkandı. (5-6 dakika akan çeşme altında).
- 4) 600 W mikrodalga fırında, proteaz enzimi ile kaynatma işlemi 2 ×10 dakika uygulandı (Antijen açığa çıkarma).
- 5) 2 ×5 dakika PBS tampon solüsyonunda yıkama yapıldı.
- 6) Primer antikor damlatıldı: 30 dakika.
- 7) 3×5 dakika PBS tampon solüsyonunda yıkama yapıldı.
- 8) Sekonder antikor damlatıldı: 20 dakika.
- 9) 3×5 dakika PBS tampon solüsyonunda yıkama yapıldı.
- 10) Universal kit damlatıldı: 20 dakika. 3×5 dakika PBS tampon solüsyonunda yıkama yapıldı.
- 11) DAB kromojen damlatıldı (her bir lama 200 µl damlatılır).
- 12) Anti-ACTİVE® MAPK pAb, Rabbit, (pTEpY) (katalog no:V8031, Promega) antikorunu, her bir lama 100 µl gelecek şekilde damlatılarak immunohistokimyasal boyama Nexes Ventana Otoimmun cihazı ile yapıldı.
- 13) Cihazdan çıkan lamalar distile suda 5 dakika yıkandı. Harris hematoksilende 10 saniye tutuldu, suda yıkandı.
- 14) Dehidratasyon: Toplam süre 8 dakika.
2 dakika %60
2 dakika %70
2 dakika %80
2 dakika %90
2 dakika %100
- 7) Ksilin 2 ×10 dakika. Entellan ile lamel kapatıldı.

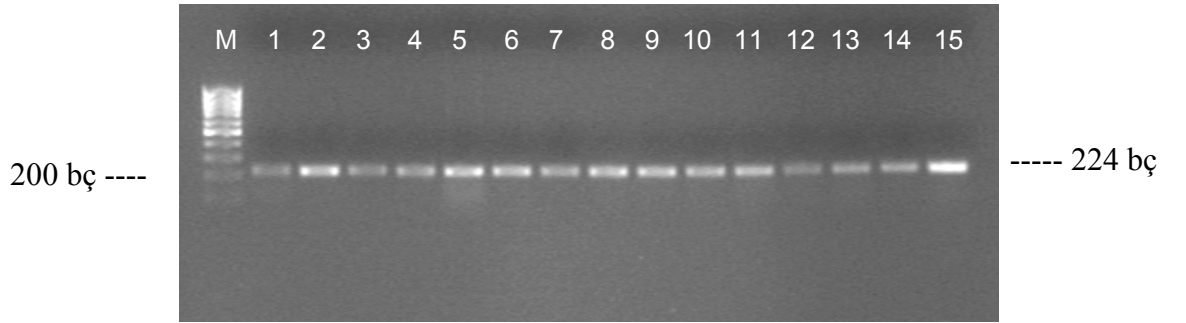
Not: Konjugat olarak 1:1,000 sulandırma ile, Donkey Anti-Rabbit Cy®3 kullanıldı.

2.8 İstatistiksel Analiz

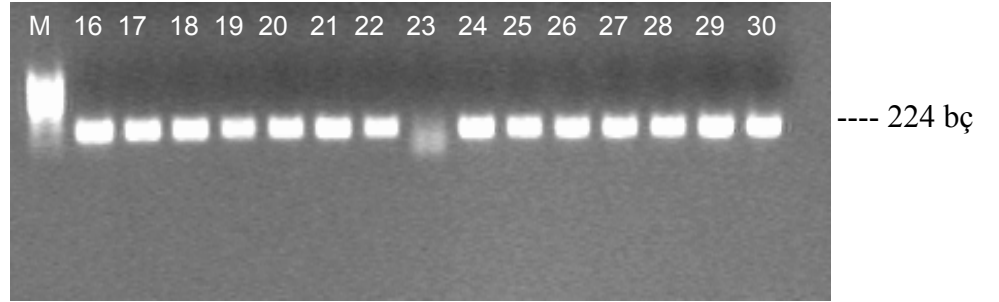
İstatistiksel analiz, SPSS software package 10.0 kullanılarak örneklere student t-test ve ki kare test uygulanarak yapılmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Pamukkale Üniversitesi Patoloji AD'na 2000-2005 yılları arasında tanı alma amacı ile gelen toplam 30 parafine gömülmüş nevüs örneğinden DNA izolasyonunu takiben, BRAF genin 15. ekzonundaki V599E kodonunu içeren DNA parçasını çoğaltmak amacıyla ilgili bölge için tasarlanan primerler kullanılarak kademeli PZR uygulandı. PZR amplifikasyonu ile çoğaltılan DNA parçasının agaroz jel görüntüleri Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.1 %1.5`luk agaroz jeldeki görüntü. M: Marker



Şekil 3.2 %1`lik agaroz jeldeki görüntü.M: Marker

BRAF ekzon 15'deki GTG'den GAG'ye değişimi valin yerine glutamik asitin kodlanmasına yol açan bir T1796A (V599E) yanlış anlamlı mutasyonu dizi analizi ile araştırıldı. Toplam 30 olgunun yalnızca 5 tanesinde (%16,6) T1796A (V599E) yanlış anlamlı mutasyon saptandı. BRAF mutasyon varlığı ile olguların yaş ve cinsiyet

dağılımı Tablo 3.1’de, BRAF mutasyon varlığı ve nevüs histolojisi ve lokalizasyonları Tablo 3.4’de özetlenmiştir.

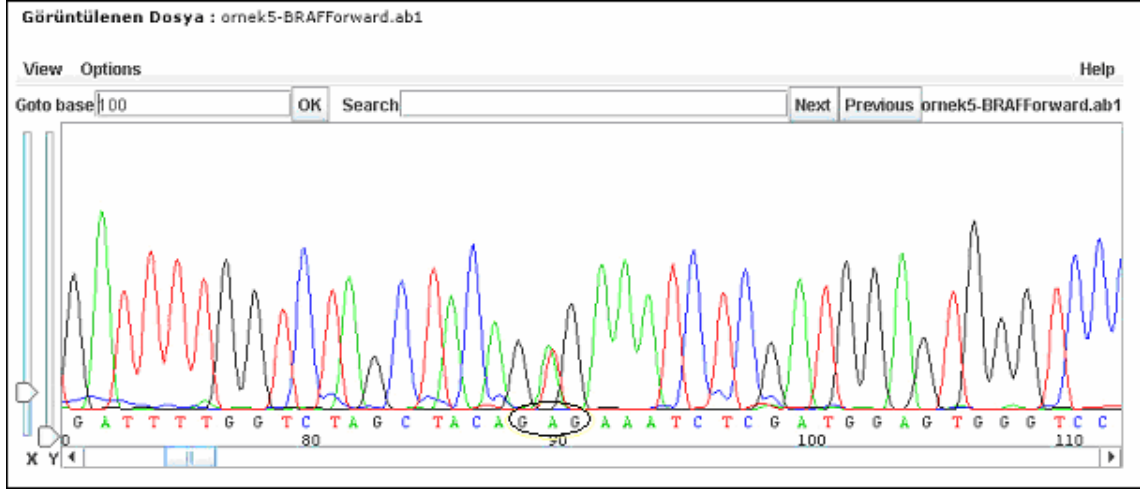
Tablo 3.1 BRAF mutasyon varlığı ve olguların yaş ve cinsiyet dağılımı

Olgular	BRAF Mutasyonu	Cinsiyet	Yaş
1	-	K	26
2	-	E	21
3	-	K	44
4	-	K	30
5	+	K	24
6	-	K	34
7	-	E	57
8	-	K	44
9	+	K	48
10	-	K	48
11	-	K	14
12	-	K	34
13	-	K	27
14	-	E	55
15	-	K	22
16	-	K	49
17	-	K	24
18	+	K	24
19	-	K	24
20	-	K	28
21	-	K	?
22	-	K	15
23	-	K	51
24	-	E	?
25	+	K	50
26	-	K	49
27	-	K	37
28	+	E	33
29	-	K	19
30	-	K	14
BRAF Pozitif Kontrol	+		

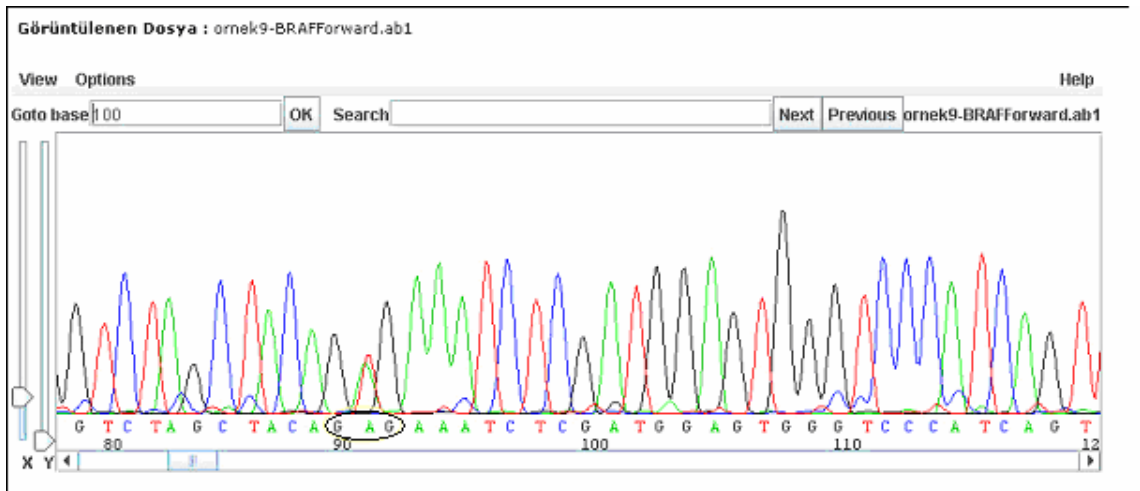
Tablo 3.2 BRAF mutasyon varlığı ve olgulardaki nevüs histolojisi ve lokalizasyonları

