



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRİMER VE METASTATİK MELANOM HÜCRE
HATLARINDA HOTSPOT MUTASYONLARIN
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Canan DOĞAN

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2022

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRİMER VE METASTATİK MELANOM HÜCRE
HATLARINDA HOTSPOT MUTASYONLARIN
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Canan DOĞAN

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

**Bu araştırma; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Birimi tarafından 18 no'lu proje ile
desteklenmiştir.**

Ankara, 2022

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Primer ve Metastatik Melanom Hücre Hatlarında Hotspot Mutasyonların Karşılaştırılması

Canan Doğan

Yüksek Lisans Tezi

24.03.2022

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER
Prof. Dr. Aslıhan GÜRBÜZ
Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Doç. Dr. Fatma Elif KILINÇ
Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Ankara, 2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.
24/03/2022

Canan DOĞAN



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca deneyimleri, bilgisi, hoşgörüsü ve sabrıyla her daim yanımda olan, desteğini asla esirgemeyen, çok değerli hocam Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK'e en derin minnet ve teşekkürlerimi sunarım. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Ahmet ÇARHAN'a, eğitimim süresince desteğini hissettiğim sayın hocam Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER'e ve Doç. Dr. Mustafa Emre ERCİN'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans eğitimim ve tez dönemim süresince birlikte çalıştığım, deneyimlerini ve desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Beyza Ecem ÖZ BEDİR, Arş. Gör. Elif ERCAN, Arş. Gör. Dr. Emine TERZİ, Arş. Gör. Tuğba Kevser UYSAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca kıymetli hocam Dr. Ferda ALPARSLAN PINARLI'ya meslek hayatıma ve bana kazandırdığı değerler ile tez çalışmamdaki görüşleri ve desteği için teşekkür ederim. Bölüm arkadaşım Dr. İbrahim KARAKUŞ'a tezim boyunca sunduğu değerli görüşleri ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

18 no'lu proje ile yüksek lisans tezime destek veren Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi'ne teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana eğitimin önemini ve gerekliliğini öğreten ve bu yolda bana her daim güvenen, inanan, desteğini, emeğini sunan aileme sonsuz sevgilerimi ve minnet dolu teşekkürlerimi sunarım. Her olumsuz halimde yüzümü güldüren, bana ışık olan canım yeğenim Sarp'a ve canım kardeşlerime ayrıca teşekkür ederim. Yüksek lisans çalışmam boyunca yanımda olan, değişken ruh hallerimi göğüsleyen eşime sabrından ve desteğinden dolayı yürekten teşekkür ederim. Tez yazımına başladığım zamanlarda gelişiyse hayatıma güneş olan ve tezimi bitirmem için bana umut olan biricik kızım Karen'e teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Karsinogenez.....	4
2.1.2. Kanserin Hücre Döngüsü ile İlişkisi.....	6
2.1.3. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri	8
2.1.4. Kanser Genetiği ve Mutasyonlar	19
2.2. Kanser Türleri.....	23
2.3. Cilt Kanseri Türleri ve Melanom.....	24
2.3.1. Malign Melanom	27
2.3.2. Melanomda Tanı Yöntemleri	29
2.3.3. Melanom Evrelendirme	32
2.3.4. Melanom Metastazı	34
2.3.5. Melanom Genetiği	35
2.3.5.1. Yüksek Penetrans Genleri.....	36
2.3.5.2. Orta Penetrans Genleri	37
2.3.5.3. Düşük Penetrans Genleri	37
2.3.5.4. Ailevi Melanom Mutasyonları ve Diğer Kanseri Riski.....	37
2.3.6. Melanom Epidemiyolojisi.....	40
2.3.7. Melanom Risk Faktörleri	44
2.4. Kanseri Tanısında Kullanılan Metotlar	46

2.4.1 Yeni Nesil Dizileme	47
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	49
3.1. Materyal	49
3.1.1. Yeni Nesil DNA Dizileme	51
3.2. Yöntem.....	51
3.2.1. Hücre Kültürü.....	51
3.2.2. Hücre Hattının Pasajlanması	53
3.2.3. Hücre Lizatı Hazırlama	53
3.2.4. DNA İzolasyonu.....	54
3.2.5. Hotspot Panel Dizileme	55
3.2.6. Veri Analizi.....	58
4. BULGULAR.....	60
5. TARTIŞMA.....	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68
7. KAYNAKLAR.....	70
8. EKLER	83
EK-1. Özgeçmiş.....	83

ÖZET

Primer ve Metastatik Melanom Hücre Hatlarında Hotspot Mutasyonların Karşılaştırılması

Melanom, cildin yüzeyinde derinin pigment üreten hücreleri olan melanositlerde başlayan bir kanser tipidir. Bu hastalığın genetik temelini oluşturan değişikliklerin çoğu, melanositlerde rastgele elde edilen mutasyonlar olarak meydana gelmekte ve genomik değişikliklerin birikmesi, melanom gelişimine, ilerlemesine ve evrimine katkıda bulunmaktadır.

Çalışmamızda WM115/Primer Melanom ve SK-MEL30/Metastatik Melanom hücre hatlarındaki hotspot mutasyonların Ion Ampliseq Cancer Hotspot DNA Panel v2 gen paneli kullanarak, çoğu insan kanseriyle ilişkili 50 gendeki (*ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, EZH2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAS, GNAQ, HNF1A, HRAS, IDH1, JAK2, JAK3, IDH2, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53, VHL*) değişikliklerini tespit etmeyi amaçladık.

WM115/Primer Melanom hücre hattında 9 adet mutasyon SK-MEL30/Metastatik Melanom hücre hattında ise primer melanom hattından farklı olarak 26 adet mutasyon saptadık. Primer Melanom hücre hattı ile Metastatik Melanom hücre hattı arasında mutasyon artışının olması ve özellikle bu mutasyonların RET sinyal iletim yolağında *MET* geninde 7 adet, Notch sinyal iletim yolağında *NOTCH1* geninde 4 adet RET sinyal iletim yolağında *PIK3CA* geninde 3 adet olmasının, Malign Melanom metastazında bunların etkin yollar olduğu ve bu mutasyonların özellikle ilgili yollarındaki genlerde birikmesi nedeniyle metastazın gelişmesine katkı sağladığını düşündürmüştür. Bu bulgular göz önüne alındığında, ileri evre Metastatik Melanom tedavisinde bu yolların seçilmesi hedefe yönelik tedavi açısından önemli bir tedavi alternatifi olabilir.

Anahtar Kelimeler: Melanom, *met*, *notch*, *pik3ca*, *sk-mel30*, *wm115*

ABSTRACT

Comparison of Hotspot Mutations in Primary and Metastatic Melanoma Cell Lines

Melanoma is a type of cancer that begins in the melanocytes, the pigment-producing cells of the skin, on the surface of the skin. The mechanisms leading to malignant transformation of melanocytes and melanocytic lesions are a complex interaction of environmental and genetic factors. Most of the changes that underlie the genetic basis of this disease occur as randomly acquired mutations in melanocytes, and the accumulation of genomic changes contributes to the development, progression and evolution of melanoma.

In our study, hotspot mutations in WM115/Primary Melanoma and SK-MEL30/Metastatic Melanoma cell lines were examined using the Ion Ampliseq Cancer Hotspot DNA Panel v2 gene panel and we aimed to detect variations in 50 genes (*ABL1*, *AKT1*, *ALK*, *APC*, *ATM*, *BRAF*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CSF1R*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB4*, *EZH2*, *FBXW7*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FLT3*, *GNA11*, *GNAS*, *GNAQ*, *HNF1A*, *HRAS*, *IDH1*, *JAK2*, *JAK3*, *IDH2*, *KDR*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *MLH1*, *MPL*, *NOTCH1*, *NPM1*, *HRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *PTEN*, *PTPN11*, *RB1*, *RET*, *SMAD4*, *SMARCB1*, *SMO*, *SRC*, *STK11*, *TP53*, *VHL*), most of which are associated with human cancer.

We detected 9 mutations in the WM115/Primary Melanoma cell line and 26 mutations in the SK-MEL30/Metastatic Melanoma cell line, unlike the primary melanoma line. We also detected increase in the number of mutations in the Primary Melanoma cell line and the Metastatic Melanoma cell line including 7 in the RET signal transduction pathway, *MET* gene, 4 in the Notch Signal Transmission Pathway, *NOTCH1* gene, and 3 in the RET Signal Transmission Pathway, *PIK3CA* gene.

These results suggest that these pathways are crucial in malignant melanoma metastasis and the identified mutations contribute to the development of metastasis, especially because of the accumulation of genes in the relevant pathways. In conclusion, choosing these pathways in the treatment of advanced metastatic melanoma may be a novel treatment alternative in terms of targeted therapy.

Keywords: Melanoma, *met*, *notch1*, *pik3ca*, sk-mel30, wm115

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AJCC	: Amerikan Ortak Kanser Komitesi
CDK	: Siklin Bağımlı Kinazlar
CDK4	: Sikline Bağımlı Kinaz 4
CDKN2A	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ESM	: Ekstrasellüler Matriks
GWAS	: Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
MITF	: Melanosit İndükleyen Transkripsiyon Faktörü
MLPA	: Multipleks Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
NMSC	: Melanom Dışı Cilt Kanseri
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
TDS	: Toplam Dermoskopik Skor
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TNM	: Tümör-Nod-Metastaz
UVR	: Ultraviyole Radyasyon
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal hücrelerin ve kanser hücrelerinin yapıları	3
Şekil 2.2. Çok aşamalı karsinogenez modeli ve metastaz süreci. MMP; matriksmetaloproteinaz, L: lenfosit, NK: naturel killer hücre, M: Mekanik faktörler, T: Trombosit, A: Adezyon molekülü.	5
Şekil 2.3. Hücre döngüsü ve kanserle ilişkisi	6
Şekil 2.4. Kanser karakteristik özellikleri	9
Şekil 2.5. Kanser ve metastaz: Hücre adezyon molekülleri ve hücreler arası bağlantıların önemi	17
Şekil 2.6. Deri anatomisi.....	26
Şekil 2.7. ABCD Kuralı: Kanser işareti taşıyan ve taşımayan nevi.....	30
Şekil 3.1. Konflüent olan hücreler (A. WM115 Primer melanom hücreleri B. SK-MEL30 metastatik melanom hücreleri.).	52

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2006 yayın patolojisi ve genetiğinde listelenen melanom alt tipleri	29
Tablo 2.2. Melanoma yatkınlık genleri ve diğer kanserlerle ilişkileri	41
Tablo 2.3. Melanom insidansının yaş ve cinsiyet dağılımı	43
Tablo 2.4. Melanoma bağlı mortalitenin yaş ve cinsiyet dağılımı.....	43
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları.....	49
Tablo 3.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal malzemeler.	49
Tablo 3.3. Kullanılan sarf malzemeler.	50
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan cihazlar ve ekipmanlar.	50
Tablo 3.5. Yeni nesil dizileme için kullanılan kitler.	51
Tablo 3.6. Yeni nesil dizileme için kullanılan cihazlar.....	51
Tablo 4.1. WM115 Primer Melanom Hücre Hattında Tespit Edilen Hotspot Mutasyonlar.	61
Tablo 4.2. SKMEL30 Metastatik Melanom Hücre Hattında Tespit Edilen Hotspot Mutasyonlar.	62

1. GİRİŞ

Kanser, bir organizmadaki hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla karakterize edilen, komşu dokuları istila edebilme veya yakın-uzak mesafelere yayılabilme özelliğine sahip anormal hücre çoğalmasına ve birikmesine yol açan bir hastalıktır (1). Mutasyonların DNA dizisini değiştirmesi tüm kanserlerin sebebi olarak kabul edilmektedir (2). Kanser multifaktöriyel olup, çalışma alanlarında doğal olarak bulunan kimyasallar (asbest lifleri, kurum ve katran, arsenik, benzen vb.), ultraviyole radyasyon (UVR), bazı virüs ve bakteriler (EBV, HPV, HBV, HCV, HTLV1, HHV8, *Helicobacter pylori* vb.), beslenme biçimi, sigara, alkol gibi birçok sebep kanserojen olarak gösterilmiştir (3).

Kötü huylu bir tümör, olduğu bölgede primer (orijinal, birincil) tümör olarak adlandırılmaktadır. Primer tümörden ayrılıp çeşitli yollarla vücudun diğer bölgelerine yayılarak oluşan yeni tümörlere metastatik (ikincil) tümör denir. Metastatik tümörler, primer tümörle aynı kanser türündedir (4).

Kanser insidansı değişik popülasyonlar arasında ve aynı popülasyon içinde farklı çevrelerde belirgin farklılıklar göstermektedir (1). Fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik etkenler, beslenme, fiziksel aktivite ve genetik kanser insidansını değiştiren faktörlerdir (5). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) dünyadaki coğrafi değişkenliğe odaklı ve Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın (IARC) bir parçası olan Globocan veri tabanına göre 2018 yılında 18,1 milyon yeni kanser vakası (melanom dışı cilt kanseri hariç 17,0 milyon) ve 9,6 milyon kanser ölümü (melanom dışı cilt kanseri hariç 9,5 milyon) tahmin edilmektedir. Kanserde benzer seyir devam ettiği takdirde 2030 yılına gelindiğinde yıllık 22 milyon yeni vaka ortaya çıkması beklenmektedir (6). İnsan vücudunu etkilediği bilinen 100'den fazla kanser türü bulunmaktadır (7).

Tüm kanser türleri içinde %10'luk bir dilime sahip olan melanom dünyada ciddi bir sağlık sorunu olarak görülmektedir. (8). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) her yıl

100.000'in üzerinde insana cilt kanseri tanısı konduğunu bildirmektedir. Tüm dünyada oluşma sıklığı en hızlı artan kanser türlerinden biridir (9).

Melanom, cildin yüzeyinde derinin pigment üreten hücreleri olan melanositlerde başlayan bir kanser tipidir. Melanositler, derinin üst katmanına yerleşmiş, deriye rengini veren pigmentleri üreten hücrelerdir (10). Melanositlerin ve melanositik lezyonların kötü huylu dönüşümüne yol açan mekanizmalar, çevresel ve genetik faktörlerin karmaşık bir etkileşimidir (11). Bu hastalığın genetik temelini oluşturan değişikliklerin çoğu, melanositlerde rastgele elde edilen mutasyonlar olarak meydana gelmekte ve genomik değişikliklerin birikmesi, melanom gelişimine, ilerlemesine ve evrimine katkıda bulunmaktadır (12).

Bazı DNA dizilerinde mutasyona uğrama olasılıkları diğerlerine göre daha yüksek olan noktalar vardır ve bu noktalarda bulunan mutasyonlara hotspot mutasyon denir (13).

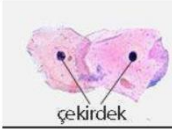
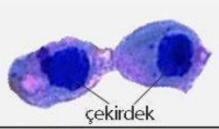
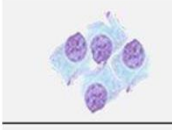
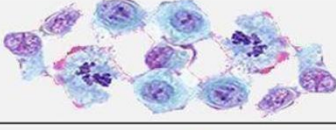
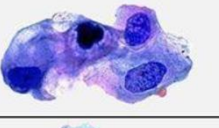
Çalışmamızda WM115 primer ve SK-MEL metastatik melanom hücre hatlarındaki hotspot mutasyonların Ion Ampliseq Cancer Hotspot DNA Panel v2 gen paneli kullanarak, çoğu insan kanseriyle ilişkili 50 gendeki değişikliklerin tespiti sağlanmıştır. Bu genler: *ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, EZH2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAS, GNAQ, HNF1A, HRAS, IDH1, JAK2, JAK3, IDH2, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53, VHL*.