Olgular	BRAF Mutasyonu	Histoloji	Lokalizasyon	ERK 1/2 Nükleer ve Stoplazmik Boyanma
1	-	Konjenital nevüs	İnter scapuler bölge, sırt derisi	+
2	-	Konjenital nevüs	Sırt	-
3	-	İntradermal nevüs	Yüz, yüz derisi	-
4	-	İntradermal nevüs	C/S Abdominal sırasında insizyon yerinin inferiorundan nevüs eksizyonu, deri	+
5	+	İntradermal nevüs	Mons pubis derisi	+
6	-	İntradermal nevüs	Yanaktan alınan nevüs, yanak cildi	++
7	-	İntradermal nevüs, Kompound nevüs	Saçlı deri, yüz derisi	-
8	-	İntradermal nevüs	Yüz, yüz derisi	++
9	+	Dermal nevüs	Burun kanadı, alın	+
10	-	Dermal nevüs	Burun kanadı, alın	++
11	-	Kompound nevüs	Ense	+
12	-	Dermal nevüs	Yüz derisi	+
13	-	İntradermal nevüs	Yüz derisi	-
14	-	İntradermal nevüs	Alın ve boyun kayıtlı materyal	++
15	-	Dermal nevüs	Alın	+
16	-	İntradermal nevüs	Yüz kodlu materyal	+
17	-	İntradermal nevüs	Yüz, Yüzeysel cilt-cilt altı biyopsi materyali	++
18	+	İntradermal nevüs	Yüz, Yüzeysel cilt-cilt altı biyopsi materyali	+
19	-	İntradermal nevüs	Yüz, Yüzeysel cilt-cilt altı biyopsi materyali	+++ , klonal
20	-	Kompound nevüs	Umblikus laterali	+
21	-	Kompound nevüs	Sol aksilla	+
22	-	Melanositik dermal nevüs	Sağ crista iliaca derisi üzerinde hiperpigmente papül	-
23	-	Dermal nevüs	Vulva-vajina	-
24	-	İntradermal nevüs	Sol scapula iç kısmında sınırları net seçilemeyen üzerinde 2-3 adet kıl olan nevüs	+
25	+	Junctional nevüs	Yaklaşık 10 yıldır mevcut olan sırttaki lezyon	-
26	-	İntradermal nevüs	Karın kodlu materyal	-
27	-	Konjenital nevüs	Sağ burun kenarı, sağ kulak altı	++
28	+	Konjenital nevüs	Alın	+
29	-	Konjenital intradermal nevüs	Sırt derisi	-
30	-	Kompound nevüs	Karın	-
BRAF Pozitif Kontrol	+			

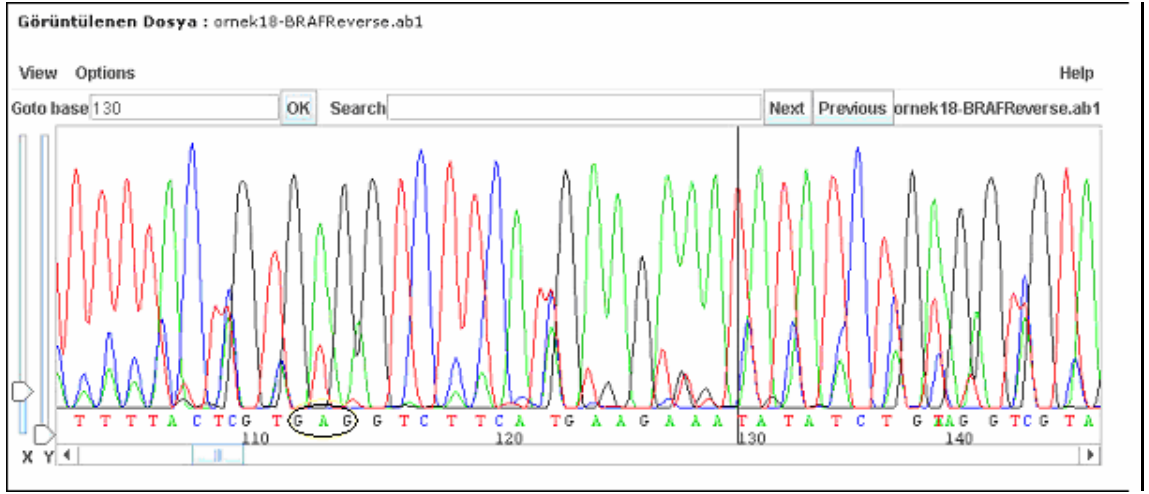
BRAF ekzon 15`deki T-A değişimini belirleyebilmek için yapılan dizi analizi sonucu elektrogram görüntüleri şekil 3.3-şekil 3.9 arasında verilmiştir.



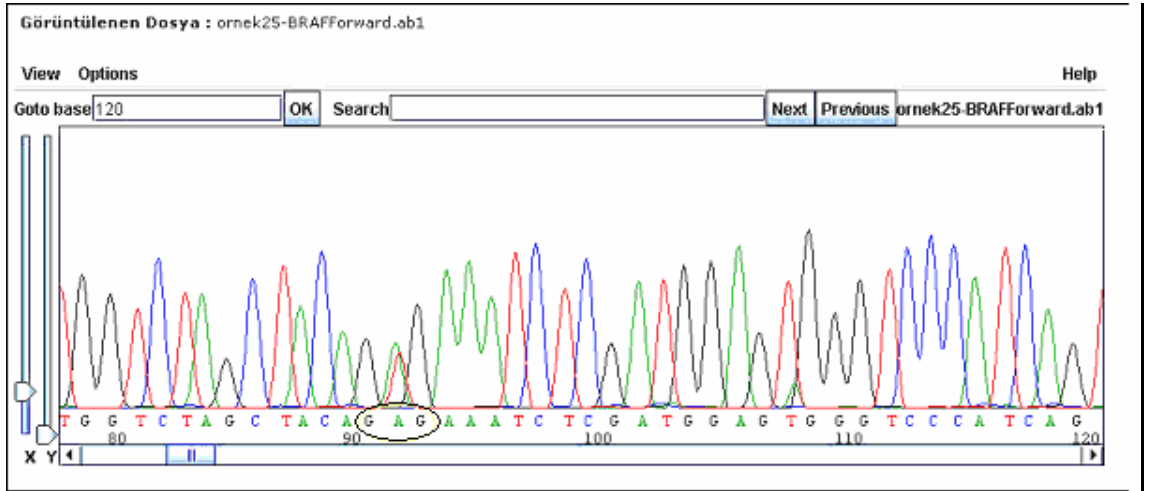
Şekil 3.3 BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonlu 5 numaralı örnek. Daire içindeki alan GAG değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir.



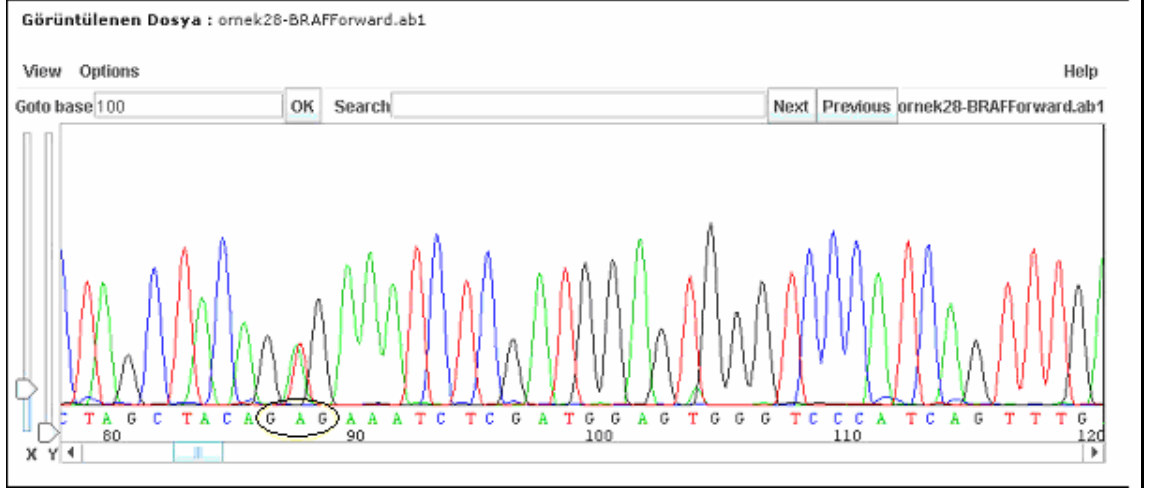
Şekil 3.4 BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonlu 9 numaralı örnek. Daire içindeki alan GAG değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir.



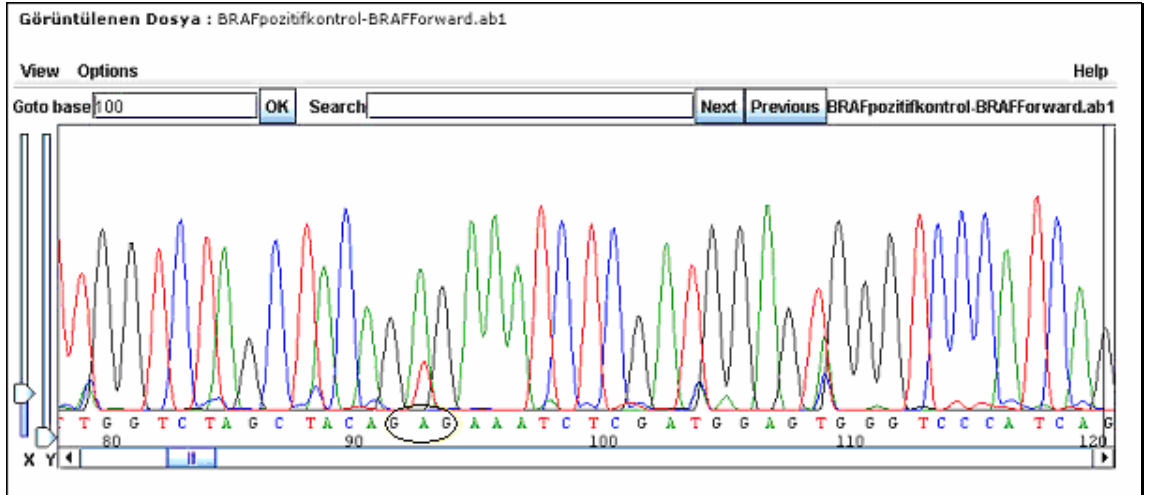
Şekil 3.5 BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonlu 18 numaralı örnek. Daire içindeki alan GAG değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir



Şekil 3.6 BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonlu 25 numaralı örnek. Daire içindeki alan GAG değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir.



Şekil 3.7 BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonlu 28 numaralı örnek. Daire içindeki alan GAG değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir.



Şekil 3.8 BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonu için pozitif kontrol olan melanoma hücre dizinine ait dizi analizi elektrogram görüntüsü. Daire içindeki alan GAG değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir.



Şekil 3.9 BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonu olmayan 1 numaralı örnek. Daire içindeki alan GAG değişimiyle sonuçlanan kodonu göstermektedir.

Örneklerin dizi analizi elektrogram sonuçlarına ait diğer sonuçlar ekler kısmında verilmiştir.

Aşağıda mutasyon saptanan örnekler için dizi analizleri verilmiştir.

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-5-FOR

gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT 1740
gi|4757867_62-2359     GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT 1737
gi|ornek-5-for         -----AATGATCAGTTTCTTTCTTCTACCCTCA 28
                        *** **
                        **

gi|33188458_62-2362     AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 1800
gi|4757867_62-2359     AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 1797
gi|ornek-5-for         GATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGG 88
                        *****

gi|33188458_62-2362     AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG 1860
gi|4757867_62-2359     AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG 1857
gi|ornek-5-for         AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG 148
                        *****

gi|33188458_62-2362     GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT 1920
gi|4757867_62-2359     GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT 1917
gi|ornek-5-for         GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTCCACTGATTAATTTTGGCCAAA----- 193
                        * *  * * * * * * * * * * * * * * *

```

Şekil 3.10 5 numaralı örneğe ait dizi analizi. * Gri boyalı alan T-A değişimini göstermektedir.

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-9-FOR

gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT 1740
gi|4757867_62-2359     GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT 1737
gi|ornek                -----NNAAAACGATACGTTTCTTTCTTCTAACCTCAG----- 33
                        * * * * *
                        * * * * *

gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 1800
gi|4757867_62-2359     AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 1797
gi|ornek                -ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAG 92
                        *****

gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG 1860
gi|4757867_62-2359     AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG 1857

```

Şekil 3.11 9 numaralı örneğe ait dizi analizi. * Gri boyalı alan T-A değişimini göstermektedir.

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-18-REV

gi|33188458_62-2362      CTCCATATCATTGAGACCAAATTTGAGATGATCAAACCTTATAGATATTGCACGACAGACT 1680
gi|4757867_62-2359     CTCCATATCATTGAGACCAAATTTGAGATGATCAAACCTTATAGATATTGCACGACAGACT 1677
gi|ornek18rev           -----TTTTTCATAATGCCNT 16
                        * * * * *

gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT 1740
gi|4757867_62-2359     GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT 1737
gi|ornek18rev           GCTCTGATAGGAAAATGAGATCTACTGTTTCTTTACTTACTACGACCT----ATCA-- 70
                        ** * * * * *

gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCAC-AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGT 1799
gi|4757867_62-2359     AATATATTTCTTCATGAAGACCTCAC-AGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGT 1796
gi|ornek18rev           GATATATTTCTTCATGAAGACCTCACGAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAAG 130
                        *****

gi|33188458_62-2362      GAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGAT 1859
gi|4757867_62-2359     GAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGAT 1856
gi|ornek18rev           -----

```

Şekil 3.12 18 numaralı örneğe ait dizi analizi. * Gri boyalı alan T-A değişimini göstermektedir.

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-25-FOR

gi|33188458_62-2362   GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT 1740
gi|4757867_62-2359   GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT 1737
gi|ornek25for         -----NNNTTATAGATCTGTTTCTTTCTTCTCA----CCTCAG----- 34
                          *** * * * * * * * * * *

gi|33188458_62-2362   AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 1800
gi|4757867_62-2359   AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 1797
gi|ornek25for         -ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAG 93
                          *****

```

Şekil 3.13 25 numaralı örneğe ait dizi analizi. *Gri boyalı alan T-A değişimini göstermektedir.

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-28-FOR

gi|33188458_62-2362   GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT 1740
gi|4757867_62-2359   GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT 1737
gi|ornek28for         -----NNNNNGGATATGTTTCTTT----CTTCTAACCT--C 30
                          * * ** * * * *

gi|33188458_62-2362   AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 1800
gi|4757867_62-2359   AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 1797
gi|ornek28for         GATATATTTCTTC-TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAG 89
                          *****

gi|33188458_62-2362   AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG 1860
gi|4757867_62-2359   AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG 1857
gi|ornek28for         AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG 149
                          *****