Kullandığımız Hotspot DNA paneli, belirli bir kanser veya tümörün genetik bilgilerini (somatik mutasyonları) belirlemek için kullanılmakta olup en uygun tedavi planını ve genetik danışmanlığı da sunabilmektedir (14). Biz de çalışmamızda bu mutasyon panelini kullanarak, WM115 Primer Melanom Hücre hattı ile SK-MEL Metastatik Melanom Hücre hattı arasındaki somatik mutasyon farklılıklarının hangi genlerde ve hangi hücre yollarında etkili olduğunu araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, köken aldığı hücre tipine ve her bir kanser türünde meydana gelen genetik değişimlere bağlı olarak farklı biyolojik ve klinik özellik gösteren, 100'den fazla farklı hastalığı kapsayan bir olgudur (15). İnsan vücudunu oluşturan hücreler, vücudun ihtiyaç duyduğu şekilde yeni hücreler oluşturmak için büyümekte ve bölünmektedirler. Genellikle, hücreler çok yaşlandıklarında veya hasar gördüklerinde ölmekte ve yerlerini yeni hücreler almaktadır. Genetik değişiklikler yani mutasyonlar bu düzenli sürece müdahale ettiğinde kanser başlamaktadır. Hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalarak tümör adı verilen bir kitle oluşturmaktadır. Bir tümör kanserli veya iyi huylu olabilmektedir. Kanserli bir tümör kötü huyludur (malign), yani vücudun diğer bölgelerine yayılabilmekte ve büyüyebilmektedir. İyi huylu bir tümör (benign), tümörün büyüyebileceği ancak yayılmayacağı anlamına gelmektedir (16). Normal hücreler ve dokular, orijinal büyüklük ve yapılarını korurken kanser hücreleri çeşitli yapılarda ve agresif bir tablo çizmektedir (17) (Şekil 2.1).

Normal Hücre	Kanser Hücresi	Farkları
		Çok daha büyük ve farklı şekillerde hücre çekirdeği
		Çok sayıda bölünen hücre ve düzensiz hücre dizilimleri
		Hücre boyutu ve şeklinde farklılıklar, hücre içindeki organellerde şekil bozukluğu
		Normal özelliklerin kaybı

Şekil 2.1. Normal hücrelerin ve kanser hücrelerinin yapıları (18).

“Benign” Latince benignus kelimesinden gelir ve zararsız demektir. İyi huylu bir tümör, iyi farklılaşmış, invaziv olmayan dokunun lokalize bir büyümesi anlamına gelmektedir. İnvaziv olmayan dokunun büyümesi, o dokunun genişlemesine ve aynı zamanda bitişik normal dokuların sıkışmasına neden olabilmektedir. İyi huylu neoplazmalar genellikle çok yavaş büyümekte, yayılmamakta ve genellikle hayati bölgelere ciddi şekilde müdahale etmemektedir. Bu nedenle yaşamı tehdit etmemektedirler (19).

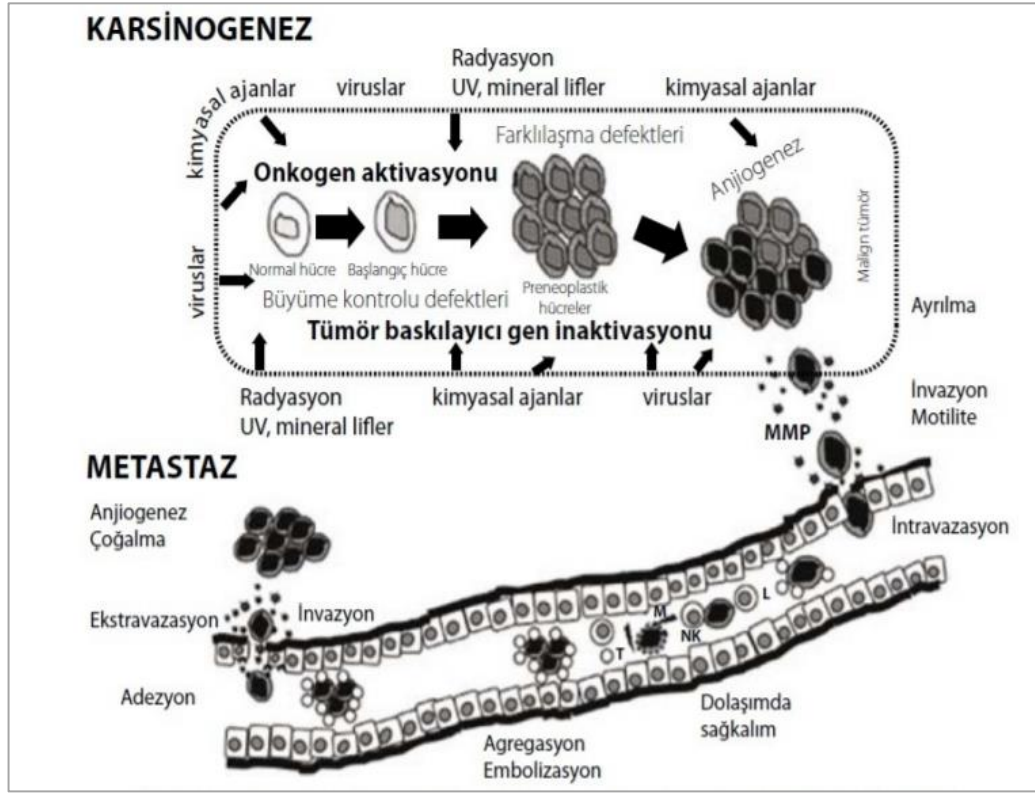
"Malign", Latince malignus kelimesinden gelmektedir ve anlamı kötü huylu demektir. Kötü huylu tümörler hızla büyümesi ve lokal yayılımı ile karakterizedir. Bazı kötü huylu tümörlerde görülen nekroz alanları, muhtemelen kanserli dokunun mevcut kan kaynağını aşacak kadar hızlı büyüdüğünü göstermektedir. Kötü huylu büyüme düzensizdir ve bu tür neoplazmalar, kan ve / veya lenfatik dolaşım yoluyla komşu dokulara uzanarak veya uzak bölgelere metastaz yoluyla yayılabilmektedir (19).

Kanser riski değişik popülasyonlar arasında ve aynı popülasyon içinde farklı çevrelerde belirgin farklılıklar göstermektedir (20). Fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik etkenler, beslenme, fiziksel aktivite ve genetik kanser insidansını değiştiren faktörlerdir (5).

2.1.1. Karsinogenez

Karsinogenez bir tümörün başlangıcını ve tümör oluşumunun sürdürülmesini ve sonraki evrimini tanımlamaktadır (21) (Şekil 2.2). Karsinogenez; kimyasal, fiziksel, biyolojik veya genetik değişimlerin herhangi birinin veya bunların kombinasyonunun hücrelere etkisinden kaynaklanabilmektedir. Karsinogenez süreci çok basamaklıdır ve şu şekilde gruplandırılmaktadır (22):

1. Başlangıç
2. Gelişme
3. İlerleme
4. İnvazyon ve Metastaz



Şekil 2.2. Çok aşamalı karsinogenez modeli ve metastaz süreci (23). MMP; matriksmetaloproteinaz, L: lenfosit, NK: naturel killer hücre, M: Mekanik faktörler, T: Trombosit, A: Adezyon molekülü.

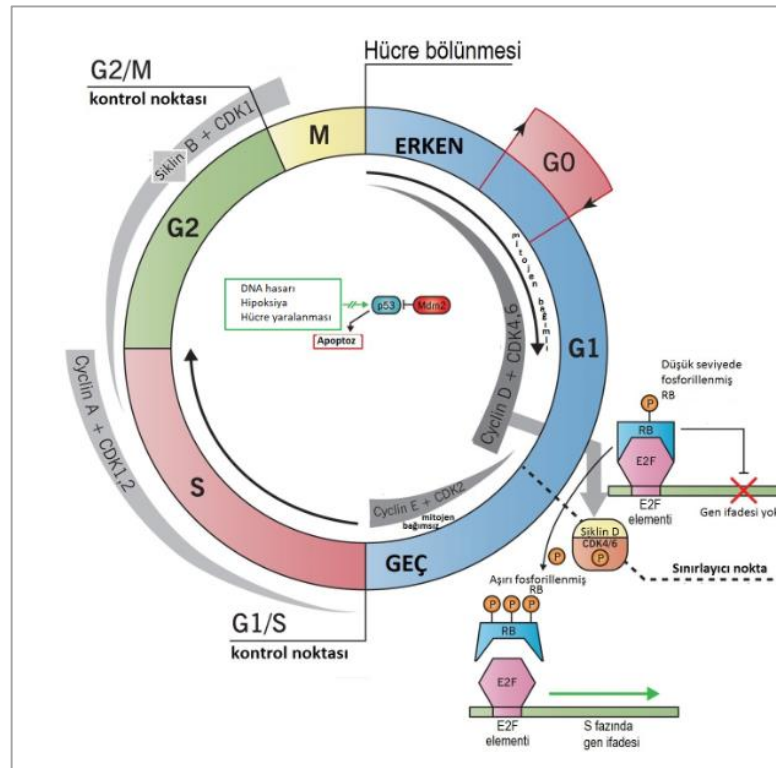
Başlangıç aşaması genetik değişikliklerden kaynaklanmaktadır ki bunlar bir veya daha fazla basit mutasyonlar, translokasyonlar, transversiyonlar, transisyonlar ve delesyonlardır. Bu genetik değişiklikler geri dönüşümsüzdür. Germline veya somatik hücrelerde meydana gelmektedir. Gelişme aşaması promotör-reseptör etkileşimleri aracılığıyla gerçekleşen genom ekspresyonunu içeren tersinir kısımdır. Epigenetik değişiklikler bu aşamada meydana gelmektedir. Hücre popülasyonları promotörlerle daha hızlı büyüyen küçük ve benign tümör grupları haline dönüşmektedir (22).

Karsinogenezin geri dönüşümsüz basamağı olan ilerleme aşamasında, karyotipik dengesizlikler ve kontrolsüz büyüme karakterizedir. Bu aşamada genetik mutasyonlar devam etmekte, karsinogenlerin de etkisiyle ilave spontan mutasyonlar gelişmektedir. Hücre kanserleşmiş yani çoğalma kabiliyetini kazanmış, farklı genotipik özelliklere sahip, metastatik bir hücredir. Son aşamada malign hücre çevre

dokulara saldırmak için yeterli genetik değişikliklere sahiptir ve çevresindeki hücrelerle olan adezyonunu kaybedip hareket kabiliyeti kazanmıştır. Metastatik bu süreç farklı birçok aşamadan oluşmaktadır (22). Karsinogenez aşamaları sırasında, maligniteye sebep olan, apoptoza neden olmayan genetik hasarların başlıca hedefi; protoonkogenler, hücresel onkogenler, tümör baskılayıcı genler, apoptozu düzenleyen ve DNA hasar onarımında rol oynayan genlerdir (24).

2.1.2. Kanser Hücresel Döngüsü ile İlişkisi

İnsan vücudundaki hücrelerin çoğu döngüsel değildir, mitoz sonrası evrede beklemektedir. Hücrelerin az sayıda bir bölümü aktif olarak çoğalmaktadır ve bunlar esas olarak epitel ve kemik iliği gibi kendi kendini yenileyen dokuların kök hücre odaklarındadır (karaciğer, bağırsak, deri, kemik iliği, vs.). Hücre döngüsünün bozulması, kanseri karakterize eden anormal hücre çoğalmasının nedenlerinden biri olup, hücre döngüsü kontrol noktası kontrolünün kaybı ve genetik istikrarsızlığı desteklemektedir (25, 26) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Hücre döngüsü ve kanserle ilişkisi (26'dan uyarlanmıştır).

Tümör oluşumu için çok çeşitli fonksiyonlara sahip olan çoklu genlerin ekspresyonunda, mutasyonların ve epigenetik anormalliklerin gerekliliği bilinmektedir. Bu genlerin önemli bir grubu, hücre döngüsündeki olayların sırasını sağlayan ve DNA onarımını hücre döngüsü ilerlemesiyle bütünleştiren kontrol pozisyonları olan hücre döngüsü kontrol noktalarında yer alır (27).

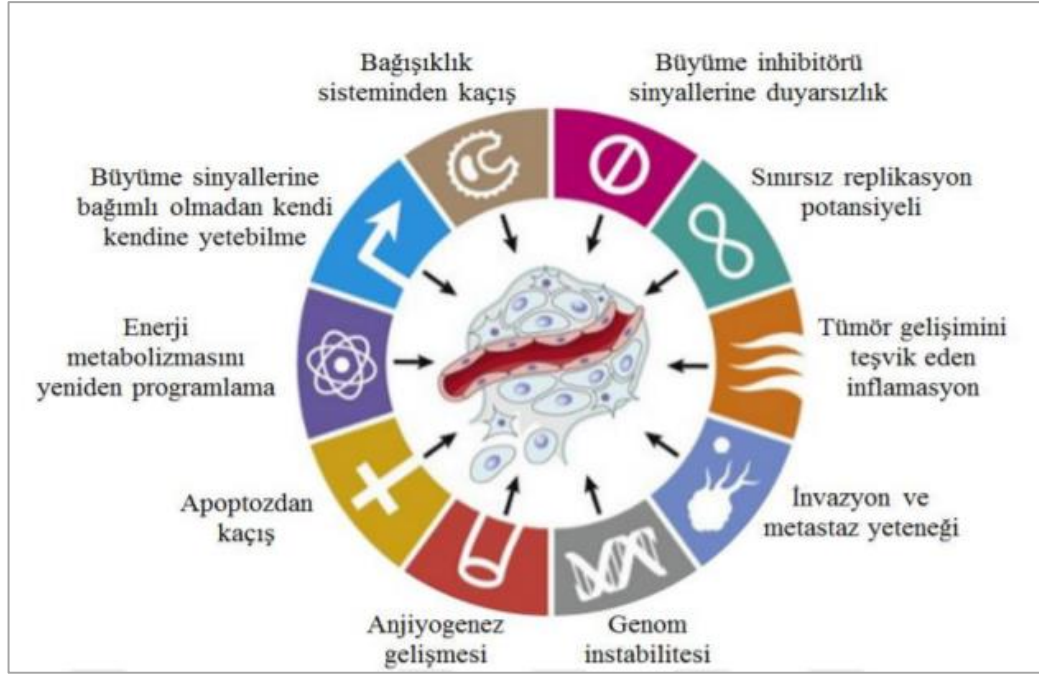
Hücre bölünmesi, başlıca DNA replikasyonu ve replike edilmiş kromozomların iki ayrı hücreye ayrılmasıyla karakterize edilen iki ardışık süreçten oluşur. Başlangıçta, hücre bölünmesi iki aşamadan oluşmuştur: mitoz, yani nükleer bölünme süreci ve interfaz, yani iki mitoz fazı arasındaki evre. Mitoz bölünmenin diğer aşamaları profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olarak adlandırılmaktadır. İnterfaz aşaması G1, S ve G2 fazlarını içermektedir. DNA'nın replikasyonu, S fazının belirli bir bölümünde meydana gelmektedir. S fazından önce hücrenin DNA sentezi için hazırlandığı G1 adı verilen bir boşluk fazı gelmekte ve bunu hücrenin mitozla hazırlandığı G2 adı verilen boşluk fazı izlemektedir (28). G1, S, G2 ve M fazları, standart hücre döngüsünün alt bölümleridir. G1'deki hücreler, DNA replikasyonuna bağlanmadan önce G0 adı verilen bir dinlenme durumuna girebilmektedir. G0'daki hücreler, insan vücudundaki büyümeyen, çoğalmayan hücrelerin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır (28).

Normal bir hücre döngüsünde, bir fazdan diğerine geçiş düzenli bir şekilde gerçekleşmekte ve farklı hücresel proteinler tarafından düzenlenmektedir. Bunlar siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleridir (CDI). Bu proteinlerin düzeyleri hücre döngüsünün her fazında farklılıklar göstermektedir. CDK'lar G1-S-G2 ve mitozla geçişi kontrol etmektedir. Şimdiye kadar tanımlanan on bir CDK'dan hücre döngüsü sırasında aktif olanlar; G1 (CDK4, CDK6 ve CDK2), S (CDK2), G2 ve M (CDK1)'dir. Tanımlı on altı siklinden görev alanlar; siklin D (D1, D2 ve D3); siklin E (E1, E2), siklin A (A, A2) ve B (B1, B2)'dir (28). CDK aktivitesi, tek başına CDK'ya veya CDK-siklin kompleksine bağlanan ve CDK aktivitesini düzenleyen ve DNA replikasyonunu inhibe eden CDK inhibitörleri (CDI) tarafından dengelenebilmektedir. İki farklı CDI inhibitörü ailesi keşfedilmiştir, INK4 ailesi ve Cip / Kip ailesi (29).

Kanserde, hücre bölünmesinin genetik kontrolünde, sınırsız bir hücre çoğalmasıyla sonuçlanan temel değişiklikler vardır. Mutasyonlar esas olarak iki sınıfta meydana gelmektedir: protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genler. Normal hücrelerde protoonkogenlerin ürünleri, hücre proliferasyonunu uyaran yollar boyunca farklı seviyelerde hareket etmektedir. Protoonkogenlerin veya onkogenlerin mutasyona uğramış versiyonları, tümör büyümesini desteklemektedir. *RB* (Retinablastoma) ve *TP53* (Tumor Protein P53) gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu normalde hücre döngüsü ilerlemesini inhibe eden proteinlerin işlev bozukluğuna neden olmaktadır. Kanserle ilişkili hücre döngüsünün deregülasyonu, hücre döngüsünün farklı seviyelerinde önemli olan proteinlerin mutasyonu yoluyla gerçekleşmektedir. Farklı kanser türü hücrelerinde hücre döngüsünün G1-S fazını kontrol eden proteinlerin inaktif olduğu, G2-M fazlarını kontrol eden proteinlerde ise mutasyonların daha az olduğu belirtilmektedir. Kanserde, CDK, siklinler, CDK'yı aktive eden enzimler, CDI, CDK substratları ve kontrol noktası proteinlerini kodlayan genlerde mutasyonlar gözlemlenmektedir. (28, 30).

2.1.3. Kanser Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri

Kanserin karakteristik özellikleri neoplastik hastalığın karmaşıklıklarını organize etmek için bir düzen oluşturmaktadır. Temel ayırt edici özelliklerin yanı sıra son yıllardaki kavramsal ilerleme listeye yeni özellikler katmıştır. Bunlar; büyüme sinyallerine bağımlı olmadan kendi kendine yetebilme, büyüme inhibitörü sinyallerine duyarsızlık, apoptozdan kaçış, sınırsız replikasyon potansiyeli, kanserleşmeyi teşvik eden inflamasyon, enerji metabolizmasını yeniden programlama, bağışıklık sisteminden kaçış, anjiyogenez gelişmesi, genom instabilitesi ile invazyon ve metastaz yeteneği olarak sıralanmaktadır. Bu kavramların yaygın uygulanabilirliğinin kabul edilmesi, insan kanserini tedavi etmek için yeni araçların geliştirilmesini giderek daha fazla etkileyecektir. Kanser hücrelerine ek olarak, tümörler karmaşıklığın başka bir boyutunu sergilerler ve "tümör mikroçevresi" oluşturarak ayırt edici özelliklerin edinilmesine katkıda bulunan, görünüşte normal hücrelerden oluşan bir ortam içermektedir (31) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Kanserin karakteristik özellikleri (31' den adapte edilmiştir).

Büyüme Sinyallerine Bağımlı Olmadan Kendi Kendine Yetebilme

Normal hücreler, büyüme ve çoğalma için mitojenik büyüme sinyalleri tarafından uyarılmalıdır. Bu sinyaller, sinyallerin ilgili reseptörlere bağlanması, büyüme faktörleri, ekstrasellüler matriks (ESM) komponentleri ve hücre-hücre adezyonları veya etkileşimleri yoluyla çeşitli transmembran reseptörler tarafından hücre içine gönderilmektedir. Normal hücreler bu büyüme sinyalleri ile uyarılmadan çoğalamazlar. Onkogenler ise herhangi bir büyüme faktörünü taklit ederek kanser hücrelerini etkileyebilmektedir. Kanser hücrelerinin çoğalma ve büyüme için hücre dışından gelen mitojenik uyarılara ihtiyacı yoktur. Hücre dışı sinyallerden bu bağımsızlık normal hücresel homeostazı bozmaktadır. Bu sonuç kanser hücrelerinin çevresindeki büyüme faktörlerinden bağımsız ve homeostatik mekanizmalardan etkilenmeden proliferasyonu sürdürebilme özelliğini göstermektedir (32).

Normal hücrelerde fonksiyonu hücre çoğaltmasını uyarmak olan genler protoonkogenlerdir. Bu genler ifade edildiğinde hücre bölünmesini teşvik etmektedirler. Çoğaltmanın düzenlenmesi için bu genler veya bu gen ürünleri inaktifleştirilmiş olmalıdır. Eğer protoonkogenler sürekli çalışır hale gelirse kontrolsüz

çoğalmaya neden olmakta ve bu da tümör oluşumuna öncülük etmektedir. Protoonkogen mutasyonlarının bir sonucu olarak böyle bir durum oluştuğunda, onkogenler adı verilmekte çünkü, bu genler kanserle ilişkili olarak kontrolsüz hücre çoğalmasını uyarmaktadırlar. Kanser gelişimini uyarmak için bir genin her iki allelinde de mutasyon olmasının gerektiği tümör baskılayıcı genlerin aksine, malignansinin indüklenmesi için bir protoonkogenin iki kopyasından sadece birinde mutasyon olması yeterlidir (33).

Büyümeyi İnhibe Eden Sinyallere Karşı Duyarsızlık

Normal doku içinde, büyümeyi inhibe eden çeşitli sinyaller, doku homeostazısını korumak ve hücre sel durgunluk için çalışmaktadır. Bu sinyaller ESM'nin hücre yüzeyinde gömülü büyüme inhibitörleri ile hareketsiz inhibitörleri içermekte ve büyüme faktörleri gibi transmembran hücre yüzey reseptörleri ile birlikte hücre içi sinyal döngüsünde hareket etmektedirler (31).

Onkogenler hücre büyümesini teşvik eden proteinleri, tümör baskılayıcı genler ise büyüme ve çoğalmayı bloke eden proteinleri kodlamaktadırlar. Tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonu sonucu oluşturulan büyüme baskılayıcı sinyaller, hücreleri G₀ (istirahat) evresinde kalmaya zorlamaktadırlar. Ayrıca mitoz sonrası faktörler tarafından indüklenen hücreler büyümeyi baskılayan sinyaller aracılığıyla döngünün kontrolünü engellemektedirler. Böylece büyüme potansiyelinin kaybı üzerinden hücre çoğalması durdurulmaktadır (31).

Temel olarak tümör baskılayıcı genler *TP53* ve *RB* 'dir. *RB* geni tümör baskılayıcı gen grubunda keşfedilen ilk gendir. Bu gen tarafından kodlanan Rb proteini hem dinlenmekte olan (G₀) hücrelerde hem de aktif olarak bölünen hücrelerde bulunmaktadır. Hücre içi ve dışı kaynaklardan gelen sinyalleri toplamakta ve hücre döngüsünün ilerlemesini sağlamaktadır. G₁/S faz geçişinde kilit düzenleyici olan Rb proteininin hücre döngüsü ilişkili genlerdeki mutasyonlarla da birçok kanserde doğrudan veya dolaylı olarak inaktive olduğu bilinmektedir (31, 34).

Normal hücrede EGF (epidermal büyüme faktörü), PDGF (platelet kaynaklı büyüme faktörü) gibi büyüme faktörlerinin uyarılması siklinleri aktive ederek Rb proteininin hiperfosforilasyonu ve transkripsiyon faktörü sentezine sebep olurken TGF- β (dönüştürücü büyüme faktörü-Beta) gibi büyüme inhibitörleri, siklin bağımlı kinazlar (CDK) aracılığıyla siklin ifadesini baskılayarak, Rb proteininin hipofosforile halde kalmasını sağlamaktadır. Çoğu insan tümöründe hücre döngüsünün dört anahtar düzenleyicisinden (*p16*, *siklin D*, *CDK4*, *RB*) en az birinde mutasyon olduğu bilinmektedir. Bazı onkogenik virüslerin neden olduğu kanserlerde, viral onkoproteinler doğrudan Rb proteinini hedef almaktadır (35).

Bir diğer önemli tümör baskılayıcı gen olan *TP53* geni en sık mutasyona uğrayan genler ve p53 proteinini kodlamaktadır. *TP53* geni akciğer, kolon, meme, baş-boyun, mesane karsinomları başta olmak üzere pek çok kanser türünde görülmektedir. *TP53* genindeki kalıtsal mutasyonlar Li-Fraumeni Sendromu olarak adlandırılmakta ve otozomal dominant özellikte geçiş göstermektedir. Li-Fraumeni Sendromu olan kişilerde multipl primer tümör gelişimi erken yaşlardan itibaren gözlenmektedir (36).

P53 proteini üç olası yanıtın başlatılmasını sağlamakta ve böylece neoplastik dönüşüm önlenmektedir; 1) Hücre döngüsünü bir süreliğine durdurarak DNA onarımını teşvik etmek (dinlenme) 2) Hücre döngüsünü kalıcı olarak durdurmak (yaşlanma) 3) Apoptoza öncülük eden bir seri olayı başlatmak (hücre ölümü) (31, 37.).

Rb proteini sıklıkla dış sinyalleri toplarken, p53 proteinini aktif hale getiren sinyaller DNA hasarı, onkogen aktivasyonu, ribozomal stres ve metabolik dengesizlik gibi birçok hücre içi sinyaller tarafından uyarılmaktadır (31.).

Apoptozisten Kaçış

Hücrelerin spesifik uyarılar aldıktan sonra ölmeye programlandığı organize bir olay olan apoptoz, hücre büyüme kontrolünün önemli bir bileşenidir. Apoptoz, kromatin yoğunlaşması, nükleer parçalanma ve hücre hacminin azalması gibi morfolojik değişikliklerin yanı sıra kaspaz aktivasyonu, DNA parçalanması, protein ve membran yüzey modifikasyonları gibi biyokimyasal değişikliklerle karakterizedir.

Bu özellikleri ile hücrenin fagositozlar tarafından tanınıp yutulmasına izin verilmektedir (38).

Neoplastik hücreler apoptozis koşullarıyla aynı ortamda olmalarına rağmen apoptotik uyarılara karşı direnç geliştirmek durumundadırlar ve böylece yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Bu direnç apoptoz mekanizmasını düzenleyen moleküllerdeki mutasyonlar sonucunda kanser hücrelerinin duyarsızlık kazanması ile edinilmektedir (39).

Kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmak için kullandığı mekanizmaların bazıları belirli bir tümör tipine özgünken bazıları da bir dizi farklı kanser türleri tarafından kullanılmaktadır. Bu mekanizmalar hem iç hem dış yollarda meydana gelmektedir (38);

İlk Apoptotik Sinyalin (FAS) ve DR5 Yanıtının Bozulması: Melanom, özofagus kanseri ve pulmoner adenokarsinomlar gibi çeşitli malignitelerin apoptotik sinyallemeden kaçınmak için FAS reseptörünü aşağı doğru regüle etmektedir. Ayrıca, FAS reseptöründe tümörlerin bağışıklık tepkisinden kaçmasına izin veren somatik mutasyonların varlığı da bilinmektedir (38).

Tümör nekroz faktörü (TNF) ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL), bazı seçiciliklerle apoptoz yoluyla kanser hücresi ölümünü indükleyen TNF ailesinin bir üyesidir (40). TRAIL DR5 (Death receptor 5) reseptöründeki mutasyonlar başlangıçta baş ve boyun kanserlerinde tanımlanmıştır. Bu tür mutasyonlar küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin %10,6'sında ve mide kanserlerinin %7'sinde bildirilmiştir. Bunların çoğu missense mutasyonlar olduğundan, çoğu DR5'in ölüm alanını değiştirir veya ölüm reseptör sinyalini aktive etme kapasitesini ortadan kaldırmaktadır (38).

Bcl2 Proteinleri Dengesinde Bozulma: Bcl2 protein ailesi üyeleri arasındaki sıkı düzenlenmiş dengenin bozulması, kaspaz-9 aktivasyonunu önleyebilmektedir. Birçok lenfoma türü, anti-apoptotik Bcl2'nin konstitütif ekspresyonuyla sonuçlanan translokasyon t (14,18) ile karakterize edilmektedir. Pro-apoptotik Bcl2 proteinlerinin

inaktivasyonu, kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasına da katkıda bulunabilmektedir (38).

Apoptoz İnhibitörünün Düzensizliği: Birçok kanser, apoptozu inhibe eden proteinlerin (IAP) ekspresyonunda anormallikler sergilemektedir. Kanserlerdeki aşırı IAP ekspresyonunun belki de en çarpıcı örneği, embriyonik dokularla sınırlı olan ve normal olarak yetişkin farklılaşmış hücrelerde bulunmayan, ancak çeşitli tümör tiplerinde tanımlanan bir IAP olan Survivin'dir (38). Survivin (BIRC5) apoptozu düzenleyen önemli bir protein ailesi olan IAP olarak bulunan ilk inhibitörlerden biridir. Survivin ifadesi özellikle kanser hücrelerinde belirgin bir şekilde gerçekleşmektedir (41.).

Azaltılmış Kaspaz Aktivitesi: Başlatıcı ve efektör kaspazlar, apoptozun yürütülmesi için gereklidir, bu da onları kanser hücrelerinin apoptozdan nasıl kurtulduğunu açıklamakta ana konular haline getirmektedir. Tüm kaspazlardaki mutasyonlar birkaç solid tümörde bulunmasına rağmen, bunların tümör oluşumunun başlaması veya tedaviye dirençteki rolleri iyi tanımlanmamıştır (38).

Sınırsız Replikasyon Potansiyeli

İnsan vücudundaki hücreler, kök hücreler hariç, sınırlı sayıda bölünüp çoğalma kapasitesine sahiptir. Hücreler belirli bir süre çoğaldıktan sonra senesens denen yaşlılık dönemine girmektedirler. Bunun sebebi telomer adı verilen, kromozom ucundaki DNA dizi tekrarlarından oluşan küçük özel yapıların kısalmasıdır. Kanser hücreleri telomer kısaltmalarını, “telomeraz” adı verilen enzimin aktivitesini artırarak sağlamaktadırlar. Böylece kromozom uçlarına yeni tekrarlar eklenmesi önlenmekte ve sınırsız çoğalma yeteneğine sahip olmaktadır (31.).

Tümör Gelişimini Teşvik Eden İnflamasyon

Tümör mikroçevresi sadece kanser hücrelerinden değil fibroblastlar, perisitler, lökositler, ekstrasellüler matriks ve endotel hücrelerinden oluşmaktadır ve tümör

stromasının kanser oluşumu, gelişimi ve yayılmasında önemli rolü olduğu bilinmektedir (42).

İnvaziv tümörler bulundukları alanda kronik yangıyı tetikler. Bu yanıtın şiddeti her tümörde farklılık gösterir. Başlangıçta, tümör çevresi hücre inflamasyon anormalliğinin tümörü ortadan kaldırmak üzere konak tarafından geliştirilen bir yanıt olduğu düşünülmekteydi. Ancak son 15 yılda yapılan çalışmalar bu tümör çevresi hücrelerin, tümörigenezi indükleyen sitokinler ve büyüme faktörleri salgıladıklarını ortaya koymuştur. Tümör çevresi yangının gelişiminde çeşitli sitokinlerin aşırı ekspresyonunun rol oynayabileceği öne sürülmüştür (35).

Enerji Metabolizmasını Yeniden Programlama

Kanser hücreleri, büyümeyi, çoğalmayı ve uzun süreli hayatta kalımı teşvik etmek için metabolizmalarını yeniden düzenlemektedir. Bu değişen metabolizmanın ortak özelliği, glukoz alımını artırıp, glikozun laktata fermentasyonudur. Bu olay, tamamen işleyen mitokondrinin varlığında bile gözlemlenmekte ve ‘Warburg Etkisi’ olarak bilinmektedir (43). Warburg etkisinde tümör hücreleri yüksek miktarda glukoz alarak aerobik glikoliz metabolizması ile glukozu laktata dönüştürmektedir. Bu sayede tümör hücresi için gerekli metabolitler sağlanmaktadır (44).

Bağışıklık Sisteminden Kaçış

Tümör hücreleri, karsinogenezde etkili faktörlere bağlı olarak farklı tümöral antijenler sentezler. Bu antijenler konak bağışıklık sistemi tarafından tanınır ve yok edilebilir. Bu antitümöral aktivite ağırlıklı olarak hücre aracılı immünite ile düzenlenir (35).