gi|33188458_62-2362   GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT 1920
gi|4757867_62-2359   GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT 1917
gi|ornek28for         GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTCCACTGATTAATTTTGGCCAA----- 193
                          * * * * * * * * * *

```

Şekil 3.14 28 numaralı örneğe ait dizi analizi. * Gri boyalı alan T-A değişimini göstermektedir.

Aynı olgularda BRAF mutasyonunun varlığının, olası MAPK sinyal yolunun aktivasyonunu araştırmak amacıyla aktifleşmiş olan ERK 1/2 pAb protein ekspresyonuna immunohistokimyasal yöntemle bakıldı.

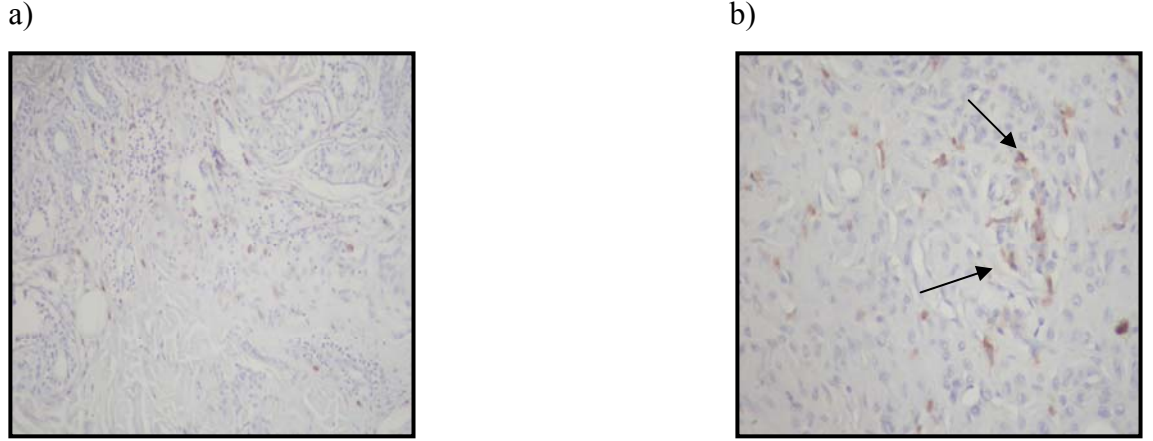
30 olgunun histopatolojik özelliklerine göre stoplazmik ERK 1/2 pAb boyanması Tablo 3.3`de verilmiştir. 30 örnekten 20 tanesi ERK 1/2 pAb aktivasyonu açısından pozitif bulundu. Bu örneklerden 7 tanesinde (++) güçlü stoplazmik ERK 1/2 pAb boyanması görülürken 13 tanesinde zayıf (+) boyanma görüldü (Tablo3.3). ERK 1/2 pAb aktivasyonu açısından pozitif boyanan örneklerden 13 tanesi güneş gören bölgede lokalize, 7 tanesi güneş görmeyen bölgede lokalize idi (Tablo3.3).

Tablo 3.3 Olgulardan alınan nevüs lokalizasyonları ve stoplazmik ERK 1/2 pozitifliği

Olgular	Lokalizasyon	ERK 1/2 Nükleer ve Stoplazmik Boyanma	Cinsiyet	Yaş
1	İnter scapuler bölge, sırt derisi	+	K	26
2	Sırt	-	E	21
3	Yüz, yüz derisi	-	K	44
4	C/S Abdominal sırasında insizyon yerinin inferiorundan nevüs eksizyonu, deri	+	K	30
5	Mons pubis derisi	+	K	24
6	Yanaktan alınan nevüs, yanak cildi	++	K	34
7	Saçlı deri, yüz derisi	-	E	57
8	Yüz, yüz derisi	++	K	44
9	Burun kanadı, alın	+	K	48
10	Burun kanadı, alın	++	K	48
11	Ense	+	K	14
12	Yüz derisi	+	K	34
13	Yüz derisi	-	K	27
14	Alın ve boyun kayıtlı materyal	++	E	55
15	Alın	+	K	22
16	Yüz kodlu materyal	+	K	49
17	Yüz, Yüzeysel cilt-cilt altı biyopsi materyali	++	K	24
18	Yüz, Yüzeysel cilt-cilt altı biyopsi materyali	+	K	24
19	Yüz, Yüzeysel cilt-cilt altı biyopsi materyali	+++ , klonal	K	24
20	Umblikus laterali	+	K	28
21	Sol aksilla	+	K	?
22	Sağ crista iliaca derisi üzerinde hiperpigmente papül	-	K	15
23	Vulva-vajina	-	K	51
24	Sol scapula iç kısmında sınırları net seçilemeyen üzerinde 2-3 adet kıl olan nevüs	+	E	?
25	Yaklaşık 10 yıldır mevcut olan sırttaki lezyon	-	K	50
26	Karın kodlu materyal	-	K	49
27	Sağ burun kenarı, sağ kulak altı	++	K	37
28	Alın	+	E	33
29	Sırt derisi	-	K	19
30	Ense ve karın kayıtlı materyaller	-	K	14

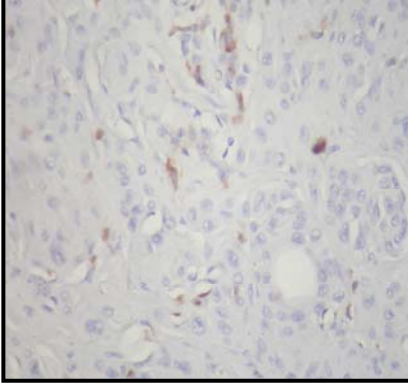
Literatürde BRAF pozitifliği sıklıkla ERK 1/2 pAb pozitifliği ilişkilendirilse de (Saldanha vd 2004), bizim çalışmamızda BRAF mutasyonu pozitif olan hiçbir olguda ERK 1/2 pAb pozitifliği güçlü bir boyanma ile saptanmadı. Ancak mutasyon görülen bir olgunun başka bir nevüsünde ERK 1/2 pAb pozitifliği görüldü. Dolayısıyla, BRAF mutasyonu ile ERK 1/2 pAb ekspresyonu arasında bir korelasyon saptanmadı. Buna benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Uribe vd 2006). Ancak kesin yorum yapmadan önce olgu sayısı arttırılmalıdır.

Aşağıda immunohistokimya ile ERK 1/2 pAb pozitifliği boyanma görülen dokulara ait görüntüler verilmiştir.

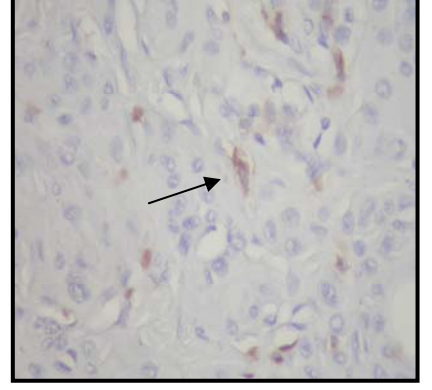


Şekil 3.15 Yanak cildinden alınan intradermal nevüse ait stoplazmik ERK 1/2 pAb pozitifliğini gösteren görüntüler. a) küçük büyütme b) büyük büyütme.

a)

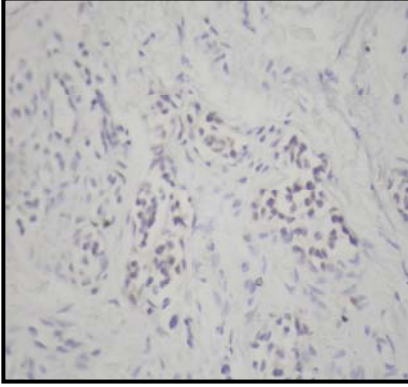


b)

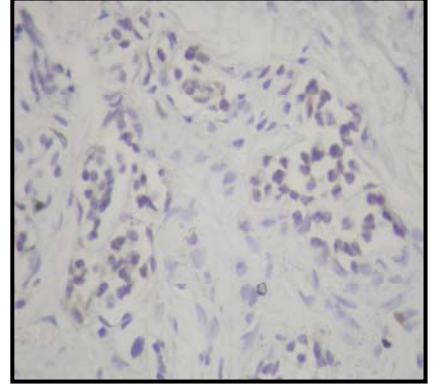


Şekil 3.16 Boyundan alınan intradermal nevüse ait stoplazmik ERK 1/2 pAb pozitifliğini gösteren görüntüler. a) küçük büyütme b) büyük büyütme.

a)

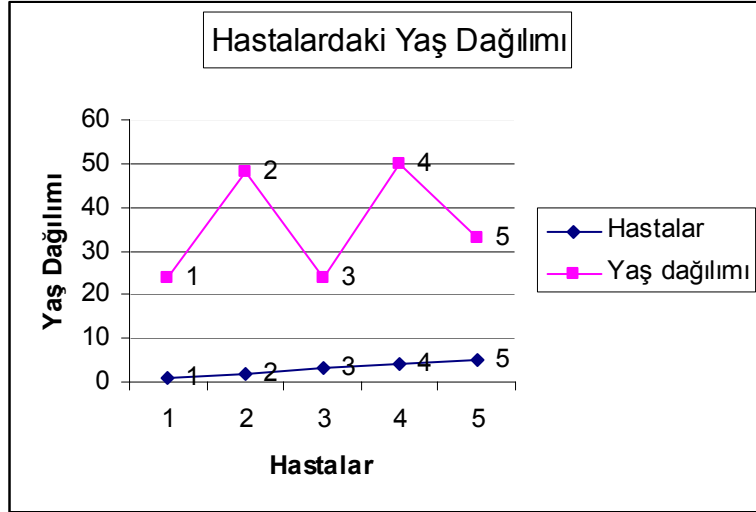


b)



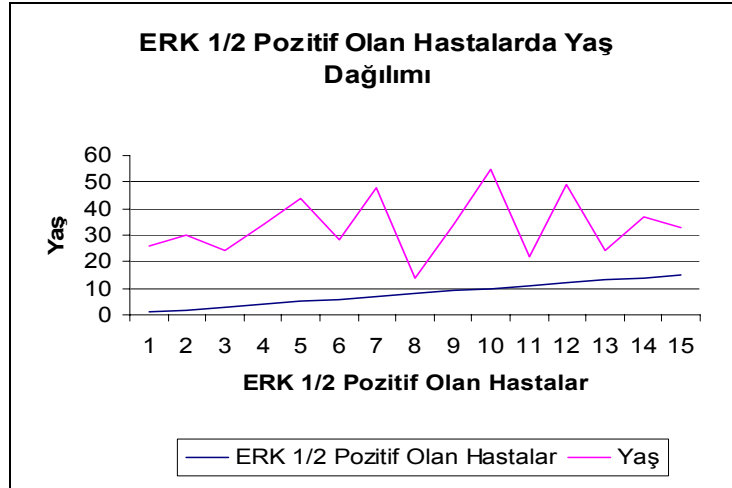
Şekil 3.17 Yüz derisinden alınan intradermal nevüse ait stoplazmik ERK 1/2 pAb pozitifliğini gösteren görüntüler (Büyük daire içindeki alan klonal ERK 1/2 pAb stoplazmik boyanmasını göstermektedir). a) küçük büyütme b) büyük büyütme.

30 olguda BRAF T1796A (V599E) yanlış anlamlı mutasyonu görülen 5 olgunun yaş dağılımı 24-50 arasındadır. Bu dağılım şekil 3.18`de verilmiştir.



Şekil 3.18 Hastalardaki yaş dağılımı

Yine 30 olguda, ERK 1/2 pAb stoplazmik boyanması görülen olguların yaş dağılımı şekil 3.19'da verilmiştir. ERK 1/2 pAb stoplazmik boyanma görülen olguların yaş ortalaması 38, boyanma görülmeyen olguların yaş ortalaması 32 olarak belirlendi. Buna göre geç yaş ile ERK 1/2 pAb stoplazmik boyanma arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı.



Şekil 3.19 ERK 1/2 pAb Pozitif Olan Hastalarda Yaş dağılımı

Erk 1/2 pAb sitoplazmik boyanma, daha sıklıkla güneş gören bölgelerde bulunan nevüslerde (30 olgunun 17'si) saptandı. BRAF T1796A (V599E) yanlış anlamlı

mutasyonu ile lokalizasyon açısından güneş görme arasında pozitif bir korelasyon saptanmadı.

BRAF ekzon 15 T1796A (V599E) yanlış anlamlı mutasyon taraması yapılan bu çalışmada, 30 olgudan alınan örneklerin lokalizasyonu da bu mutasyonun varlığını değerlendirme açısından önemlidir. Literatürde UV muamelesi ile BRAF mutasyonu arasında bir ilişki olabileceği belirtilmiştir (Shinozaki vd 2004). Bu çalışmada sadece 2 örnek güneş görmeyen bölgede (sırt ve mons pubis derisi), kalan 3 örnek ise güneş gören bölgelerde (yüz, alın, burun kanadı) bulunmaktadır. Buna göre, UV ile BRAF mutasyonu arasında bir pozitif bir korelasyon saptanmamıştır. Ancak daha güçlü bir yorum için ise örnek sayısının artırılması gerekmektedir.

Bazı yayınlarda Ras/Raf/MEK/ERK yolunda fonksiyon gören MEK'in aktivasyonunun diğer mutasyonların aktivasyonlarıyla ilişkili olmadığı belirtilmiştir (Hüser vd 2001). Ayrıca ortaya çıkan bir Raf protein kinaz aktivasyonu ile diğer kinazların aktivasyonu arasında bir ilişki olmadığı ileri sürülmüştür. Bu da bize Raf protein kinaz aktivasyonunun çekirdekte transkripte olacak düzeye gelinceye kadar MAPK sinyal yolu yanında başka yolları da kullanabileceğini düşündürmektedir.

4. SONUÇ

Çalışma kapsamındaki 30 örneğin histolojik özellikleri konjenital nevüs, intradermal nevüs, compound nevüs, dermal nevüs ve jonksiyonel nevüs şeklindedir. Bu örnekler dışında melanoma hücre dizini, pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edildi.

BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonu 30 olgunun 5'inde (%16.6) belirlendi (İzolasyon, PZR ve dizi analizi sonuçlarına dayanarak). Dizi analizi sonuçlarında BRAF genin 15. ekzonunda 599. kodonda (V599E) bir T1796A yanlış anlamlı mutasyonu gerçekleşerek GTG valin aminoasiti yerine GAG glutamik asitin kodlanmasıyla ortaya çıkan mutasyon 5 olguda belirlendi. Bu mutasyonun tespit edildiği 5 olgunun 4 tanesi kadın, 1 tanesi erkek idi. Yine bu olguların yaş dağılımı 24-50 arasında değişmektedir.

Mutasyon tespit edilen örneklerin lokalizasyonu güneş gören-güneş görmeyen şeklinde sınıflandırıldığında 2 olguya ait örneğin güneş görmeyen lokalizasyonlu, 3 olguya ait örneğin güneş gören lokalizasyonlu olduğu belirlendi.

BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonuna sahip 5 örneğin hiç birinde ERK 1/2 pAb pozitifliği saptanmadı. Ancak mutasyon izlenen bir olgunun başka bir nevüsünde immunohistokimyasal olarak klonal sitoplazmik Anti-Fosfo-ERK 1/2 pAb pozitifliği saptandı.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında nevüs olgularında BRAF ekzon 15 T1796A (V599E) mutasyonuna 30 olgunun 5'inde (%16.6) saptandı. Bu olgulardan alınan parafin doku örneklerinin 14 tanesi Güneş gören bölgede (%43) 16 tanesi Güneş görmeyen bölgede (%57) lokalize idi. BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonu pozitif bulunan 5 örnekten 3'ü güneş gören bölgede, 2'si güneş görmeyen bölgede idi. Bu da bize UV muamelesi ile BRAF mutasyonu arasında pozitif bir ilişki olabileceğini düşündürmemektedir. BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonu taşıyan olguların yaş dağılımı 24-50 arasında (yaş ortalaması 36) değiştiğinden geç yaşın bu mutasyonun ortaya çıkmasında tam olarak bir neden olabileceğini göstermemektedir.

Çalışma kapsamındaki olguların, cinsiyet dağılımında kadın olguların fazlalığı anlamlı bir yorumu engellese de, anlamlı bir sonuç için örnek sayısındaki cinsiyet dağılımının daha homojen olması gerekmektedir.

Literatürde nevüs olgularında BRAF mutasyonunun varlığında MAPK sinyal yolu aktivasyonunu araştırmak amacıyla immunohistokimyasal olarak Anti-Active MAPK kullanılmıştır. Bu çalışmada aynı antikoru kullanarak ERK 1/2 pAb pozitifliği 30 olguda tarandı ve 30 olgunun 20 tanesinde ERK 1/2 pAb sitoplazmik boyanma pozitif bulundu. Ancak bunlardan sadece 7 tanesinde (%23) güçlü ERK 1/2 pAb sitoplazmik boyanması mevcuttu. Bu olguların hiç birinde BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonu belirlenmedi. Dolayısıyla ERK 1/2 pAb sitoplazmik boyanma ile BRAF ekzon 15 T1796A mutasyonu arasında pozitif bir korelasyon bulunmamaktadır.

Bu durum, Raf protein kinazın aktif hale geçip çekirdekte transkripsiyonu aktif hale gelmesinde ERK 1/2 pAb yolunun dışında başka yolları da kullanabileceğini düşündürmektedir. Keza MAPK sinyal yolu pek çok kinazı içine alan bir yoldur. Dolayısıyla mutasyonla sonuçlanan her bir proliferasyon farklı yolları deneyerek çekirdeğe ulaşabilme şansına sahiptir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Malek, Z. A. (1998). Endocrine Factors As Effectors Of İntegumental Pigmentation. *Dermatol Clin.*, 6:175-183.