İmmün sistemin koruyuculuğuna karşı, tümörler sağlam bağışıklık sistemine sahip konaklarda da gelişmeye devam etmekte ve konağın immün sistemine görünmez olmak için çeşitli değişimler geçirmektedir (31.). Tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışı hakkında birçok potansiyel mekanizma tanımlanmıştır. Bazı tümörler bağışıklık sisteminin hedefi olan antijenleri ifade etmeyi durdurmaktadır. Eğer

kaybolan antijen tümörün malign özelliklerini devam ettirmesi için gerekli değilse tümör T hücreler tarafından tanınmaz ve hızla büyümesini ve yayılımını sürdürür. Bazı tümörler majör histokompatibilite kompleks (*MHC*) genlerinde veya antijen sunumu ile ilişkili genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu *MHC* sınıf I moleküllerini eksprese etmeyi durdurur. Bu durumda tümörler yüzeylerindeki tümör antijenlerini sitotoksik T hücrelerine (*CD8+ T*) sunamaz hale gelir. Bazı tümörler ise tümör nekrozis faktör-alfa (*TNF-α*) gibi moleküller üreterek, bağışıklık sistemini baskılayan antijenler üretir. Bu antijenler T hücre aktivasyonunu önlediği için tümör hücreleri çoğalmaya devam eder (45).

Anjiyogenez Sürekliliği

Tümör büyümesi ve metastaz, oksijen, besinler ve diğer temel faktörleri sağlamak için tümör damar sisteminin kurulmasına bağlıdır (46). Bir tümörün çapı 1-2 mm'yi aştığında damarlardan oksijen, besin ve metabolik atıkların diffüzyon ile yayılabileceği maksimum uzaklık sağlanmış olmaktadır. Bu durumda tümörün büyüebilmesi için yeni damar oluşumunun yani anjiyogenezin uyarılması gerekmektedir. Oluşan yeni damarlar *IGF*, *PDGF* gibi büyüme faktörlerinin sentezini uyarmaktadır (31). Tümör anjiyogenezini sağlayan anjiyogenetik faktörlerden bugüne kadar en çok bilineni vasküler endotelial büyüme faktörüdür (*VEGF*). Bunun yanı sıra fibroblast büyüme faktörü (*FGF*), epidermal büyüme faktörü (*EGF*), platelet kaynaklı büyüme faktörü (*PDGF*) proanjiyogenik sitokinlerin aktivasyonuna sebep olarak damarlanmayı başlatan en önemli faktörlerdir (31).

Yapılan deneysel modellemelerde *VEGF* reseptörü aktivitesinin engellenmesi sonucu tümörün belirgin olarak küçüldüğü gösterilmiştir. Son çalışmalarda *VEGF* reseptörü inhibitörleri ile birlikte, *PDGF* reseptörü, *FGF* reseptörü ve anjiyogenik faktör inhibitörlerine yönelik ilaçlar klinik araştırmalarda kullanılmaya başlanmıştır (35).

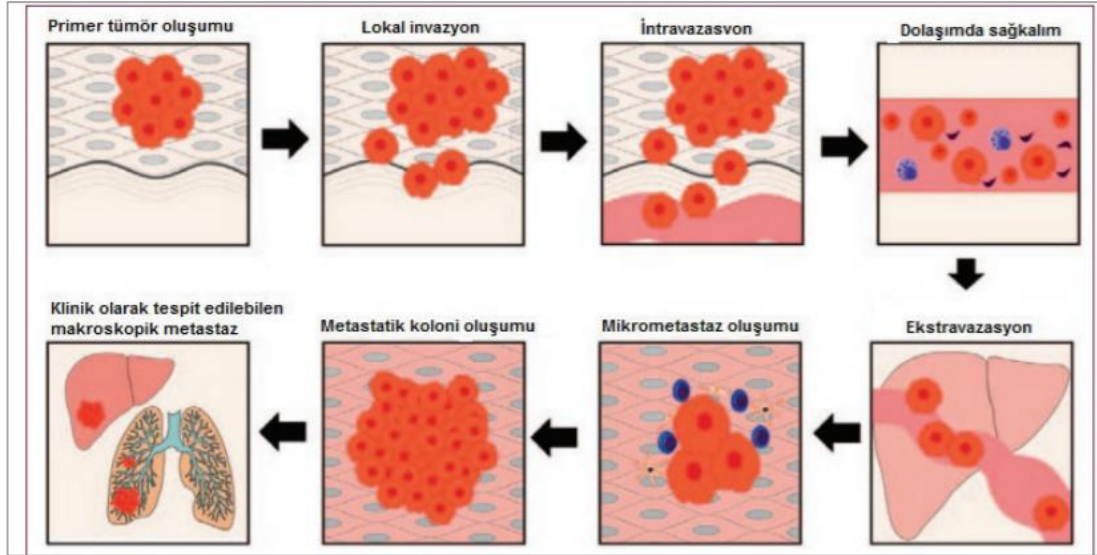
Genom İnstabilitesi

Genomik kararsızlık, neredeyse tüm insan kanserlerinin bir özelliğidir. Genomik kararsızlığın çeşitli biçimleri vardır. Çoğu kanserin, normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinde zaman içinde kromozom yapısının ve sayısının yüksek oranda değişmesi anlamına gelen, kromozomal dengesizlik adı verilen bir forma sahiptir. Kromozomal değişikliklerin bazıları bir tümörün tüm hücrelerinde görülürken bazılarında görülmeyebilir, bu da tümör hücrelerinin genetik olarak kararsız tek bir hücrenin ürünü olduğunu ve zamanla kromozomal anormallikler edinmeye devam ettiğini göstermektedir. Kromozom değişiklikleri insan kanserlerinde genomik kararsızlığın ana biçimi olmasına rağmen, diğer genomik kararsızlık biçimleri de tanımlanmıştır. Bunlar; mikrosatellit instabilitesi, telomerik DNA'nın kaybı, DNA onarım genlerindeki mutasyonlardır (47).

DNA onarım genleri, DNA hasarının fark edilmesi ve onarımı, mutajenlerin DNA'ya hasar vermeden inaktive edilmesi gibi süreçlerden sorumludur. DNA onarım genlerinde kalıtsal mutasyonlar taşıyan bireyler kanser gelişimi için artmış risk altında olduğu gibi bazı sporadik kanserlerde de DNA onarım mekanizmalarında defektler görülebilmekte ve genomik instabilite gelişebilmektedir (35).

Doku İnvazyonu ve Metastaz

Bir tümör geliştikten sonra, tümör çekirdeği oksijene ve besin maddelerine erişimi kaybeder ve bu da genellikle besinlere ve oksijene erişimi yeniden sağlayan yeni kan damarlarının tomurcuklanma yolu ile oluşmasına (anjiyogenez) yol açmaktadır. Daha sonra, tümör hücreleri dokuyu normal sınırlarının ötesinde istila etme (invazyon), kan dolaşımına girme ve malignitenin tanımlayıcı özelliği olan başka dokularda yeni tümörleri oluşturma (metastaz) yeteneği geliştirebilmektedir (48). Malign hücrelerin birincil bir tümörden uzak bölgelere yayılması olan metastaz, kanser tedavisinde en büyük sorunu oluşturmakta ve kanser hastalarının ölümlerinin %90'ını olarak bildirilmektedir. Bir "metastatik kaskad" olarak modellenen bir dizi farklı basamakta meydana gelmektedir (49) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Kanser ve metastaz: Hücre adezyon molekülleri ve hücreler arası bağlantıların önemi (50).

Tümörler maligniteye doğru ilerledikçe sıklıkla daha göçmen hale gelmekte ve çevre dokuyu istila etme kapasitesini geliştirmektedir. Kanser hücresinin bu invazyon ve göç yeteneğine adhezyon, hücre polaritesi, hücre iskelet dinamikleri ve morfolojideki değişiklikler eşlik etmektedir. Göç, çoğu kanserde düzensiz sinyaller için hedef olan büyüme faktörleri, kemokinler, yapışma reseptörleri ve diğer uyaranlar tarafından düzenlenmektedir (48).

İnvazyon-metastaz olaylar dizisi çok aşamalı ve karmaşık bir süreçtir (Şekil). Bu aşamalardan; lokal invazyon, yakındaki kan ve lenfatik damarlar içine giriş (intravazasyon), lenfatik/ hematojen dolaşım içinde taşınma, damar lümeninden uzak organ parankimine geçiş (ekstravazasyon), küçük tümör nodülleri oluşturma (mikrometastaz) ve makroskopik tümör oluşumu (kolonizasyon) temel basamakları oluşturmaktadır. Metastatik bu olaylar dizisini ESM invazyonu ve tümör hücrelerinin damarlar yoluyla yayılıp uzak doku ve organlara yerleşmesi şeklinde iki aşamaya ayrılmaktadır (39).

ESM İnvazyonu: ESM, dokuları fiziksel olarak destekleyen ve hücre yapışması ve göçü için bir substrat ve bir biyoaktif molekül kaynağı sağlayan bir yapı iskelesidir. Statik bir yapıdan uzak, sürekli olarak yeniden modellenmektedir ve bileşimi, hücre

davranışının kontrolünde kritik bir rol oynamaktadır. Fibronektin, laminin, kolajen ve çeşitli diğer ESM bileşenleri, integrin sinyallemesini aktive eden ligandlar olarak görev yapmaktadır (48).

Kanser hücreleri invazyon ve metastaz yapabilmek için birbirleriyle ve ESM ile olan bağlantılarını değiştirecek değişiklikler geliştirmektedir. Karsinom hücrelerinde en iyi bilinen değişiklik hücre-hücre adezyon molekülü olan E-kadherin kaybıdır. Sonraki basamakta bazal membran ve ESM parçalanmaktadır; ESM'nin parçalanmasında matriks metalloproteinazlar (MMP), katepsin D ve ürokinaz plazminojen aktivatörü gibi enzimler rol oynamaktadır. Proteolitik enzimler aynı zamanda ESM'ye büyüme faktörleri salmakta ve ESM glikoproteinlerinin yarıklanması ile kemotaktik ve anjiyogenik fragmanlar oluşturulmaktadır. Tümör hücreleri parçalanmış ESM proteinlerine bağlanmakta ve bu da migrasyon sürecini başlatarak hücrelerin parçalanmış bazal membran ve matriks alanından çevre dokulara geçişi sağlanmaktadır (35).

Tümör hücrelerinin vasküler yayılımı ve yerleşmesi: Tümörlerin çoğu dolaşıma girdikten sonra karşılaştıkları ilk kapiller yatakla ilk karşılaştıkları organda duraklamakta ve metastaz yapmaktadır. Ancak bazı tümörler organ tropizmi gösterebilmektedir (akciğer kanseri iskelet kasına hemen hemen hiç uğramaz, prostat kanseri kemiğe metastaz yapar). Bu organ tropizmi şu mekanizmalar ile açıklanmaktadır (35, 39);

- 1) Tümör hücreleri özellikle hedef organların endotelinde eksprese edilen ligandlar ile uyumlu adhezyon moleküllerine sahip olabilmektedir.
- 2) Kemokinlerin ve reseptörlerinin ekspresyonu metastaz için hedef dokuların seçilmesinde rol oynayabilmektedir. Kemokinler lökositlerin yönlendirilmiş hareketlerine katkıda bulunmakta ve kanser hücreleri, özel dokulara yerleşmek için benzer hileleri kullanan hücreler olarak görünmektedir.

- 3) Tümör hücreleri hedef dokuya ulaştığında burada kolonize olmalıdır yani hedef doku metastatik hücrelerin gelişip çoğalması için elverişlidir veya değildir (35, 39).

2.1.4. Kanser Genetiği ve Mutasyonlar

Karakterlerin veya özelliklerin kalıtımı, gen adı verilen temel kalıtım birimleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bunlardan bazı genler baskındır ve etkilerini uygulamak için yalnızca bir kopya gerektirirken diğerleri resesiftir ve herhangi bir değişikliğe neden olmak için her iki kopyanın da yerinde olmasını gerektirmektedir. Kromozomların tamamındaki anormallikler veya spesifik genlerdeki değişiklikler kanser gelişimine yol açabilmektedir. Bununla birlikte, tüm kanserlerin yalnızca %5-10'u kalıtımla ilişkilendirilmektedir (51).

Bir kanserin sporadik olarak bireylerde gözlenmesine veya kalıtsal bir özellik göstererek bir ailenin bazı fertlerinde tekrar etmesine bakılmaksızın, kanser genetik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Kanser başlangıcında varlığı bildirilen genler;

- Hücre çoğalmasında sinyal iletiminde yer alan proteinleri,
- Kontakt inhibisyonun oluşumunda yer alan bileşenlerini,
- Mitoz bölünme döngüsü düzenleyicilerini,
- Apoptozis bileşenlerini,
- Mutasyonların tanımlanması ve tamirinden sorumlu proteinleri kodlayan genler olarak tanımlanmaktadır (20).

İnsan kanserinde anahtar rol oynayan genetik olaylar üç gruba ayrılmaktadır: 1) Germ line kanser mutasyonları sonucu resesif olarak kalıtılabilen kanserler, 2) Somatik mutasyonlar sonucu oluşan ancak germ line olmayan kanserler, 3) Somatik ve germ line mutasyonlar sonucu oluşan kanserler (52).

Mutasyon genetik materyalde meydana gelen kalıtsal değişiklik olup, bu değişiklik gamet hücrelerinde ya da somatik hücrelerde olabilmektedir. Gamet hücrelerindeki mutasyonlara germ line mutasyon denmektedir ve sonraki nesillere

aktarıldığı için önemlidir. Somatik hücrelerdeki mutasyon ise somatik mutasyon olarak adlandırılmaktadır ve kansere neden olabildiği için önem teşkil etmektedir. Somatik mutasyonlar sonraki nesillere aktarılmaz (53).

Mutasyonlar üç tipe ayrılmaktadır: Hücrede kromozom sayılarını etkileyen mutasyonlar (genom mutasyonları), tek tek kromozomların yapılarında değişikliğe neden olan mutasyonlar (kromozom mutasyonları) ve her bir genin değişimine neden olan mutasyonlar (gen mutasyonları). Bu mutasyon tipleri kanser hücrelerinde gözlenmektedir (54).

Genom ve Kromozom Mutasyonları

Hücre bölünmesi sırasında bir kromozom çiftinin hatalı ayrılması ile oluşan kromozom sayısı değişiklikleri genom mutasyonları olarak adlandırılmaktadır. Her insan hücresi biyolojik anne ve babadan aktarılan genleri içeren yirmi üç çift kromozomdan oluşmaktadır (55).

a. Sayısal kromozom anomalileri

Mitoz ya da mayoz bölünme sırasındaki ayrılamama yavru hücrede sayısal farklılıklara yol açmaktadır. Tek bir kromozom sayısındaki normalden sapmalar anöploidi olarak tanımlanmaktadır. Kromozomların set halinde sayıca fazlalığı ise poliploidi olarak adlandırılmaktadır (56).

b. Yapısal kromozom anomalileri

Yapısal kromozom anomalileri şöyle tanımlanmıştır (55, 57):

1. İnversiyon: Kromozomun bir parçası üzerindeki genlerin, olması gerekenin tam tersi bir şekilde aynı kromozom üzerinde dizilmesi demektir.
2. Delesyon: Kromozom üzerinde bir bölgedeki genetik materyalin koparak kaybolması demektir.
3. Duplikasyon: Haploid genomda tek olması gereken bir kromozom bölgesinin 2 kopyasının mevcut olması demektir.

4. **İnsersiyon:** Kromozom üzerindeki bir bölgeye, fazladan bir veya daha çok genetik materyalin eklenmiş olmasıdır.
5. **Halka (Ring) kromozom:** Kromozomun iki ucundan kırılması sonrasında bu kırık uçların yeniden birleşmesiyle oluşmaktadır.
6. **Marker kromozom:** Normal kromozom sayısına ek olarak fazladan herhangi bir kromozom parçasının eklenmesi olayıdır.
7. **İzokromozom:** Kromozomun bir kolunun (p ya da q) kaybolup diğer kolunun ikilenmesi yani duplike olması demektir.
8. **Translokasyon;** iki farklı kromozom arasında parçaların karşılıklı yer değiştirmesidir. (55, 57)

Gen Mutasyonları

Tüm mutasyonlar, DNA'nın nükleotid dizisindeki değişikliklerden veya genomdaki DNA dizilerinin silinmesi, eklenmesi veya yeniden düzenlenmesinden kaynaklanmaktadır. Gen mutasyonları farklı çeşitlerde oluşmaktadır (13):

1. **Nokta Mutasyonları:** Tek bir baz çiftini farklı bir baz çiftiyle değiştiren veya DNA'ya tek bir nükleotid çifti ekleyen veya DNA'dan tek bir nükleotid çiftini silen mutasyonlar nokta mutasyonları olarak bilinmektedir. Kodlanmış proteinin işlevini etkisiz hale getirmeyen, ancak değiştiren mutasyonlardır. Nokta mutasyonu nedeniyle değişen baz, sentezlenen aminoasitte bir değişikliğe neden olmazsa buna "silence mutasyon" (sessiz mutasyon) denmektedir. Nokta mutasyonu sonucu değişen baz, farklı aminoasit oluşturuyorsa "missense mutasyon" (yanlış anlamlı mutasyon) denmektedir. Nokta mutasyonu sonucu "erken stop kodon" (prematür "dur" kodonu) oluşumu gerçekleşiyorsa bu tür mutasyona "nonsense mutasyon" (anlamsız mutasyon) denmektedir.
2. **Delesyon:** DNA'daki bir ya da daha fazla bazın kaybolması olayı delesyon olarak adlandırılmaktadır.
3. **İnsersiyon:** DNA'daki baz dizisine bir ya da daha fazla sayıda bazın eklenmesi insersiyon olarak adlandırılmaktadır.

4. **Genetik kod:** DNA dizilerini üç baz çiftinden oluşan gruplar (kodon) halinde okumaktadır. Başlangıç kodonundan bitiş kodonuna doğru olan nükleotid dizileri okuma çerçevesini oluşturmaktadır. Bir baz çiftini silen veya ekleyen mutasyonlar, okuma çerçevesini kaydırır ve buna çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları denir.
5. **Ardışık tekrar sayısı değişiklikleri:** Bir üçlü nükleotid (kodon veya trinükleotid) kopya sayısındaki tekrarların artışı Fragil-X ve Huntington Hastalığı adı verilen kalıtsal ve ciddi hastalıklara neden olmaktadır (13, 54, 58)

Hotspot Mutasyonlar (Sıcak nokta mutasyonları)

Bazı DNA dizilerinde mutasyona uğrama olasılıkları diğerlerine göre daha yüksek olan noktalar vardır ve bunlara hotspot mutasyon denir. Büyük ölçüde replikasyon veya DNA onarımı sırasında mutasyona meyilli lokuslarla ilgilidir. DNA kırılmaları genomdaki belirli pozisyonlarda diğer pozisyonlara göre çok daha fazla meydana gelmektedir. Hotspot noktalar, genom boyunca ve genlerin içinde pek çok yerde bulunmaktadır. Rekombinasyona neden olan parça değişimi (crossover) olayının, rekombinasyonun hotspot olarak anılan pozisyonlarda sıklıkla meydana geldiği bilinmektedir. İnsan genomu, yaklaşık 30 bin hotspot rekombinasyon noktası içermektedir (13).

Bugüne kadar kanser gelişimi ile ilgili binlerce somatik mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonlardan bazıları hedefe yönelik tedavinin etkinliğini öngörebilmemize yardımcı olan birer belirteçtir. Tanısal bir prosedür olarak moleküler incelemenin etkinliği, hedeflenen onkogenlerde en sık gözlemlenen mutasyonların kapsamlı olarak taranmasına dayanmaktadır. Bu tür bir genetik tarama genellikle tekrarlayan metastazların tanısında uygulanmaktadır. Metastazlı hastalarda kullanılan ilaçların hedef aldığı faktörleri kodlayan genlerde ya da aynı yolaktaki diğer genlerde meydana gelen yeni mutasyonların bulunması sık karşılaşılan bir direnç mekanizmasıdır. Kanser mutasyonlarının değişkenliği bireye özgü uygulanan onkolojik tedavide zorluk oluşturmaktadır. Bu yüzden, hastalığın seyri boyunca tekrar

tekrar uygulanabilen girişimsel olmayan somatik mutasyon taramalarının geliştirilmesi gerekmektedir (59).

Polimorfizm

Bir popülasyonda, bir genin, kromozomun veya genetik olarak belirlenmiş özelliğin iki veya daha fazla yaygın formunun varlığı polimorfizm olarak adlandırılır (13).

Polimorfizm, popülasyonda %1'den fazla oranda görülen genetik değişikliklerdir. Mutasyonlar polimorfizmlere göre çok daha az sıklıkta görülür. İki bireye ait diziler karşılaştırıldığında, aralarında tek bir nükleotid farklılığı gösteren değişimlere tek nükleotid polimorfizmi (SNP: Single Nucleotid Polymorphism) denir (55).

2.2. Kanser Türleri

İnsanda birden çok kanser türü vardır. Kanser türleri genellikle kanserin olduğu organ veya dokulara veya kendilerini oluşturan hücre tipine göre adlandırılır. Örneğin, akciğer kanseri akciğer hücrelerinde başlar, beyin kanseri beyin hücrelerinde başlar (60).

Kanser vücutta başladığı yere göre 4 ana türe ayrılır (16):

- 1. Karsinomlar:** Deride veya iç organların ve bezlerin yüzeyini kaplayan dokularda oluşmaktadırlar (16). Farklı epitel hücre tiplerinde başlayan karsinomların belirli isimleri vardır: Adenokarsinom (meme, kolon ve prostat), Skuamöz hücreli karsinom (mide, bağırsak, akciğer, mesane ve böbrek), Geçiş hücreli karsinom (mesane, üreter ve böbreklerin bir bölümü) (60.).
- 2. Sarkomlar:** Vücudu destekleyen ve birbirine bağlayan dokularda başlayan kanserlerdir. Yağda, kaslarda, sinirlerde, tendonlarda, eklemlerde, kan damarlarında, lenf damarlarında, kıkırdakta veya kemikte bir sarkom gelişebilmektedir (16).

- 3. Lösemiler:** Kemik iliğinin kan oluşturan dokusunda başlayan kanserlere lösemi denir. Kanda ve kemik iliğinde çok sayıda anormal beyaz kan hücresi (lösemi hücreleri ve lösemik blast hücreleri) oluşmakta olup, normal kan hücrelerini değiştirmektedir. Düşük normal kan hücresi seviyesi, vücudun dokularına oksijen gitmesini, kanamayı kontrol etmesini veya enfeksiyonlarla savaşmasını zorlaştırmaktadır (60.). Akut lenfositik lösemi, kronik lenfositik lösemi, akut miyeloid lösemi ve kronik miyeloid lösemi olmak üzere dört tipi vardır (16).
- 4. Lenfomalar:** Lenfoma, lenfositlerde (T hücreleri veya B hücreleri) başlayan kanserdir. Bunlar, bağışıklık sisteminin bir parçası olan hastalıkla savaşan beyaz kan hücreleridir. Lenfomada, vücudun diğer organlarının yanı sıra lenf düğümlerinde ve lenf damarlarında anormal lenfositler oluşmaktadır. Hodgkin lenfoma ve Non-Hodgkin lenfoma olmak üzere iki ana tipi vardır (60.).

Kadınlarda en çok meme, rahim ve kalın barsak kanseri; erkeklerde ise en çok akciğer, prostat, mide ve kalın barsak kanserleri görülmektedir. Vücutta görüldüğü bölgelere göre; genital bölge, erkeklerde %20, kadınlarda %8, meme %14, sindirim sistemi %25, solunum yolları; erkeklerde %2, kadınlarda %3, karaciğer ve safra kesesinde %3, beyin ve omurilik %1, cilt %10'luk bir dilime sahiptir (10).

Dört ana kanser türü dışında belirli hücre türlerine veya vücuttaki konumuna göre çok sayıda kanser türü vardır. Cilt kanseri de en yaygın kanser türlerinden biri olup, skuamöz hücreli karsinom, bazal hücreli karsinom ve melanom olmak üzere üç tipi vardır (60.).

2.3. Cilt Kanseri Türleri ve Melanom

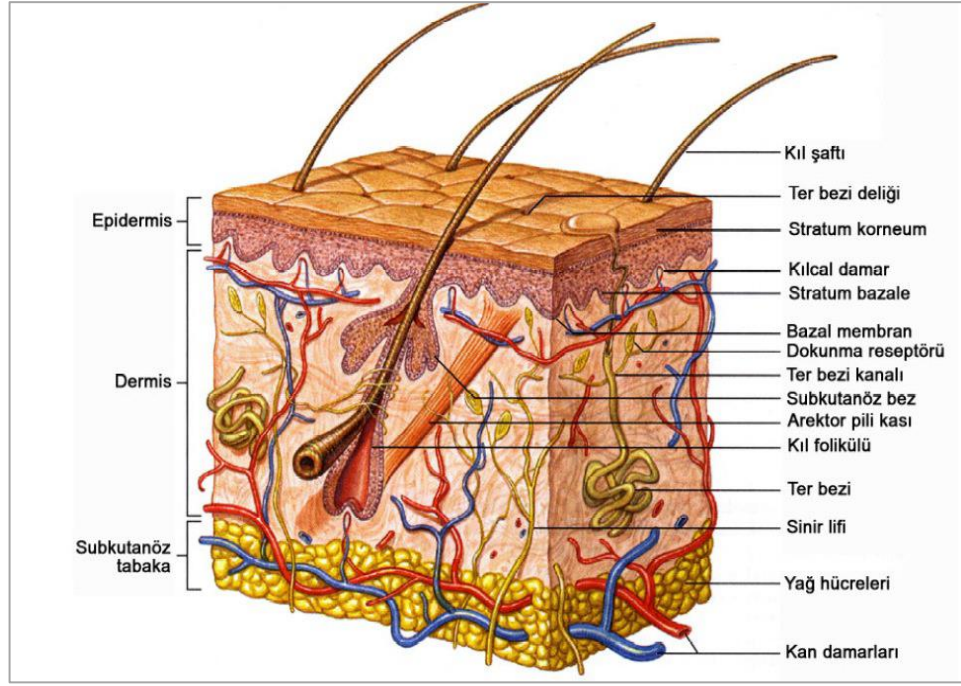
Cilt kanserleri melanom ve melanom olmayan cilt kanserleri olmak üzere 2 türdür. Melanom ölümcül cilt kanseridir ve cilt kanserlerinin %4'ünden sorumludur, %75'i ise ölümle sonuçlanmaktadır (61).

Melanom kanseri, cilde renk veren melanosit hücrelerinin sınırsız ve dağınık bir şekilde büyümesiyle ortaya çıkan bir durumdur ve malign melanom olarak adlandırılmaktadır. Cilt güneşe maruz kalındığında melanositlerin pigment üretiminde artış olur ve deri rengi koyulaşır. Daha sıcak iklimlerde yaşayan insanlardaki melanositler daha aktif çalışarak daha çok pigment üretmektedir. Bu nedenle açık tenli insanlar koyu tenli insanlara göre daha çok risk altındadır (62).

Melanositlerin metastatik melanoma kötü huylu dönüşümü, ekzojen ve endojen tetikleyiciler ile tümöre özgü ve immün ilişkili faktörler arasında karmaşık bir etkileşim gerektiren sürecin sonucudur. Melanositler nadiren bölünmektedir, buna rağmen melanositik tümörlerin çoğalması düzenli ve sürekli olmaktadır (63).

Dermisin hemen üzerinde yer alan epidermin en derin tabakasında yer alan melanositler, ürettikleri melanin adı verilen pigmentler aracılığıyla zararlı güneş ışınlarının, deri üzerinde ve deri altındaki dokularda yaratabileceği olumsuz etkilere karşı vücudun korunmasına yardım etmektedir (62). Deri vücuttaki en büyük organ olup, enfeksiyon ve yaralanmalara karşı koruma görevi vardır. Su ve yağ depolamak ve D vitamini üretmek de derinin görevleri arasında yer almaktadır (63).

Cilt üç ana katmandan oluşur (Şekil 2.6).; Epidermis, Dermis, Hipodermis.



Şekil 2.6. Deri anatomisi (64).

Epidermis: Derinin en üst katmanıdır, çok incedir ve görevi vücudu çevresel tehditlerden korumaktır. En dışta kalan kısmı stratum korneumdur. Bu katmandaki hücreler düz, yassı şekillerinden dolayı sküamöz hücreler olarak adlandırılmaktadır. Ortadaki dermis tabakasının hemen üstündeki bazal hücreleri arasına yerleşmiş, epidermis-dermis sınırında melanositler yer almaktadır. Epidermisin diğer hücreleri keratinositler, langerhans hücreleri ve merkel hücreleridir (65).

Dermis: Epidermise bazal membran seviyesinde bağlanmaktadır. Kıl, kıl kökleri, ter bezleri, yağ bezleri, duyu nöronları ve kan damarları bu katmandadır (65).

Hipodermis: Subkutis derinin en alt katmanıdır, hipodermis olarak da adlandırılmaktadır. Kolajen ve yağ hücrelerini bulundurmaktadır (65).

Üç tip deri kanseri vardır; bazal hücreli karsinoma, skuamöz hücreli karsinoma, malign melanomdur (10, 66).

a) Bazal hücreli karsinoma: Nadiren metastatik olmasına rağmen, şekil bozukluğu ile birlikte önemli lokal yıkıma neden olabilmekte ve geniş yumuşak doku,

kıkırdak ve kemik alanlarına yayılabilmektedirler. Genellikle küçük, inci gibi, yarı saydam, kabarık, telenjiaktik kenarlıdır. Genellikle yüz, boyun ve elin dış kısmı gibi güneşe maruz kalan bölgelerde görülmektedir (67).

b) Skuamöz hücreli karsinoma: Epidermisteki yassı hücrelerden kaynaklanan, kırmızı kabuklu, pullu, kabarık plaklar şeklinde görülmektedir. Sertleşme, tüm skuamöz hücreli karsinomların ortak bir özelliğidir ve genellikle malignitenin ilk belirtisidir. Tipik lezyon, yapışkan bir kabuğa ve kötü tanımlanmış kenarlara sahiptir, bu da görünür sınırların ötesine yayıldığını göstermektedir (67). Nadiren de olsa metastaz yapabilmekte ve cildin hemen altındaki yağ dokusuna yayılabilmektedir. Erken tanıda tedavi olasılığı %95'dir (68).

c) Malign malanom: Kutanöz melanom olarak da adlandırılan en ölümcül deri kanseridir. Melanin pigmentini üreten melanosit hücrelerinde başlamaktadır. Melanin üretimi devam ettiği için kanserli alan kahverengi veya siyah renklidir. Ancak mealnom beyaz, pembe veya kırmızı da olabilmektedir. Ailesel geçişi de olan bir kanser tipidir ve erken tanı ile tedavi şarttır (66, 68).

2.3.1. Malign Melanom

Malign melanom radyal ve vertikal olmak üzere iki büyüme fazı içermektedir. Melanosit hücreleri, radyal büyüme fazında epidermiste sınırlı (melanoma in situ) olup, epidermis ve papiller dermiste tümör kitlesi oluşturmadan (mikroinvaziv melanom) bulunmaktadır. Birçok primer melanom yıllar süren radyal faz nedeniyle, erken teşhis edilip vertikal faza geçmeden tedavi edilmektedir. Vertikal büyüme fazında; melanosit hücreleri dermiste epidermisteki en büyük atipik melanositik hücre kümesinden daha büyük çapta tümör kitlesi oluşturmaktadır (69).

1967'de Wallace Clark, melanomun histogenetik sınıflandırmasına ilişkin dönüm noktası niteliğindeki yayını yayınlamıştır ve bugün kullanılan melanomun Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırmasının mevcut versiyonunun temelini oluşturmaya devam etmektedir (69). Malign melanom genel klinik ve patolojik özelliklere göre dört ana alt tip içermektedir (69, 70):

- 1. Yüzeysel yayılan melanom:** Yüzeysel yayılan melanomlar genellikle nodüler melanomlardan veya lentigo malign melanomlardan daha genç hastalarda görülmektedir. Beyaz ırkta görülen mealonların %60-70'ini oluşturmaktadır. Melanositik nevüsten oluşma sıklığı en yüksek olan tiptir. Tipik olarak ekstremiteler gibi aralıklı olarak güneşe maruz kalan anatomik bölgeleri içermektedir. Asimetrik görünümlü, radyal bir şekilde genişleyen alacalı pigmentasyona sahip, düz, yavaş büyüyen bir lezyon olarak ortaya çıkmaktadır.
- 2. Nodüler melanom:** Yüzeyel yayılan melanoma göre daha yaşlı hastalarda meydana gelmektedir. Metastaz riski yüksektir. Papül, nodül veya kabarık plak şeklindedirler. Herhangi bir yerde ortaya çıkabilmekte ve genellikle ülserasyon ve kanama gösterebilmekte, hızla genişleyen bir nodül olarak bulunmaktadır (69, 70).
- 3. Lentigo maligna melanom:** Büyüme hızı en yavaş olup en iyi prognoz gösteren tiptir. Kadınlarda erkeklere göre iki kat fazla sıklıkta görülmektedir. Sıklıkla yüz, boyun, kulak, el gibi güneşe maruz kalan bölgelerde görülmektedir. Radial büyüme fazı oldukça uzun sürmektedir (5-20 yıl). Lentigo maligna'dan lentigo malign melanom gelişimi %5-10 oranındadır. Nevüs kahverengi, siyah başta olmak üzere lekeli, alacalı renklindedir (69, 70).
- 4. Akral lentiginöz melanom:** Avuç içi, ayak tabanı ve subungual bölge olan akral bölgeleri içermektedir. Genellikle yavaş büyüyen, lentigo maligna melanoma benzer alacalı pigmentli maküller olarak bulunmaktadır. Etiyolojisinde güneş ışınına maruz kalmanın önemli bir rolü olmadığı düşünülmektedir. Histolojik olarak genellikle en erken tanınabilir formunda, epidermal katman birleşme yeri boyunca dağılmış tek atipik melanositler olarak karakterize edilmektedir (69, 70).