- Ackerman, A. B., and Mihara, I. (1985). Dysplasia, Dysplastic Melanocytes, Dysplastic Nevi, the Dysplastic Nevus Syndrome, and the Relation Between Dysplastic Nevi and Malignant Melanomas. *Hum. Pathol.*, 16: 87-91.
- Alsina, J. Gorski, D. H. Germino, F. J. Shih, W. Lu, S. E. Zhang, Z. G. Yang, J. M. Hait, W. N. Goydos, J. S. (2003). Detection of Mutations in the Mitogen Activated Protein Kinase Pathway in Human Melanoma. *Clinical Cancer Research.*, 9:6419-6425.
- Armstrong, B. K. & English, D. R. (1996). İn Cancer Epidemiology and Prevention, *Oxford University Pres, New York.*
- Avruch, J. Khokhlatchev, A. Kyriakis, J. M. et al. (2001). Ras Activation of the Raf Kinase: Tyrosine Kinase Recruitment of the MAP Kinase Cascade. *Recent Prog Horm Res.*, 56:127-155.
- Barnard, D. Diaz, B. Clawson, D. And Marshall, M. (1998). Oncogenes, Growth Factors and Phorbol Esters Regulate Raf-1 Through Common Mechanisms. *Oncogene.*, 17:1539-1547.
- Barnier, J. V. Papin, C. Eychene, A. Lecoq, O. and Calothy, G. (1995). The Mouse B-raf Gene Encodes Multiple Protein Isoforms With Tissue-Specific Expression. *J. Biol. Chem.*, 270:23381-23389.
- Bastian, B. C. LeBoit, P. E. Pinkel, D. (2000). Mutations and Copy Number Increases of HRAS in Spitz Nevi with Distinctive Histopathologic Features. *Am J Pathol.*, 157:967–972.
- Bos, J. L. (1989). ras Oncogenes in Human Cancer: a review. *Cancer Res.*, 49:4682–9.
- Brose, M. S. Volpe, P. Feldman, M. Kumar, M. Rishi, I. Gerrero, R. Einhorn, E. Herlyn, M. Minna, J. (2003). BRAF Mutation in Primary Uveal Melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 44:2876-2878.
- Brose, M. S. Volpe, P. Feldman, M. Kumar, M. Rishi, I. Gerrero, R. Einhorn, E. Herlyn, M. Minna, J. Nicholson, A. Roth, J. A. Albelda, S. M. Davies, H. Cox, C. Brignell, G. Stephens, P. Futreal, P. A. Wooster, R. Stratton, M. R. and Weber, B. L.

- (2002). BRAF and RAS Mutations in Human Lung Cancer and Melanoma. *Cancer Res.*, 62: 6997-7000.
- Bulliard, J. L. (2000). Site-specific Risk of Cutaneous Malignant Melanoma and Pattern of Sun Exposure in New Zealand. *Int J Cancer*, 85:627–32.
- Busca, R. Abbe, P. Mantoux, F. Et al. (2000). Ras Mediates the cAMP-Dependent Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERKs) in Melanocytes. *EMBO J.*, 19:2900-2910.
- Carr, J. Mackie, R. M. (1994). Point Mutations in the N-ras Oncogene in Malignant Melanoma and Congenital Naevi. *Br J Dermatol.*, 131:72–77.
- Chan, A. S. Futreal, P. A. Stratton, M. R. Wooster, R. Leung, S. Y. (2002). Similarity of the Phenotypic Patterns Associated with BRAF and KRAS Mutations in Colorectal Neoplasia. *Cancer Research.*, 62:6451-6455.
- Clark, W. H. Jr Elder, D. E. Van Horn, M. (1986). The Biologic Forms of Malignant Melanoma. *Hum Pathol.*, 17:443-50.
- Cobb, M. H. (1999). MAP Kinase Pathways. *Prog Biophys Mol Biol.*, 71:479-500.
- Cohen, Y. Goldenberg-Cohen, N. Parrella, P. Chowers, I. Merbs, S. L. Pe'er, J. Sidransky, D. (2003). Lack of BRAF Mutation In Primary Uveal Melanoma. *IOVS.*, 44:2876-2878.
- Cohen, Y. Rosenbaum, E. Begum, S. Goldenberg, D. Esche, C. Lavie, O. Sidransky, D. and Westra, W. H. Exon 15 BRAF Mutations are Uncommon in Melanomas Arising in Nonsun-Exposed Sites. (2004). *Clinical Cancer Research.*, 10:3444-3447.
- Cowley, S. Paterson, H. Kemp, P. Marshall, C. J. (1994). Activation of MAP Kinase Kinase is Necessary and Sufficient for PC12 Differentiation and for Transformation of NIH 3T3 Cells. *Cell.*, 77:841-52.
- Crews, C. M. Alessandrini, A. Erikson, R. L. (1992). The Primary Structure of MEK, a Protein Kinase that Phosphorylates the ERK Gene Product. *Science.*; 258:478–80.
- Davies, H. Bignell, G. R. Cox, C. Stephens, P. Edkins, S. Clegg, S. Teague, J. Woffendin, H. (2002). Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer. *Nature Lond.*, 417:949-954,
- Daya-Grosjean, L. Dumaz, N. Srasin, A. (1995). The Specificity of P53 Mutation Spectra in Sunlight Induced Human Cancers. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 28:115-124.

- Dent, P. Haser, W. Haystead, T. A. Vincent, L. A. Roberts, T. M. Sturgill, T. W. (1992). Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase by v-Raf in NIH 3T3 Cells and in vitro. *Science.*, 257:1404 -7.
- Diaz, B. Barnad, D. Filson, A. Macdonald, S. King, A. and Marshall, M. (1997). Phosphorylation of Raf-1 Serine 338-Serine 339 is an Essential Regulatory Event for Ras-Dependent Activation and Biological Signalling. *Mol. Cell. Biol.*, 17:4509-4516.
- Dickson, B. and Hafen, E. (1994). Genetics of Signal Transduction in Invertebrates. *Curr Opin. Genet. Dev.*, 4:64-70.
- Dong, J. Phelps, R. G. Qiao, R. Yao, S. Benard, O. Ronai, Z. Aaronson, S. A. (2003). BRAF Oncogenic Mutations Correlate with Progression Rather than Initiation of Human Melanoma. *Cancer Res.*, 63:3883-5.
- Edmunds, S. C. Kelsell, D. P. Hungerford, J. L. Cree, I. A. (2002). Mutational Analysis of Selected Genes in the TGFbeta, Wnt, pRb, and p53 Pathways in Primary Uveal Melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 3:2845-2851.
- El Shabrawi, Y. Radner, H. Muellner, K. Langmann, G. Hoefler, G. (1999). The Role of UV-radiation in the Development of Conjunctival Malignant Melanoma. *Acta Ophthalmol Scand.*, 77:31-2.
- Elwood, J. M. (1996). Melanoma and Sun Exposure. *Semin Oncol.*, 23:650-66.
- Elwood, J. M. Jopson, J. (1997). Melanoma and Sun Exposure: an Overview of Published Studies. *Int J Cancer.*, 73:198-203.
- Garnett, M. J. and Marais, R. (2004). Guilty as Charged: B-RAF is a Human Oncogene. *Cancer Cell.*, 6:313-319.
- Ge, X. Fu, Y. M. Meadows, G. G. (2002). U0126, a Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Inhibitor, Inhibits the Invasion of Human A375 Melanoma Cells. *Cancer Lett.*, 179:133-40.
- Gill, M. Renwick, N. Silvers, D. N. Tok Çelebi, J. (2004). Lack of BRAF Mutations in Spitz Nevi. *The Journal of Investigative Dermatology.*, 1325-1326.
- Güneş, H. V. (2003). Moleküler Hücre Biyolojisi, Etam, *Kaan Kitabevi*, Eskişehir, s290-327.
- Halaban, R. (2000). The Regulation of Normal Melanocyte Proliferation. *Pigment Cell Res.*, 13:4-14.
- Hanahan, D. Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell.*, 100: 57.
- Herlyn, M. Salyamoorthy, K. (1996). Activated ras: Yet Another Player in

- Melanoma? *Am J Pathol.*, 149: 739.
- Holman, C. D. Armstrong, B. K. Heenan, P. J. (1986). Relationship of Cutaneous Malignant Melanoma to Individual Sunlight-exposure Habits. *J. Natl. Cancer Inst.*, 76:403–14.
- Hüser, M. Lockett, J. Chiloeches, A. Mercer, K. Iwobi, M. Giblett, S. Sun, X. M. Brown, J. Marais, R. Pritchard, C. (2001). MEK Kinase Activity is not Necessary for Raf-1 Function. *The EMBO Journal.*, 20:1940-1951.
- Jansen, H. W. Lurz, R. Bister, K. Bonner, T. I. Mark, G. E. Rapp, U. R. (1984). *Nature.*, 307:281–284.
- Jiveskog, S. Ragnarsson-Olding, B. Platz A, Ringborg, U. (1998). N-Ras Mutations are Common in Melanomas from Sun-exposed Skin of Humans but Rare in Mucosal Membranes or Unexposed Skin. *J Investig Dermatol.*, 111:757-61.
- Kandiloğlu, G., Gököz A. (1999). “Melanositik Tümörler”, XIV. Ulusal Patoloji Kongresi, İzmir, s. 1-12.
- Kimura, E. T. Nikiforova, M. N. Zhu, Z. Knauf, J. A. Nikiforov, Y. E. and Fagin, J. A. (2003). High Prevalence of BRAF Mutations in Thyroid Cancer: Genetic Evidence for Constitutive Activation of the RET/PTCRAS-BRAF Signaling Pathway in Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancer Res.*, 63:1454-1457.
- Klug, W. S. Cummings, M. R. (2003). Genetik Kavramlar (Öner, C.), *Palme Yayıncılık.*, Ankara, s636-638..
- Koh, H. K. Kligler, B. E. Lew, R. A. (1990). Sunlight and Cutaneous Malignant Melanoma: Evidence for and Against Causation. *Photochem Photobiol.*, 51:765-779.
- Koide, H. Satoh, T. Nakafuku, M. Y, Kaziro. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90:8683– 8686.
- Kolch, W. (2000). Meaningful Relationships: The Regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK Pathway by Protein interactions. *Biochem J.*, 351(Pt 2):289-305.
- Kortylewski, M. Heinrich, P. C. Kauffmann, M. E. Bohm, M. MacKiewicz, A. Behrmann, I. (2001). Mitogen-activated Protein Kinases Control p27/Kip1 Expression and Growth of Human Melanoma Cells. *Biochem J.*, 357:297-303.
- Kumar, R. Angelini, S. Czene, K. Sauroja, I. Hahka-Kemppien, M. Pyrhönen, S. et al. (2003). BRAF Mutations In Metastatic Melanoma: A Possible Association with Clinical Outcome. *Clin Cancer Res.*, 9:3362-3368.

- Kumar, V. Cotran, R. Robbins, S. L. (2000). Basic Pathology, W. B. Saunders Company, ISBN 0-7216-5122-4 (W.B.S.C., Philadelphia), s 61-101.
- Kyriakis, J. M. App, H. Zhang, X. F. Banerjee, P. Brautigan, D. L. Rapp, U. R. Avruch, J. (1992). Raf-1 Activates MAP Kinase-kinase. *Nature.*, 358:417-21.
- Lang, J. Boxer, M. MacKie, R. (2003). Absence of Exon 15 Germline Mutations in Familial Melanoma. *Hum Mutat.*, 21:327-330.
- Laud, K. Kannengiesser, C. Avril, M-F Chompret, A. Stoppa-Lyonnet, D. Desjardins, L. et al. (2003). BRAF as a Melanoma Susceptibility Candidate Gene? *Cancer Res.*, 63:3061–3065.
- Lenormand, P. Sardet, C. Pages, G. L’allemain, G. Brunet, A. Pouyssegur, J. (1993). Growth Factors Induce Nuclear Translocation of MAP Kinase (p42MAPK and p44MAPK) but not Their Activator MAP Kinase Kinase (p45MAPKK) in Fibroblasts. *J Cell Biol.*, 122:1079–88.