Diğer yaygın olmayan melanom alt türleri ile DSÖ' nün sınıflandırmasına göre malign melanomun morfolojik tipleri Tablo 2.1'de görülmektedir.

Tablo 2.1. DSÖ'nün 2006 yayın patolojisi ve genetiğinde listelenen melanom alt tipleri (69).

Ana Alt Tipler	Yaygın Olmayan Alt Tipler
• Yüzeysel yayılan melanom • Nodüler melanom • Lentigo maligna melanom • Akral lentiginöz melanom	• Desmoplastik melanom • Mavi nevüstan kaynaklanan melanom • Doğuştan nevüstan kaynaklanan melanom • Çocukluk çağı melanomu • Naevoid melanom • Kalıcı melanom

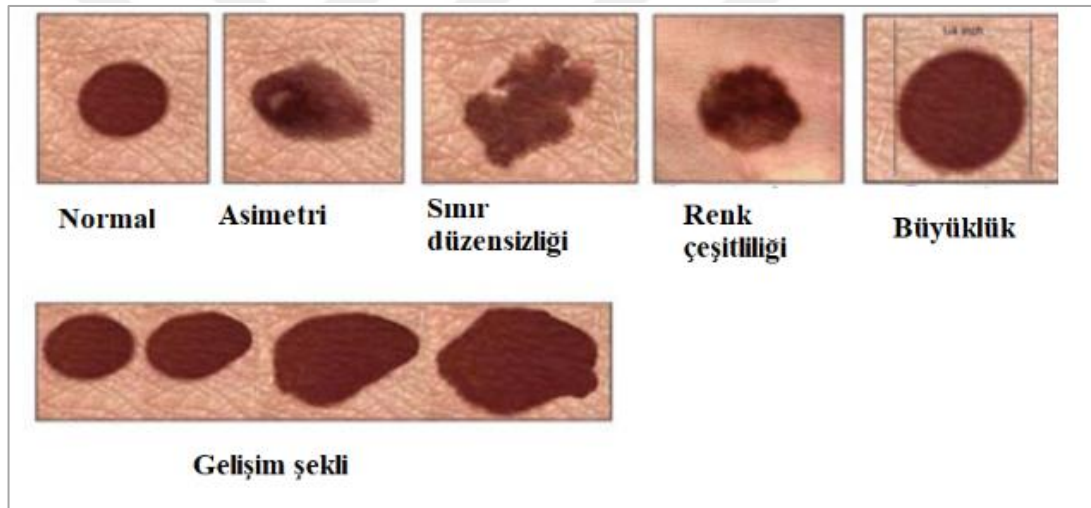
2.3.2. Melanomda Tanı Yöntemleri

Atipik nevüs (ben), iyi huylu veya kansersiz olarak bilinmektedir ancak genellikle melanoma gibi görünmektedir. Farklı renkleri, görünüşleri, sınırları vardır ve ayrıca asimetriklerdir. Atipik nevüsten etkilenen insanlar, melanom geliştirme riski daha yüksektir. Melanomlar, cilt kanserinin en kritik şeklidir. Düzensiz kenarlarla boyut, renk ve şekil olarak değişmiş benler melanom belirtileridir. Melanom büyümesi, etkilenen bölgede kaşıntı ve kanama ile çeşitli renklere sahiptir. Derinin en üst tabakasında küçük bir nokta olarak oluşmakta ve normal mi yoksa kötü huylu mu olduğuna karar vermek zor olan aşamasıdır. Ayrıca ağırlı bir yöntem olduğu için biyopsi sık kullanılmamaktadır. Dermatoloğun teşhisine yardımcı olmak için, tam otomatik bir melanom tanıma sistemi geliştirilmektedir (71, 72).

Klinik tanı: Klinik yorumlamada, doktorlar lezyon tespiti için dermoskopi kullanmaktadır. Dermoskopi, dermatolojide deri lezyonunu incelemek için kullanılan invaziv olmayan bir yöntemdir (71, 73). Pigmente deri lezyonlarının in vivo gözlemine

sağlayan, yüzeysel ve yüzeysel altındaki yapıların daha net görüntülenmesini sağlamaktadır. Bu tanı aracı çıplak gözle görülemeyen yapıların morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesini sağlamaktadır. Bu yöntem, büyütücü optik sistem sayesinde epidermis, dermoepidermal bileşke ve papiller dermisteki farklı özelliklerin izlenmesini mümkün kılmaktadır. Yapılan sınırlı sayıda dermoskopi-histopatoloji korelasyon çalışması dermoskopinin, mikroskopik incelemeden önce doğru tanı yaklaşımı ile ilgili ipuçları verebildiğini göstermiştir. Bu tanı aracı sayesinde, çıplak gözle malign melanom için %64 olan doğru tanı oranı, %80'lere kadar çıkabilmektedir (74).

Dermoskopi yöntemi melanomu ABCD kuralını kullanarak tanımlar (73). (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. ABCD Kuralı: Kanser işareti taşıyan ve taşımayan nevi (75).

ABCD kuralı klinik muayenede erken evre bir melanomu, iyi huylu bir nevüsten ayırt etmek için doktorlar tarafından kullanılan, en yaygın görsel muayene yöntemidir. Doktorlar deri lezyonunu asimetri, sınır, çap, renk ve kenar bilgileriyle değerlendirmektedir. Ölüm oranını azaltmak için cilt kanserinin erken teşhisi gereklidir (71, 72).

ABCD kuralının söz konusu özellikleri şöyledir (76):

a) **Asimetri (Asymmetry):** Asimetriyi değerlendirir. Lezyonu ortadan ikiye gözle böldüğünüzde, her iki ekseninde asimetri varsa iki puan verilmekte, bir eksen boyunca asimetri varsa bir, aksi takdirde sıfır puanlanmaktadır.

b) **Sınır Düzensizliği (Border):** Lezyon 8 dilime ayrılmaktadır. Her bir dilim için lezyonun pürüzlü, çentikli, bulanık yani düzensiz olmasına göre bir, düzenli ise sıfır puan verilmektedir. Bu durumda en yüksek puan sekizdir.

c) **Renk (Color):** İyi huylu nevüs genellikle tek renkliken, melanomda sıklıkla birden fazla renk gözlenmektedir. Beyaz, kırmızı, açık kahverengi, koyu kahverengi, mavi-gri ve siyah renklerin her biri için bir puan verilmektedir.

d) **Büyüklik (Diameter):** İyi huylu nevüste büyüme gözlenmezken, melanom büyümeye devam etmektedir. Beş farklı yapının varlığına göre her birine bir puan verilmektedir. Bu yapılar; ağ, yapısal olmayan alanlar, dallı çizgiler, noktalar ve küreciklerdir. Bir nevüs sıklıkla 6 milimetreden büyük çapa sahiptir.

Lezyonu sınıflandırmak için toplam dermoskopik skor (TDS) hesaplanmaktadır. Düşük skor lezyonun iyi huylu olduğu (TDS <4.75), orta skor şüpheli vaka olarak yorumlanabileceği (4.75 <TDS <5.45) ve yüksek skor lezyonun kötü huylu melanom olma olasılığının daha yüksek olduğu anlamına gelmektedir. (TDS >5,45) (76).

Patolojik tanı: Primer (birincil) malign melanomların çoğu deriden kaynaklanmaktadır ve tipik olarak bir makül, papül, plak veya nodül şeklini alabilen genişleyen, asimetrik, düzensiz sınırlanmış, pigmentli bir lezyon olarak bulunmaktadır (77). Yüksek dereceli tümörler küçük farklılaşmalar göstermektedirler. Genellikle işçi hücre karakterindedirler, nekroz ve yüksek mitotik aktivite göstermektedirler. Ayrıca sıklıkla derinden invaziftirler. Tüm bölgenin tam olarak biyopsi ise çıkarılması gerekmektedir (78).

Gözün koroid membranı, oral mukoza yüzeyi, anogenital bölgenin mukozal yüzeyleri ve özefagus, tümörün görüldüğü diğer anatomik bölgelerdir. Cerrahi bıçak ile yüzeysel biyopsi (shave biyopsi), tümör kalınlığının tanıda çok önemli bilgilerin yanlış hesaplanmasına yol açabileceğinden önerilmemektedir. İnsizyonel biyopsi büyük lezyonlarda denenebilmektedir. 2 mm'lik sağlam dokuyu da içine alacak

şekilde yapılan eksizyon biyopsi yapılması gerekli esas yöntemdir. Bu yöntem sonucunda benign tanı konulmuş ise tüm işlem tamamlanmış olmaktadır (77, 79).

Son zamanlarda, bilgisayar alanındaki gelişmeler nedeniyle, birkaç bilgisayar tabanlı yöntem de tanıtılmıştır. Bu alandaki çalışmaların çoğu, geleneksel makine öğrenme algoritmaları ile düşük ve orta düzey özellikleri kullanan geleneksel yaklaşımlara odaklanmaktadır. Bunlar temelde ABCD kuralına ve doku, şekil, renk görüntüleri üzerinden doğrudan hesaplamaya dayanmaktadır. Bunların yanısıra üç boyutlu, gelişen kanser hücrelerini görüntüleme ile bilgisayarlı tomografi, yumuşak doku görüntüleme için manyetik rezonans görüntüleme, küçük kanser hücrelerinin ve lenf yoluyla dağılımının varlığını tespit etmek için pozitron emisyon tomografi ve cilt biyopsisi yöntemleri de sıklıkla kullanılmaktadır. Erken ve hızlı tanı yöntemleri, bir dermatoloğun insanlar için cilt lezyonu oranını azaltma şansını artırmaktadır (72).

2.3.3. Melanom Evrelendirme

Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC)'nin 2010 yılında yayınlanan 7. baskısındaki evreleme sistemine göre; tanı anındaki tümör kalınlığı, ülser varlığı ve mitotik aktivite oranı malign melanomda en önemli prognostik belirleyiciler olarak bildirilmiştir (80).

Evreleme melanomun prognozu ve tedavi planı için diğer kanserlerde olduğu gibi klinisyenler için büyük öneme sahiptir. Amerikan Ortak Kanser Komitesi tarafından 2016 sonlarında TNM (Tümör-nod- metastaz) evreleme sistemini TNM 8 olarak güncelleştir (81). Bu evreleme sisteminde T- primer tümör, N- bölgesel lenf nodu varlığı/yokluğu, M- uzak metastaz değerlendirilmesi baz alınmaktadır (79, 82).

TNM tanımlamaları şu şekildedir (83):

Primer Tümör (T)

TX Birincil tümör değerlendirilemez

TO Birincil tümör kanıtı yok

Tis Yerde karsinom

T1 En büyük tümör boyutu ≤ 2 cm

T2 En büyük tümör boyutu > 2 cm ancak $\leq$ 5 cm

T3 En büyük tümör boyutu > 5 cm

T4 Primer tümör faysa, kas, kıkırdak veya kemik gibi dokuları işgal eder.

Bölgesel Lenf Nodları (N)

NX Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez (farklı nedenlerden dolayı)

NO Bölgesel lenf nodlarında metastaz yok

NI Bölgesel lenf nodlarında metastaz var

N2 Bölgesel lenf nodu metastazı olmaksızın transit metastaz

N3 Bölgesel lenf nodu metastazı ile transit metastaz

Uzak Metastaz (M)

MX Uzak metastaza dair klinik / radyolojik kanıt yok

MO Uzak metastaz yok

MI Uzak metastaz var

2010 TNM evreleme sistemine göre hastalar şöyle gruplandırılmaktadır (66, 79);

Evre 0: Epidermiste normal olmayan, kansere dönüşme potansiyeli olan melanositler yer almaktadır. 0. evre melanoma in situ olarak da tanımlanmaktadır.

Evre I: Bölgesel veya uzak metastazı olmayan, düşük riskli primer melanomlu hastaları tanımlamaktadır (T1a-T2a). I. Evre primer tümör, mitoz oranı ve ülserasyon varlığı veya yokluğuna göre evre IA ve evre IB'ye ayrılmaktadır.

Evre II: Melanom, lenfatik hastalık veya uzak metastazı olmayan, kanserin tekrarlama açısından yüksek riski olan primer tümörlü hastaları içermektedir (T2b-T4b). Evre II tümör kalınlığı ve ülserasyonun varlığı/yokluğuna bağlı olarak evre IIA, IIB ve IIC evresi olarak 3'e ayrılmaktadır.

Evre III: Tümör, yakında bulunan lenf damarına ve nodlarına yayılabilmekte ya da hareketsiz olan birbirine dolanmış bir veya daha fazla lenf noduna

yayılabilir. Bu metastazların, patolojik olarak ispatlandığı hastaları içermektedir (N1-N3). Tümör herhangi bir kalınlıkta ülserli veya ülseriz olabilmektedir. Evre III hastalar lenfatik hastalığın yaygınlığına bağılı olarak evre IIIA, IIIB ve IIIC olarak alt gruplara ayrılmaktadırlar.

Evre IV: Melanomda uzak metastaz varlığı evre IV olarak tanımlanmaktadır (M1a-M1c). Bilinmeyen primer melanomdan kaynaklanan diğerk bölgelerin metastazları evre IV olarak sınıflandırılmaktadır.

2.3.4. Melanom Metastazi

Malign melanom, agresif seyirli sık metastaz gösteren bir tümördür. Metastazları sıklıkla bölgesel lenf nodları olmakla birlikte akciğerk, karaciğerk, santral sinir sistemi ve kemik gibi organlara da yayılım gösterebilmektedir. En sık metastaz yaptığı organlar; akciğerk (%35), karaciğerk (%25), beyin (%30) ve kemiktir (%13). Melanom, progresyonun erken evrelerinde lenfatik sistemle bölgesel lenf nodlarına metastaz yapma eğilimindedir (84).

Bazal hücreli karsinom ve skuamöz hücreli karsinom gibi melanom dışı deri kanserlerinin aksine melanom, lokal, bölgesel ve uzak metastaz eğilimindedir. Metastaz riski, invazyon derinliği ve birincil lezyonun ülserasyonu ile ilişkilidir (85).

Malign melanom temel olarak lenfatik yolla metastaz yapmaktadır. Öncelikli yayılım yolu ise bölgesel lenf nodlarıdır. Lenf nodu yayılımını belirli sıraya göre yapmaktadır. Bu sırayı atlayarak sonraki lenf nodunda metastaz oluşturma riski %0-2 arasındadır. Malign melanom için bölgesel lenf nodu tutulumu prognozu belirleyen en önemli faktör olarak kabul edilmektedir (86). Bölgesel lenf nodları dışında, sıklıkla iskelet ve merkezi sinir sistemine, daha az oranda da akciğere metastaz yapmaktadır. Pulmoner metastazlarını esas olarak pulmoner arterlere ulaşan tümör embolileri ile yapmaktadır. Lezyon büyüdükçe akciğere metastaz yapma eğilimi artmaktadır (86).

Melanoma bağılı sağkalım oranı, artan nod tutulum sayısına göre önemli ölçüde azalmıştır. Tutulum olmuş lenf nodu sayısına göre 5 yıllık sağkalım oranları;

- 1 lenf nodu tutulumu > %50
- 2 ve daha fazla > %25
- 4 ve daha fazla %10'dur (87).

Melanomun tüm aşamalarında 5 yıllık ortalama sağkalım oranı %92,2'dir. SEER 2017 verileri metastaz varlığında bir yıllık yaşam şansını %43, 8, üç yıl ve üzeri sağkalım oranını ise %71,2 olarak vermektedir. Tek bir metastaz varlığında 1 yıllık sağkalım oranı %36, birden fazla metastaz alanıyla en yüksek risk kombinasyonuna sahip hastalarda sağkalım oranı %13'den azdır (87, 88).

2.3.5. Melanom Genetiği

Kutanöz melanom, cilt hücrelerinde UVR'ın neden olduğu onarılmamış DNA hasarını, cilt hücrelerinin hızla çoğalmasına neden olan mutasyonları veya genetik kusurları tetiklediğinde ortaya çıkan, tüm cilt kanserlerinin en agresif ve ölümcül şeklidir (89).

Melanomun genetik temelini altında yatan değişikliklerin çoğu melanositler içinde rastgele edinilmiş mutasyonlar olarak ortaya çıkmakta ve bir genomik değişiklik birikimi, melanom gelişimine, ilerlemesine ve evrimine katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte, kalıtsal germline varyantlarının varlığı, melanoma duyarlılığının önemli bir bileşenini oluşturmaktadır. Melanoma yatkınlığı oluşturan genler tipik olarak düşük, orta ve yüksek penetranslı genler olarak gruplandırılmaktadır (12). Melanom risk genleri, melanom yolağını direkt veya başka genlerle birlikte ya da çevresel risk faktörleriyle birlikte etkilemektedir. Kalıtsal melanomun temelini oluşturan risk genleri, diğer kanserlerle de ilgili olabilmektedir. Melanom kalıtsal ailelerde, özellikle de *CDKN2A* mutasyonlarına bağlı pankreas kanseri olmak üzere, ek kanserlerin de ailesel kümelenmesi gözlenmektedir (12).

2.3.5.1. Yüksek Penetrans Genleri

Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A)

CDKN2A kromozomun 9p21 pozisyonunda bulunan, ilk ekzonlarında farklı transkript varyantları oluşturan dört ekzonlu gendir. Üretiminden sorumlu olduğu tümör baskılayıcı olarak çalışan iki protein p16 (INK4A) ve p14 (ARF)'dür (90). P16'nın baskılayıcı aktivitesi sikline bağımlı kinazlar 4 ve 6'nın (CDK4 ve CDK6) inhibisyonu yoluyla gerçekleşmektedir. Böylece S fazına girişi önlemek için hipofosforile edilmiş durumda pRb korunmaktadır. Germline *CDKN2A* mutasyonlarının otozomal dominant kalıtımı, mutasyon sıklığı farklı coğrafi bölgeler arasında değişiklik gösterse de ailevi melanomun yaklaşık %20-40'ında rol oynamaktadır (12).

Epistasis, belirli bir genin etkisinin başka bir modifiye edici genin varlığına bağlı olduğu bir gen-gen etkileşimidir. Epistasis, sonraki gen ekspresyonu için belirli bir genetik arka planın gerekli olabileceği çoklu genlerle de bağlantılı olabilmektedir. Örneğin; *MC1R* varyantları *CDKN2A* mutasyonlarının penetrasyonunu artırarak genetik modifiye ediciler olarak hareket etmektedir (91).

Sikline bağımlı kinaz 4 (CDK4)

Bu gen tarafından kodlanan protein, Serin-Treonin protein kinaz ailesinin bir üyesidir. Hücre döngüsü G1 faz ilerlemesi için önemli olan protein kinaz kompleksinin katalitik bir alt birimidir. Bu kinazın aktivitesi, düzenleyici alt birimler D-tipi siklinler ve CDK inhibitörü p16 (INK4a) tarafından kontrol edilen G1-S fazı ile sınırlıdır. Bu kinazın, retinoblastoma gen ürününün (Rb) fosforilasyonundan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu gendeki ve bununla ilgili D-tipi siklinler, p16 (INK4a) ve pRb dahil ilgili proteinlerindeki mutasyonların hepsinin çeşitli kanserlerin tümörjenezisi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Kutanöz melanom evre I ve evre III ile ilişkilidir (91). Ekson 2'nin 24.kodonuna Arginin24Sistin (R24C) ve Arginin24Histidin (R24H) olmak üzere iki farklı mutasyon tanımlanmıştır. Şimdiye kadar dünya çapında bu *CDK4* mutasyonlarına sahip toplam 18 aile tanımlanmıştır (12).

2.3.5.2. Orta Penetrans Genleri

Orta ve düşük penetranslı aleller genel popülasyonda daha yaygındır, ancak tekil bir şekilde, onkogenezi yürütmek için yeterli değildirler. Bugüne kadar, melanomaya yatkın olan üç orta penetrans geni tanımlanmaktadır. Üçü de pigmentasyondaki doğal varyasyonla ilgilidir. Bunlar; Melanokortin 1 reseptör geni (*MC1R*), Melanosit İndükleyen Transkripsiyon Faktörü (*MITF*) ve membranla ilişkili taşıyıcı proteindir (*SLC45A2*) (12).

2.3.5.3. Düşük Penetrans Genleri

Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) kapsamında 18 düşük penetranslı gen melanom ile ilişkilendirilmiştir. Bunlar; *ARNT*, *SETDB1*, *PARP1*, *CYP1B1*, *CASP8*, *CDKAL1*, *AGR3*, *MTAP*, intergenic (*TMEM38B*), *OBFC1*, *CCND1*, *TYR*, *ATM*, *OCA2/HERC2*, *FTO*, *ASIP*, *MX2*, *PLA2G6* genleridir (12).

2.3.5.4. Ailevi Melanom Mutasyonları ve Diğer Kanser Riski

Bazı ailesel kutanöz melanom yatkınlık genleri, melanom aileleri içinde şans eseri beklenenden daha yüksek oranlarda spesifik kanser vakalarının meydana geldiği diğer tümör tipleri riskiyle de ilişkilendirilmektedir. En kapsamlı olarak belgelenen ilişki, *CDKN2A* ve pankreas kanseri arasındadır. Fakat bir dizi başka kanser için de ilişkiler kaydedilmektedir (12) (Tablo 2.2).

Ailesel melanomdaki genel risk, genlerin, fenotipik özellikler ve çevre dahil olmak üzere birçok faktörün de etkisiyle modifiye edilmesidir. Modifiye edici faktörlerin veya etkileşimlerin eklenmesi, belirli bir alelin penetrasyonunu etkileyebilmekte ve melanom duyarlılığının artmasına veya azalmasına neden olabilmektedir (12).

2.3.5.5. Melanom İlişkili Yolaklar

RET Sinyal İletim Yolağı: Melanom gelişimi, ilerlemesi ve terapötik dirençte hepatosit büyüme faktörü (HGF)/MET yolunun kritik rolü vardır (92). HGF reseptörü

olarak da bilinen MET reseptörü, deri de dahil olmak üzere birçok dokunun epitel hücrelerinde eksprese edilir. HGF/MET yolunun tümörijenik etkisi, çeşitli organların malignitelerinde uzun süredir gözlemlenmiştir (93).

ErbB Sinyal İletim Yolağı: Epidermal büyüme faktörü reseptörü ailesi, tümü tümör gelişiminde önemli roller oynadığı bilinen ErbB1 (epidermal büyüme faktörü reseptörü-1), ErbB2, ErbB3 ve ErbB4 olmak üzere dört üyeden oluşur. ErbB4, bu reseptörler arasında önemli görünmektedir, çünkü büyümeyi önleyici özelliklere sahip tek üyedir (94).

ERBB4 genini etkileyen mutasyonların dağılım paterni benzersizdir ve Erb reseptör ailesinin diğer üyelerinin mutasyon profilinden önemli ölçüde farklıdır. Melanomdaki veya akciğer kanserindeki *ERBB4* mutasyonlarının çoğu, reseptörün hücre dışı alanlarını kodlayan ekzonlarda bulunur (95).

MAPK/ERK Sinyal İletim Yolağı: RAS/RAF/MEK/ERK yolunun melanomagenezdeki rolünün keşfi ve ilerlemesi, bu tümörün tedavisinde yeni bir dönem açmıştır. RAS ve hücre dışı sinyalle ilgili kinazlar (ERK) inhibitörlerinin son gelişimi, bu sinyal yolunun nihai olarak bastırılması ve yola bağlı ilaç direncinin kontrolü için yeni hedefler eklemeyi vaat etmektedir (96).

MAPK sinyal yolları, hücre proliferasyonu, farklılaşması, yaşlanması, hayatta kalması, transformasyonu ve göçü dahil olmak üzere çeşitli temel hücresel süreçleri düzenleyen, evrimsel olarak korunmuş sinyal transdüksiyon yollarıdır (97). MAPK/ERK sinyali, melanom gelişimi ve ilerlemesi için gereklidir. Melanomagenezde en sık görülen mutasyonların bu yolun aktive edici mutasyonları olduğunu göstermektedir; dahası, MAPK sinyallemesinin genetik ve epigenetik olaylar tarafından yeniden etkinleştirilmesi, bu tümörde hedef tedaviye karşı kazanılmış direnç için temel mekanizmadır (96).

Androjen Reseptörü Sinyal İletim Yolağı: Androjen reseptörü (AR) birçok hücre tipinde eksprese edilir ve çoğu çalışma prostat kanserine odaklanırken, AR sinyali diğer organlarda, özellikle meme, mesane, böbrek, akciğer ve karaciğerde

tümör oluşumunda rol oynar (98). AR sinyali, proliferasyon üzerinde herhangi bir etki olmaksızın, melanom hücrelerinin istilacı özelliklerinin kontrolünde rol oynamaktadır (99).

Notch Sinyal İletim Yolağı: Notch ailesinin reseptörleri, çoklu hücre tiplerinin gelişimini, farklılaşmasını ve işlevini kontrol etmede önemli bir rol oynar (100). Notch sinyali, kök hücreler gibi çoklu hücre tiplerinin farklılaşmasını, gelişimini ve işlevini kontrol eden yüksek oranda korunmuş bir yoldur (101). Anormal Notch sinyalinin, malign melanomda, melanomun malign biyolojik davranışında önemli bir rol oynadığı tanımlanmıştır (102). *Notch1*'in rolünün melanom progresyonu ile yakından ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (103). Önceki çalışmalar, Notch1 sinyalinin, mitojenle aktive olan protein kinaz/fosfatidilinositol 3-kinaz-Akt yolaklarını aktive ederek ve N-kadherin ekspresyonunu yukarı regüle ederek primer melanom ilerlemesini desteklediğini göstermiştir (104).

Hedgehog Sinyal İletim Yolağı: Hedgehog (Hh) sinyal yolu hücre zarından çekirdeğe sinyal iletiminin yüksek oranda korunmuş evrimsel bir yoldur. Hh sinyal yolu, embriyonik gelişimde önemli bir rol oynar. Glioma ile ilişkili onkogen (Gli) transkripsiyon faktörlerine sinyal aktarımında yer alan Hh sinyal yolunun bileşenleri arasında Hedgehog ligandları ; Sonic Hh (SHh), Indian Hh (IHh) ve Desert Hh (DHh) bulunur. Gli'nin aktivatör formu çekirdeğe gider ve promotörlerine bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu uyarır (105).

Hh sinyal yolunun aşırı ekspresyonu, mide, yemek borusu, pankreas, kolorektal, yumurtalık ve endometriyal, meme, prostat dahil olmak üzere çeşitli tümörler ile akciğer, melanomlar, gliomlar ve diğer ekstrasüranköz tümörlerde bulunmuştur (105, 106). Yapılan çalışmalarda ilk kez, Hh yolu bileşenlerinin yüksek seviyelerinin melanom hastalarında daha kötü sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (106).

Homoloji Yönelimli Tamir Yolağı: Bir genomdaki DNA çift zincir kırıkları, genomic DNA'nın değiştirileceği hücresel DNA onarım yolları ile çözülür (107). DNA çift zincir kırıkları homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) veya HDR yolu ile

tamir edilebilir (108). HDR yolu esas olarak hücre döngüsünün S- veya G2-fazında devreye girer ve homolog DNA dizileri gerektirir. Homolog rekombinasyon, kırık bölgeyi onarmak için yalnızca homolog bir dubleks şablonun varlığında gerçekleşen hassas genom düzenlemesi için istenen mekanizmadır (108).

TGF-Beta Sinyal İletim Yolağı: TGF- β (Transforming growth factor-Beta) ve ilgili büyüme faktörleri, hücre proliferasyonu, farklılaşması, ölümü ve göçünü düzenleyerek embriyogenez ve yetişkin doku homeostazında kritik rol oynayan pleiotropik faktörlerdir (109). Notch1 ve TGF- β sinyali arasındaki etkileşim, çok çeşitli karmaşık tümör davranışlarını düzenlemek için çoklu tümörlerde tanımlanmıştır (110). Ayrıca, Notch sinyalinin inhibisyonu, berrak hücreli ve renal hücreli karsinom hücrelerinde hem bazal hem de TGF- β 1 ile indüklenen TGF- β sinyalinin zayıflamasına yol açmaktadır (111).

2.3.6. Melanom Epidemiyolojisi

Melanom tipik olarak deride oluşmaktadır, ancak nadiren ağızda, bağırsaklarda veya gözde de ortaya çıkabilmektedir. Melanom tüm cilt kanserlerinin yaklaşık %5'ini temsil etmekle birlikte tüm cilt kanseri ölümlerinin yaklaşık dörtte üçünü oluşturmaktadır (89). DSÖ' nün kapsamlı bir projesi olan Globocan verilerine göre dünya genelinde melanom, 287.723 yeni vaka ve 60.712 ölüm sayısı ile 20. sırada yer almaktadır (112). Dünya çapında melanom insidansı son 50 yılda hızla artmaktadır. 2018'de dünya çapında beklenen yeni CM vakası sayısı 287.723'tür. Dünya çapında, CM insidans oranları etnik kökene bağlı olarak farklı popülasyonlar arasında 100 kat değişmektedir; en yüksek oranlar Yeni Zelanda ve Avustralya'da, orta oranlar Avrupa ve ABD'de ve en düşük oranlar Güney-Orta Asya'da gözlenmektedir (6, 113).

Tablo 2.2. Melanoma yatkınlık genleri ve diğer kanserlerle ilişkileri (12).

Gen	Kutanöz olmayan melanom kanserleri ile ilişkili	Muhtemelen ilişkili kanserler *
<i>CDKN2A</i>	Pankreas	Kulak- Burun- Boğaz (dil, ağız boşluğu, yutak, gırtlak), üst sindirim (yemek borusu, mide), beyin, meme, serviks, safra kesesi, tiroid, lösemi, karaciğer, akciğer, lenfoma, böbrek
<i>CDK4</i>	-	Meme, serviks, kolorektal, akciğer, lenfoma, pankreas, mide, rahim
<i>BAP1</i>	Renal hücre karsinomu, uveal melanoma, mezotelyoma, bazal hücreli karsinoma, kolanjiyokarsinom	Kemik, mesane, meme, kolorektal, akciğer adenokarsinomu, menenjiyom, nöroendokrin, yumurtalık, paraganglioma, mide, tiroid
<i>MITF</i>	Renal hücre karsinomu, pankreas	Mesane, beyin (glioblastoma), meme, kolorektal, endometriyal, lösemi, akciğer, lenfoma, miyelom, prostat, mide
<i>TERT</i>	-	Mesane, meme, endometriyal, akciğer, yumurtalık, böbrek
<i>POT1</i>	Glioma	Beyin, meme, kronik lenfositik lösemi, endometriyal, lösemi, tiroid, küçük hücreli akciğer kanseri
<i>ACD</i>	-	Meme, kolorektal, lösemi, akciğer, lenfoma
<i>TERF2IP</i>	-	Meme, serviks, menenjiyom, yumurtalık

* Muhtemelen ilişkili kanserler, etkilenen bireylerin soy ağacında belgelenenleri ve normal tipte (wild type) olmayan, test edilmemiş aile üyelerini içerir (12).

Avrupa kökenli popülasyonlarda, insidans oranları değişkenlik göstermektedir. Örneğin İsviçre ve İskandinav ülkeleri olan İsveç, Norveç ve Danimarka'da çok yüksektir. Avrupa'da, CM insidans oranlarının tahmin edilen en yüksek oranları İsveç ve Danimarka'da, en düşük oranları ise Yunanistan'da gözlenmiştir. Bu varyasyon esas olarak UVR'ye maruz kalmaya ve genetik olarak belirlenmiş fenotipik özelliklere atfedilmektedir (6., 113). Avrupa'daki insidans oranları, daha zengin ülkelerde doğu Avrupa ülkelerinden elde edilen verilerle karşılaştırıldığında daha yüksektir (114).