- Loewe, R. Kitler, H. Fischer, G. Fae, I. Wolff, K. Petzelbauer, P. (2004). BRAF Kinase Gene V599E Mutation In Growing Melanocytic Lesions. *J Invest Dermatol.*, 123:733-736.
- Maldonado, J. C. Fridlyand, J. Patel, H. Jain, A. N. Busam, K. Kageshita, T. Ono, T. Albertson, D. G. Pinkel, D. Bastian, B. C. (2003). Determinants of BRAF Mutations in Primary Melanomas. *Journal Of The National Cancer Institute.*, 95:1878-80.
- Maldonado, J. L. Timmerman, L. Fridlyand, J. Bastian, B. C. (2004). Mechanism of Cell-Cycle Arrest in Spitz Nevi with Constitutive Activation of the MAP-Kinase Pathway. *Am J. Pathol.*, 164:1783-1787.
- Mansour, S. J. Matten, W. T. Hermann, A. S. Candia, J. M. Rong, S. Fukasawa, K. Vande Woude, G. F. Ahn, N. G. (1994). Transformation of Mammalian Cells by Constitutively Active MAP Kinase Kinase. *Science.*, 265:966–70.
- Marais R. and Marshall C. J. (1996). Control of the ERK MAPK Kinase Cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv.*, 27:101-125.
- Marais, R. Light, Y. Paterson, H. F. Mason, C. S. and Marshall, C. J. (1997). Differential Regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by Oncogenic ras and Tyrosine Kinases. *J. Biol. Chem.*, 272:4378–4383.
- Marais, R. Light, Y. Paterson, H. F. and Marshall, C. J. (1995) Ras Recruits Raf-1 to the Plasma Membrane for Activation by Tyrosine Phosphorylation. *EMBO J.*, 14:3136-3145.
- Marshall, C. J. (1994). MAP Kinase Kinase Kinase, MAP Kinase Kinase and MAP

- Kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 4:82-89.
- Mason, C. J. Springer, C. J. Cooper, R. G. Superti-Furga, G. Marshall, C. J. and Marais, R. (1999). Serine and Tyrosine Phosphorylations Cooperate in Raf-1, but not B-Raf Activation. *EMBO J.*, 18:2137-2148.
- Mercer, K. E. Pritchard, C. A. (2003). Raf Proteins and Cancer: B-Raf is Identified as a Mutational Target. *Biochimica ve Biophysica Acta.*, 1653:25-40.
- Meyer, P. Klaes, R. Schmitt, C. Boettger, M. B. Garbe, C. (2003a). Exclusion of BRAF V599E as a Melanoma Susceptibility Mutation. *Int J Cancer.*, 106:78–80.
- Meyer, P. Sergi, C. Garbe, C. (2003b). Polymorphisms of the BRAF Gene Predispose Males to Malignant Melanoma. *J Carcinogenesis.*, 2:7.
- Muneer, S. (ed.). (2002). MAP Kinase and PP2A in Cancer Pathogenesis. (Dallas, TX:University of Texas Southwestern Medical Center).
- Noonan, F. P. Recio, C. A. Takayama, H. Duray, P. Anver, M. R. Rush, W. L. De Fabo, E. C. and Merlino, G. (2001). *Nature.*, 413:271-272.
- Nussbaum, R. L. McInnes, R. R. Willard H. F. (2005). Thompson&Thompson Tibbi Genetik, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara, s79-82;311-315.
- Omholt, K. Platz, A. Kanter, L. Ringborg, U. and Hansson, J. (2003). NRAS and BRAF Mutations Arise Early During Melanoma Pathonogenesis and are Preserved Throughout Tumor Progression. *Clinical Cancer Research.*, 9:6483-6488.
- Padua, R. A. Barrass, N. Currie, G. A. (1984). A Novel Transforming Gene in a Human Malignant Melanoma Cell Line. *Nature.*, 311:671–3.
- Palmedo, G. Hantschke, M. Rütten, A. Mentzel, T. Hügel, H. Flaig, M. J. Yazdi, A. S. Sender, C. A. Kutzner, H. (2004). The T1796A Mutation of the BRAF Gene is Absent in Spitz Nevi. *J. Cutan. Pathol.*, 31:266-270.
- Papp, T. Pemsel, H. Zimmermann, R. Bastrop, R. Weiss, D. G. Schiffmann, D. (1999). Mutational Analysis of the N-ras, p53, P16INK4, CDK4, and MC1R Genes in Human Congenital Melanocytic Naevi. *J. Med. Genet.*, 36:610-614.
- Papp, T. Schipper, H. Kumar, K. Schiffmann, D. and Zimmermann, R. (2005). Mutational Analysis of the BRAF Gene in Human Congenital and Dysplastic Melanocytic Naevi. *Lippincott Williams&Wilkins.*, 15:401-407.
- Peyssonnaud, C. Eychene, A. (2001). The Raf/MEK/ERK Pathway: New Concepts of Activation. *Biol Cell.*, 93:53-62.
- Pollock, P. M. Harper, U. L. Hansen, K. S. Yudt, L. M. Stark, M. Robbins, C. M. Moses, T. Y. Hostetter, G. Wagner, U. Kakareka, J. Salem, G. Pohida, T. Heenan, P.

- Duray, P. Kallioniemi, O. Hayward, N. K. Trent, J. M. Meltzer, P. S. (2003). High Frequency of BRAF Mutations in Nevi. *Nat. Genet.*, 33:19-20.
- Pritchard, C. A. Samuels, M. L. Bosch, E. and McMahon, M. (1995). Conditionally Oncogenic Forms of the A-Raf and B-Raf Protein Kinases Display Different Biological and Biochemical Properties in NIH 3T3 Cells. *Mol. Cell. Biol.*, 15:6430-6442.
- Rajagopalan, H. Bardelli, A. Lengauer, C. Kinzler, K. W. Vogelstein, B. and Velculescu, V. E. (2002). Tumorigenesis: RAF/RAS Oncogenes and Mismatch-repair Status. *Nature Lond.*, 418: 934.
- Rapp, U. R. Goldsborough, M. D. Mark, G. E. Bonner, T. I. Groffen, J. Reynolds Jr., F. H. Stephenson, J. R. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80 :4218-4222.
- Rizos, H. A. P. Darmanian, J. O. Indsto, J. A. Shannon, R. F. Kefford, G. J. Mann. *Melanoma Res.*, 9 (1999) 10-19.
- Saldanha, G. Purnell, D. Fletcher, A. Potter, L. Gillies, A. (2004). Pringle H. High BRAF Mutation Frequency Does not Characterize all Melanocytic Tumor Progression. *Int. J. Cancer.*, 111:705-710.
- Satyamoorthy, K. Li, G. Gerrero, M. R. Brose, M. S. Volpe, P. Weber, B. L. Van Belle, P. Elder, D.E. and Herlyn, M. Constitutive Mitogen-activated Protein Kinase Activation in Melanoma is Mediated by both BRAF Mutations and Autocrine Growth Factor Stimulation. *Cancer Res.*, 63: 756-759, 2003.
- Shinozaki, M. Fujimoto, A. Morton, P. L. Hon, D. S. B. (2004). Incidence of BRAF Oncogene Mutation and Clinical Relevance for Primary Cutaneous Melanomas. *Clinical Cancer Research.*, 10:1753-1757.
- Singer, G. Oldt, R III Cohen, Y. et al. (2003). Mutations in BRAF and KRAS Characterize the Development of Low-grade Ovarian Serous Carcinoma. *J Natl. Cancer Inst (Bethesda).*, 95:484-6.
- Smalley, K. Eisen, T. (2000). The Involvement of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in the Alpha-melanocyte Stimulating Hormone (alpha-MSH)-induced Melanogenic and Anti-proliferative Effects in B16 Murine Melanoma Cells. *FEBS Let.*, 476:198-202.
- Smalley, K. S. (2003). A Pivotal Role for ERK in the Oncogenic Behaviour of Malignant Melanoma? *Int. J. Cancer.*, 104: 527-532.
- Smalley, K. S. M. Eisen, T. (2002). Differentiation of Human Melanoma Cells Through p38 MAP Kinase is Associated with Decreased Retinoblastoma Protein

- Phosphorylation and Cell Cycle Arrest. *Melanoma Res.*, 12:187–92.
- Storm, S. M. Brennscheidt, U. Sithanandam, G. Rapp, U. R. (1990). *Crit Rev. Oncog.*, 2:1-8.
- Storm, S. M. Cleveland, J. L. Rapp, U. R. (1990). Expression of Raf Family of Proto-Oncogenes in Normal Mouse Tissues. *Oncogene.*, 5:345-351.
- Storm, S. M. Rapp, U. R. (1993). Oncogene Activation: c-raf-1 Gene Mutations in Experimental and Naturally Occurring Tumors. *Toxicol Lett.*, 67:201-10.
- Sutrave, P. Bonner, T. I. Rapp, U. R. Jansen, H. W. Patschinsky, Bister, T. K. (1984). *Nature.*, 309:85- 88.
- Traverse, S. Cohen, P. Paterson, H. Marshall, C. Rapp, U. and Grand, R. J. (1993). Specific Association of Activated MAP Kinase Kinase Kinase (Raf) with the Plasma Membranes of Ras-Transformed Retinal Cells. *Oncogene.*, 8:3175-3181.
- Treisman, R. (1994). Ternary Complex Factors: Growth Factor Regulated Transcriptional Activators. *Curr Opin Genet Dev.*, 4:96 –101.
- Tsao, H. Zhang, X. Fowlkes, K. Haluksa, F. G. (2000). Relative Reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 Alterations in Cutaneous Melanoma Cell Lines. *Cancer Res.*, 60:1800–4.
- Tüzün, Y. Kotoğyan, A. Aydemir, E. H. Baransu, O. (1994). Dermatoloji, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s17-28;610-615.
- Uribe, P. Wistuba, II Gonzales, S. (2003). BRAF Mutation a Frequent Event in Benign, Atypical, and Malignant Melanocytic Lesions of the Skin. *Am, J. Dermatopathol.*, 25:365-370.
- Van Aelst, L. Barr, M. Marcus, S. Polverino, A. Wigler, M. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90:6213-6217.
- Van Elsas, A. Zerp, S. van der Flier, S. Kruse-Wolters, M. Vacca, A. Ruiter, D. J. Schrier, P. (1995). Analysis of N-Ras Mutations in Human Cutaneous Melanoma: Tumour Heterogeneity Detected by Polymerase Chain Reaction/single-stranded Conformation Polymerism Analysis. *Rec Results Cancer Res.*, 139:57-67.
- Vojtek, A. B. Hollenberg, S. M. Cooper, J. A. (1993). *Cell*, 74:205-214.
- Warne, P. H. Viciara, P. R. Downward, J. (1993). *Nature.*, 364:352-355.
- Weinberg, R. A. (1989). Oncogenes, Antioncogenes and the Molecular Bases of Multistep Carcinogenesis. *Cancer Res.*, 49: 3713.
- Yazdi, A. S. Palmedo, G. Flaig, M. J. et al. (2003). Mutations of the BRAF Gene in Benign and Malignant Melanocytic Lesions. *J Invest Dermatol.*, 121:1160-1162,.

- Yuen, S. T. Davies, H. Chan, T. L. Ho, J. W. Bignell, G. R. Cox, C. Stephens, P. Edkins, S. Tsui, W. W. Zhang, B. H. and Guan, K. L. (2000). Activation of B-Raf Kinase Requires Phosphorylation of the Conserved Residues Thr598 and Ser601. *EMBO J.*, 19:5429-5439.
- Zhang, X. F. Settleman, J. Kyriakis, J. M. Takeuchi-Suzuki, E. Elledge, S. J. Marshall, M. S. Bruder, J. T. Rapp, U. R. Avruch, J. (1993). *Nature.*, 364:308-313.
- Zuo, L. Weger, J. Yang, Q. Goldstein, A. M. Tucker, M. A. Walker, G. J. Hayward, N. Dracopoli, N. C. (1996). *Nat. Genet.*, 12:97-99.

6. EKLER

EK 6.1

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-1-FOR

```
gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek-1-for          -----AAGATCAGTTTCTTTCTTCTCAACCTCA 27
                        *  **          *  *
gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek-1-for          GATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 87
*****
gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek-1-for          AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
147
*****
gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek-1-for          GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTCCACTGATTAATTTTGGCCAAA-----
* *  * * * *      * * * *      *  * *  * * * *  * * *
```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-2-FOR

```
gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek-2-for          -----AAGATATGTTTCTTTCTTCTCACCTCA 27
                        *  **          *  *
gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek-2-for          GATATATTTCTTC-TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 86
*****
gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek-2-for          AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
146
*****
gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek-2-for          GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTCCACTGATTAATTTTGGCCAA-----
* *  * * * *      * * * *      *  * *  * * * *  * * *
```

EK 6.2

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-3-FOR

```
gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek-3-for          -----TTTGATACGTT---TCTTTCTTCTA-----ACCTCAG----- 29
                        * * * * *      * * * * *      * * * * *
gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek-3-for          -ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 88
                        *****
gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek-3-for          AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
148
                        *****
gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek-3-for          GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTCCACTGATTAATTTTGGCCAA-----
192
                        * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *
```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-4-FOR

```
gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek-4-for          -----GGTGATTATGTCTTTCTTCTCT----AACCTC 27
                        * * * * *      * * * * *
gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek-4-for          AGATTATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 87
                        * *****
gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek-4-for          AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
147
                        *****
gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek-4-for          GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTCCACTGATTAATTTTGGCCAA-----
191
                        * * * * *      * * * * *      * * * * *      * * * * *
```

EK 6.3

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-6-FOR

```
gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek-6-for          -----AACAATATGTTTCTTACTTCTAC---CCTCAG----- 29
                          **  * **  * *      *      *      *      *
gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek-6-for          -ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 88
*****
gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek-6-for          AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
148
*****
gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek-6-for          GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTTCCACTGATTAATTTTTGGCCAA-----
* *  * * * *      * * * *      *      * *      * * * *      * * *
```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-7-FOR

```
gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek-7-for          -----AAGATACGTTTCTTTCTTCTCACCTCA 27
                          * * * *      * *      *
gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek-7-for          GATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 87
*****
gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek-7-for          AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
147
*****
gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek-7-for          GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTTCCACTGATTAATTTTTGGCCAA-----
* *  * * * *      * * * *      *      * *      * * * *      * * *
```

EK 6.4

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-8-FOR

gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek-8-for          -----AACGATACGTTTCTTCTTCTCACCTCA 28
                        **  ** *          **      *

gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek-8-for          GATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 88
                        *****

gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek-8-for          AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGCTGGATCCATTTTGTGGATG
148
                        *****

gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek-8-for          GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTCCACTGATTAATTTTGGCCAA-----
192
                        * *  **** *          * * * * *      *  ** *  *** * * *
```

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-10-FOR

gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek10for          -----NNNTTAAAANNNNNTTAAATATGTTTCTTACTACTACC 37
                        *          * * *          ** * * **

gi|33188458_62-2362      ---AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACA
1797
gi|4757867_62-2359      ---AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACA
1794
gi|ornek10for          CTCGATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACA 97
                        *****

gi|33188458_62-2362      GTGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGCTGGATCCATTTTGTGG
1857
gi|4757867_62-2359      GTGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGCTGGATCCATTTTGTGG
1854
gi|ornek10for          GTGAAATCTCGATGGAGCGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTCTGCTGGATCCATTTCTGTGG
157
                        *****

gi|33188458_62-2362      ATGGCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTA
1917
gi|4757867_62-2359      ATGGCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTA
1914
gi|ornek10for          ATCG-GTAAGAATTCG----AGGCTATTTTCCACCGATTAATTTTTCGGCCCANAN-
210
                        ** *  **** **          * * * * *      * * ** *  *** * * *
```


EK 6.6

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-13-FOR

gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359     GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek13for          -----NNAATTGATATGTTTCTTTATTCTAACCTCAG----- 32
                        *      * * * *      *
                        *      * * * *      *

gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359     AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek13for          -ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 91
                        *****

gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359     AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek13for          AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
151
                        *****

gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359     GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek13for          GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTTCCACTGATTAATTTTTGGCCANA-----
196
                        * *   * * * *   *      * * * *   *      * * * *   * * * *

* *   * * * *   *      * * * *   *      * * * *   * * * *
```

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-14-FOR

gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359     GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek14for          -----NNNNAACAATATGTTTCTTTATTCTACCCTCAG----- 33
                        ***      * * *      *****

gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359     AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek14for          -ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 92
                        *****

gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359     AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek14for          AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
152
                        *****

gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359     GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek14for          GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTTCCACTGATTAATTTTTGGCCAA-----
196
                        * *   * * * *   *      * * * *   *      * * * *   * * * *

* *   * * * *   *      * * * *   *      * * * *   * * * *
```

EK 6.7

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-15-FOR

```
gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek15for           -----NNNAAAGATATGTTTCTTTCTACTAACCTCAG----- 32
                               *      * *      *      *      *      *
gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek15for           -ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 91
*****
gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek15for           AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
151
*****
gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek15for           GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTCCACTGATTAANTTTTGGCCAA-----
195
* *   * * * *   *   * * *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-16-FOR

```
gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek16for           -----NNAAAGGGATCATGTTTCTTACTACTAACCTCA-- 33
                               **      * * * *      * *      *
gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek16for           GATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 93
*****
gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek16for           AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
153
*****
gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek16for           GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTCCACTGATTAANTTTTGGCCAA-----
197
* *   * * * *   *   * * *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
```

EK 6.8

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-17-FOR

gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359     GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek17for          -----NNNNAAAAATTTGTTTCTTTCTTCTACA----CCTCAG----- 34
                        * *           ** * * * * *          *****

gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359     AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek17for          -ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 93
*****

gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359     AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek17for          AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGAT-
152
*****

gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAG-TCAGATGTATA
1919
gi|4757867_62-2359     GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAG-TCAGATGTATA
1916
gi|ornek17for          ----CGGTAAGAATTCGAGGCTATTTTCCACTCGATTAATTTTATAGCCACA-----
202
                * * *   * * *   *   *   * * * * *   *   * * * * *   * * *
```

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-19-REV

gi|33188458_62-2362      CTCCATATCATTGAGACCAAATTTGAGATGATCAAACCTATAGATATTGCACGACAGACT
1680
gi|4757867_62-2359     CTCCATATCATTGAGACCAAATTTGAGATGATCAAACCTATAGATATTGCACGACAGACT
1677
gi|ornek19rev          -----TNTTT 5
                        *

gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAG-TCAATCATCCACAGAGACCT--CAAGAGT
1737
gi|4757867_62-2359     GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAG-TCAATCATCCACAGAGACCT--CAAGAGT
1734
gi|ornek19rev          TCATAATGCCTTCTCTGATAGGAAAATGAGATCTACTGTTTTCCTTTACTTACTACGCCT 65
*****

gi|33188458_62-2362      AATAATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACA
1797
gi|4757867_62-2359     AATAATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACA
1794
gi|ornek19rev          CGAGATATATTTCTTCGTGAAGACCTCACGGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACA
125
*****

gi|33188458_62-2362      GTGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGG
1857
gi|4757867_62-2359     GTGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGG
1854
gi|ornek19rev          GTGAAATCTCGATGGAG-----
142
*****
```


EK 6.9

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-20-FOR

```
gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek20for           -----NNNNAAAAATTAGTTTCTTTCTTCTAACCCTCA 32
                               **  **          **   *

gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek20for           GATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 92
*****

gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek20for           AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
152
*****

gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek20for           GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTCCACTGATTAATTTTGGCCAA-----
* *  * * * *      * * * * *      *  ** *  * * *  * * *
```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-21-FOR

```
gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek21for           -----NNNNTTTGATATGTT---TCTTTCTTCTA-----ACCTCAG----- 33
                               * * * *      ** ** * *      * * * *

gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek21for           -ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 92
*****

gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek21for           AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
152
*****

gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek21for           GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTCCACTGATTAATTTTGGCCAA-----
* *  * * * *      * * * * *      *  ** *  * * *  * * *
```


EK 6.11

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-24-FOR

gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek24for           -----NNNTTAGGAATATGTT---TCTTCTCTTCTACA----CCTCAG----- 35
                        ***  * * *      ** * * * * *      *****

gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek24for           -ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 94
                        *****

gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek24for           AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
154
                        *****

gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek24for           GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTCCACTGATTAATTTTGGCCA-----
197
                        * *  **** *      * * * * *      *  ** *  *** * * *


```

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-26-FOR

gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek26for           NNNNGGAAATAGTTTTCTT-----TCTTCTAC----CCTCAG----- 43
                        **  ** * * * * *      ** * * *      *****

gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek26for           -ATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
102
                        *****

gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek26for           AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
162
                        *****

gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek26for           GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTCCACTGATTAATTTTGGCCAAA-----
207
                        * *  **** *      * * * * *      *  ** *  *** * * *


```


EK 6.13

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ÖRNEK-30-FOR

gi|33188458_62-2362      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1740
gi|4757867_62-2359      GCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAAT
1737
gi|ornek30for           -----NNNNAATGCATCTGTTTCTTACTACTC---ACCTCA 33
                        * * *** * * *** *

gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|ornek30for           GATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG 93
                        *****

gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|ornek30for           AAATCTCGATGGAGAGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTCGTCTGGATCCATTTTCGTGGATC
153
                        *****

gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|ornek30for           G-GTAAGAATTCG-----AGGCTATTTTCCACCGATTAATTTTGGCCAAA-----
200
                        *   *** *   * * * *   * * * *   * * * *   * * * *
```

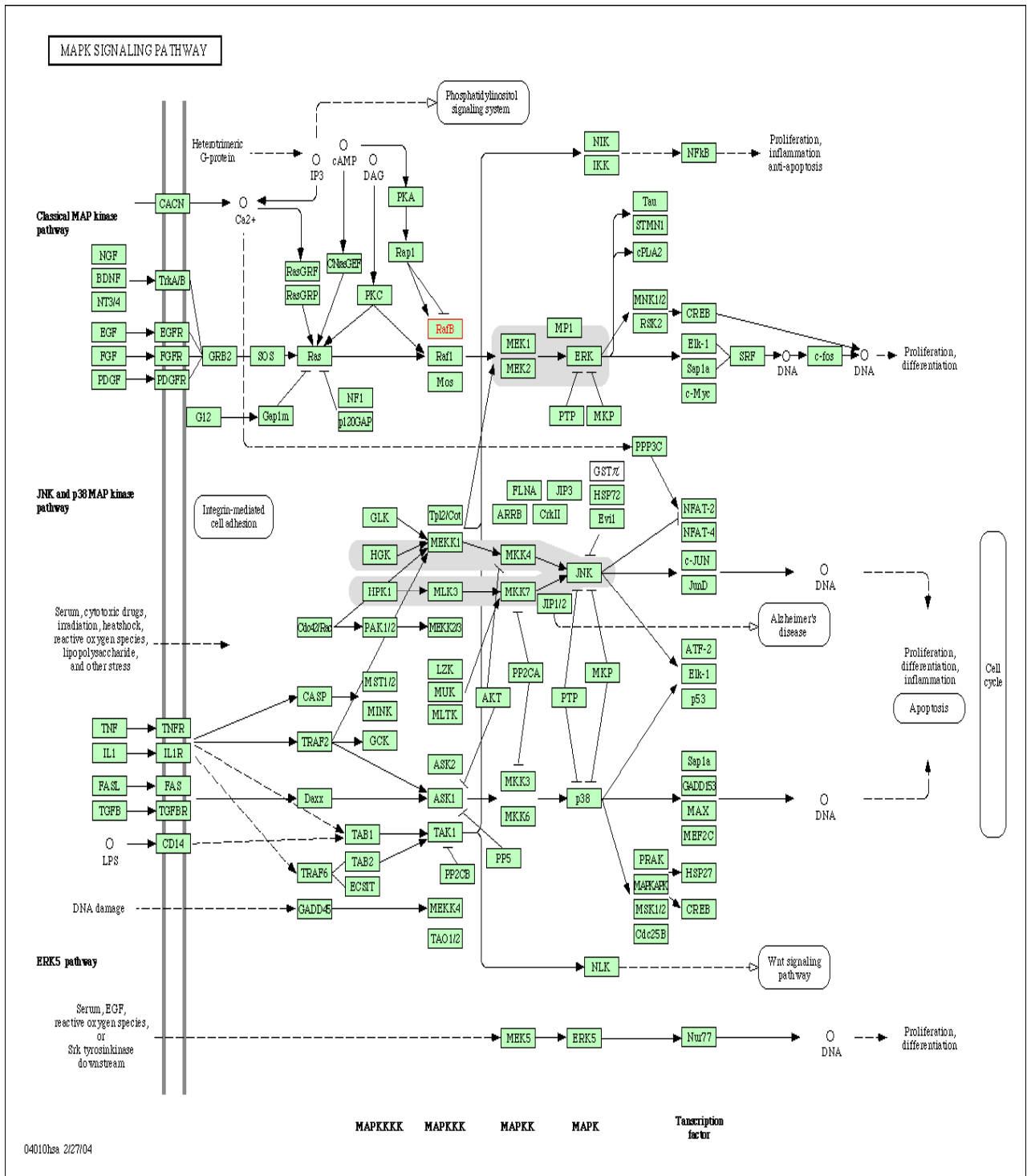
```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment POZİTİF KONTROL-FOR

gi|33188458_62-2362      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1800
gi|4757867_62-2359      AATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTG
1797
gi|+kontrolfor         GATATATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAG 94
                        *****

gi|33188458_62-2362      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1860
gi|4757867_62-2359      AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
1857
gi|+kontrolfor         AAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATG
154
                        *****

gi|33188458_62-2362      GCACCAGAAGTCATCAGAAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1920
gi|4757867_62-2359      GCACCAGAAGTCATCAGAAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCAGATGTATAT
1917
gi|+kontrolfor         GTA--AGAATT-----GAGGCTATTTTCCACTGATTAATTTTGGCCAA-----
198
                        * *   *** *   * * * *   *   ** *   *** * * *
```

EK 6.14



ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Denizli`de doğdu. İlk ve orta öğrenimini sırasıyla Hürriyet İlkokulu ve Atatürk Orta Okulu`nda yaptı. Lise öğrenimini Denizli Lisesin`de tamamladıktan sonra, 1999 yılında Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü`nde lisans öğrenimine başladı.

2003 yılında Biyoloji Bölümü`nden mezun olduktan sonra, aynı yıl Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı`nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen bu bölümde yüksek lisans çalışmalarına devam etmektedir.