Etnik kökene göre farklılıklar CM alt tipleri ve vücut konumuna göre gözlemlenmektedir. Avrupa kökenli popülasyonlar arasında en yaygın melanom alt tipi yüzeysel yayılan melanom olmasına rağmen (SSM), Afro-Amerikan popülasyonundaki melanomlar, avuç içi ve ayak tabanı gibi güneşe maruz kalmayan ciltlerde daha sık görülmekte ve akral lentiginöz melanom (ALM) en yaygın histopatolojik tip olarak belirtilmektedir (6., 113).

En yüksek sayıda CM tanısı alan yaş aralığı 40 ile 60 yaş arasındadır. Tanı ve ölümdaki ortalama yaş sırasıyla 57 ve 67'dir. İnsidans oranları 40 yaşından itibaren artmaya başlamaktadır; bu nedenle CM genellikle gençleri etkileyen bir tümör olarak kabul edilmektedir (Tablo 2.3.). Bu sonuçların olası açıklamaları arasında, ülkelerdeki önleyici kampanyaların ardından çocuklarda güneşe maruz kalmanın azalması ve son yıllarda göç nedeniyle melanom riski düşük olan genç bireylerin oranındaki değişiklikler yer almaktadır. Yaşa göre hesaplama yapıldığında, ergen ve genç erişkin kadınlar erkeklerden daha yüksek melanom insidans oranlarına sahiptir. Bununla birlikte, 40 yaşından sonra oranlar tersine döner ve erkeklerde melanom görülme sıklığı kadınlardan daha fazladır. Kadınlarda melanom daha erken fazda yakalanabilmektedir. Bunun nedenleri içinde erkeklerin kendi ciltlerini inceleme veya cilt muayenesi için dermatologlardan yardım alma sıklığının kadınlardan daha az olması ve kadınlardaki östrojen hormonunun koruyuculuğundan bahsedilmektedir (6., 89, 113).

Melanomda yaşa bağlı olarak artma olmasına rağmen, nispeten genç sayılabilecek 20-45 yaşlarında hastalık oranı pik yapmaktadır (Tablo 2.3, Tablo 2.4).

Tablo 2.3. Melanom insidansının yaş ve cinsiyet dağılımı (10).

Yaş grupları	İnsidens/100.000	
	Erkek	Kadın
15-39	5	10
50-59	15	20
70-79	35	25
80 +	50	35

Tablo 2.4. Melanoma bağlı mortalitenin yaş ve cinsiyet dağılımı (10).

Yaş grupları	Mortalite/100.000	
	Erkek	Kadın
50-59	5	4
60-69	8	4,2
70-79	11	9
80 +	18	12

Konjenital nevüsten kaynaklanan melanoma çocuklarda sık iken, lentigo malign melanoma yaşlılarda sıktır. Lentigo malign melanoma 65 yaş, yüzeysel yayılan melanoma 30-50 yaş (ortalama 37), nodüler melanoma orta yaş, akral lentiginöz tip 65 yaşlarda görülmektedir (10).

Ölüm oranlarına bakıldığında, ABD’de ve Avrupa’da 1980’lerden beri arttığı, ancak insidansa göre çok daha yavaş hızlarda olduğu görülmüştür. Her yaşta erkeklerde ölüm oranları daha yüksektir. (Tablo 2.4.) (6.,89,113). Avustralya’nın Queensland kenti, melanomun önde gelen malignite ve 15-44 yaş arasındaki Avustralyalılarda kansere bağlı ölüm nedeni olduğu dünyada en yüksek malign melanom insidansına sahiptir (114).

Ülkemizde 2018 Globocan verilerine göre dünya genelinde melanom yeni olgu sayısı 1622 ile 22. sıradadır. Melanom kaynaklı ölüm oranı ise %0,57’dir. Erkeklerde melanom görülme sıklığı %1,7 iken kadınlarda %1,2’dir. (112)

2.3.7. Melanom risk faktörleri

Günümüzde melanom, genetik duyarlılık ve çevresel etkenler arasındaki etkileşimden kaynaklanan çok faktörlü bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Melanom insidansının dünya çapında artışından sorumlu en önemli değiştirilebilir risk faktörü genotoksik etkisinden dolayı ultraviyole ışınlarına maruz kalmadır. Bunu daha sonra solaryum ve ilaçlar izlemektedir. En önemli değiştirilemez risk faktörleri ise; melanositik nevi sayısı, aile öyküsü ve genetik yatkınlıktır. Melanositik nevi (benler), melanositlerin veya nevüs hücrelerinin iyi huylu birikimleridir ve konjenital veya edinsel olabilmektedir (114, 115). Melanom vakalarının yaklaşık %25'i önceden mevcut bir nevüs ile birlikte ortaya çıkmaktadır (116).

UVR: DSÖ'nün tahminlerine göre dünya çapında yılda 65.161 kişi çok fazla güneşten ölmektedir. Güneşe maruz kalma, cilt kanserinin en önemli çevresel nedeni olup, UVR bu hastalığın ortaya çıkmasıyla ilişkili dalga boyudur. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), hem temel hem de epidemiyolojik araştırmalardan elde edilen önemli kanıtlara dayanarak, UVR'nin tüm spektrumunu "insanlar için kanserojen" (Grup 1) olarak sınıflandırmıştır. Gönüllü insanlarda yapılan deneyler, UVA (ultraviyole-A) ve UVB'ye (ultraviyole-B) maruz kalmanın, bağışıklık sistemini zayıflatabileceğini, kanser ve diğer hastalıklara karşı savunmasızlığı artırabileceğini göstermiştir (89). Bir meta-analiz çalışması sonucuna göre, yüksek güneşe maruz kalma ve kapalı alanda UV bronzlaşma (solaryum) ile melanom riskinde ve melanom dışı cilt kanserinde (NMSC) önemli artışlar meydana geldiği gösterilmiştir (117). Değiştirilebilir UVR davranışında %50'lik bir azalma 2042'ye kadar tahmini 11.980 melanom vakasını önleyebileceği sonucuna varılmıştır (118.).

Yapılan göçmen çalışmaları, genellikle güneşli coğrafi bölgelerde çocukluğunu geçiren bireylerde artan melanom riskini ve yaşlandıkça melanom riskinin azaldığını göstermektedir. Coğrafi bölgelerde ekvatorun yakınında veya çocukluk ve/veya ergenlik döneminde sahile yakın yerlerde yaşayan bireyler, daha

yüksek enlemlerde yaşayan veya sahil kenarında hiç yaşamamış olanlara kıyasla artmış melanom riski taşımaktadır (119).

Ailesel Yatkınlık: Melanom için en güçlü risk faktörleri, ailede melanom öyküsü, çok sayıda iyi huylu veya atipik nevüs ve önceki bir melanomdur. İmmünsüpresyon, güneş hassasiyeti ve ultraviyole radyasyona maruz kalma ek risk faktörleridir. Bu risk faktörlerinin her biri, melanomun oluşumuna katkıda bulunan bir genetik yatkınlığa veya çevresel bir stres faktörüne karşılık gelmektedir. Her faktör, moleküler düzeyde çeşitli derecelerde anlaşılmaktadır. Örneğin, melanoma eğilimli ailelerin üyelerinin yüzde 25 ile 40'ı, sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A'da (CDKN2A) mutasyonlara sahiptir ve birkaç nadir akraba, sikline bağımlı kinaz 4'te (CDK4) mutasyonlara sahiptir. Melanoma yatkınlık ile CDKN2A veya CDK4'teki bir mutasyon arasında bir bağlantı için rasyonel bir temel vardır çünkü her ikisi de tümör baskılayıcı genlerdir (120).

Fenotipik özellikler: Deri rengi, saç ve göz rengi ve çiller gibi pigmentasyon özellikleri, melanom için iyi bilinen risk faktörleridir. Saç rengine göre, melanom ile en yüksek ilişki, koyu saçlı deneklere kıyasla üç kattan fazla melanom riski olan kıvılcık saçlı bireylerde bulunmaktadır. Sarı saçlı ve açık kahverengi saçlı bireyler, esmer deneklerle karşılaştırıldığında artmış melanom riski gözlenmektedir. Ten rengine bakıldığında, açık pigmentli deneklerin, daha koyu pigmentli deneklere kıyasla iki kat artmış melanom riskine sahip olduğu bildirilmektedir. Bu sonuç, cilt fototipinin analizi ile uyumludur (89)

Melanositik nevi: Melanositik nevi benign melanosit hücrelerinin çoğalmasdır. Melanositik nevi konjenital ve edinsel olarak görülebilmektedir. Melanom olgularının üçte biri melanositik neviden gelişmektedir. Nevüs boyutundan çok, nevüs sayısının fazlalığı ve şekli melanom açısından risk teşkil etmektedir. Dev konjenital melanositik nevi melanom açısından risklidir. Melanositik neviye klinik olarak tanı konabilmektedir, fakat melanom ile ayırıcı tanının yapılabilmesi önemlidir. Beklenen özellik, displastik nevüsün de diğer sıradan benler gibi erişkin dönemde aynı kalması ve değişim göstermemesidir.

Ancak değişim varlığında melanom gelişimi söz konusu olabilmektedir ve takibi şarttır (121, 122).

Ülkemizde, kişilerin öğrenim düzeyleri ile güneşten korunma davranışları arasındaki ilişki dermatoloji polikliniğine başvuran hastalarda 8 yıldan fazla öğrenim görenlerle görmeyenler arasında güneşten korunmaya özen gösterme arasında anlamlı fark tespit edilmiştir (123). En yüksek oranda güneş kremi kullanan meslek grubunun sağlık çalışanları (%63,5) olduğu belirtilmektedir. Hastaların %52,7'si çocukluğunda güneş yanığı geçirmektedir. Çocukluk döneminde bir kez bile güneş yanığı geçirmiş olmak malign melanom ile yakın ilişkilidir. Hasta popülasyonunun ailesinde malign melanom olan kişilerin oranı %3,7; edinsel malign melanom oranı %0,4 olarak saptanmıştır. Nevüs açısından yapılan değerlendirmede hastaların 50'den fazla nevüse sahip olma oranı %21,6 iken, %15,4 oranında atipik nevüs varlığı saptanmıştır. Düzenli olarak her gün güneş kremi kullanan kişilerin oranı %16,2'dir (124).

2.4. Kanser Tanısında Kullanılan Metotlar

Kanser tespitinin amacı kanser öncesi değişiklikleri veya kanseri en erken safhasında tespit etmektir. Kanserleri çok erken aşamalarda tespit etmek, kanserin ilerlemesini önlemek için acil müdahalelere izin verdiği için iyi hasta prognozu ile ilişkilidir. Kanser tespiti, vücut sıvılarındaki kansere özgü biyobelirteçlerin taranmasını, kanseri veya başlangıcını görselleştirmek için görüntüleme yapmayı veya hastalardan alınan biyopsilerde biyobelirteçlerini saptamayı içerir (125).

Kanser tanısında güvenilir ve geçerli moleküler genetik tanı yöntemleri kullanılmaktadır. Bunun için; biyopsinin ardından tümör dokusu histopatolojik, patogenetik açıdan incelenmeli ve devamında moleküler tetkikler ile gözlemlenmelidir. Bu tetkiklerden Flow Sitometri, Yeni Nesil Dizileme (NGS), Multipleks Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu (MLPA), Sanger dizileme yöntemleri ve epigenetik profiller kullanılmaktadır (125).

2.4.1 Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing, NGS)

DNA dizileme için Frederick Sanger ve Allan M. Maxam-Walter Gilbert 1977'de ilk kez sekanslama yöntemlerini sunmuştur (126, 127). Sanger ve Maxam bu yöntemleri ile 1980'de Nobel kimya ödülü almıştır. Sanger dizileme, işaretlenmiş nükleotid olan zincir sonlandırıcı inhibitörlerin DNA'nın spesifik dizisini tanımlaması temeline dayanmaktadır (128).

Sanger yöntemi birinci nesil dizileme tekniğidir (129). Leroy Hood ve arkadaşları ilk kez 1986'da DNA dizi analizinin otomasyonu için bir yöntem geliştirmiştir. Bu yöntemde, enzimatik DNA dizi analizinde kullanılan oligonükleotid primerine, A, C, G, T bazlarına özgü reaksiyonların her biri için farklı bir florofofor boya kovalent bağlanmaktadır. Reaksiyon karışımı poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülüp, DNA fragmanlarının floresan bantları doğrudan bilgisayara aktarılmaktadır (129). Bu teknolojinin zorlukları, yüksek maliyetli olması, bir hastalıktan sorumlu tek bir geni bulmanın dahi uzun ve yorucu olmasıdır. Ayrıca düşük veriye sahip olmasından dolayı geniş ölçekli dizilemeler için elverişsiz olabilmektedir (128).

2000'li yılların ortalarında yeni nesil dizileme teknolojisinin geliştirilmesi hastalık araştırmalarında devrime yol açıp, önceki dizileme tekniklerine göre daha düşük maliyet ve daha kısa sürede çalışma imkânı sunmuştur. Böylece bir insan genom dizisinin birkaç haftada çıkarılması düşük maliyetle mümkün olmuştur (128).

Yeni nesil dizileme teknolojisi her ne kadar heyecan verici olsa da beraberinde yeni sorunlar da getirmektedir. Elde edilen veri miktarının büyük ölçüde artması ile hata oranlarında (%0,1-15) da artma olmaktadır. Kısa olan okuma uzunluklarının (35-700bp) artırılmasıyla maliyet de artmaktadır. Dizilemedeki bir diğer sorun ise, dizilemenin genin veya genomun tüm ekzonlarını kapsamamasından dolayı okuma eksikliklerinin olabilmesidir (131).

Yeni nesil dizilemede hedeflenmiş gen analizi de mümkün kılınmaktadır. Bir hastalık için hedeflenen genlerin dizi analizi için, özel olarak hastalık panelleri dizayn edilebilmektedir (129).

Yeni nesil dizileme, tek nükleotid varyantlarının (Single Nucleotide Variants, SNVs) ve küçük insersiyon veya delesyonların (InDel'lerin) doğru tanımlanmasını sağlar (128). Büyük InDel'lerin tespiti, kopya sayısı varyasyonlarının (Copy Number Variants, CNVs) tanımlanması için yeni nesil dizileme tekniklerine farklı stratejik yöntemler eklenmektedir (132).

Yeni nesil dizileme teknolojisi, farmakogenomik araştırma alanında da giderek daha fazla uygulanmaktadır. Bazı hastaların neden belirli bir ilaca yanıt verip vermediğini açıklayan genetik nedenleri tespit etmek için önemli bilgiler sağlanmaktadır. Bu nedenle yeni nesil dizileme, hastalığa neden olan varyantları bulmanın çok ötesinde uygulamalara sahiptir (128).

Tüm yeni nesil dizileme platformlarında ortak çalışma basamağı nükleik asit kaynağını temel alarak sekans kütüphanesi (library) oluşturmaktır. Genomik DNA zincirleri rasgele parçalanıp, platforma özgü adaptörler ve primerler ile bağlanmaktadır. Rasgele gerçekleşen adaptör-primer bağlanmalarında serbest adaptörler temizlenmektedir. Sonra istenilen molekül olan bir ucunda adaptör, diğer ucunda primer olan molekülü yeterli sayıda çoğaltmak amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) kullanılmaktadır. Adaptörler, kütüphane moleküllerini katı bir yüzeyde sabitlemek için boncuk (bead) veya cam slayt gibi özel parçalar içermektedir. Adaptörler dizilemeyi başlatan bölgeler içermektedir. IonTorrent® platformunda, yeni nesil dizileme kütüphaneleri sıvı kürecikler üzerinde oluşturulmaktadır. Her DNA fragmanı mikro boyuttaki boncuklara bağlanmakta ve boncuklar üzerinden özel olarak çoğaltılmaktadır. DNA denatüre edilmekte ve her biri bir DNA fragmanı içeren sıvı küreler fiberoptik slayt üzerindeki dizileme işleminin gerçekleşeceği küçük kuyucuklara yayılmaktadır. IonTorrent® teknolojisinde dizileme, floresan sinyallerin görüntülenmesine değil, nükleotid birleşmesi sırasında ortaya çıkan H^+ iyonları salınımına göre gerçekleşmektedir. H^+ iyon salınımı, sensör kuyularındaki pH'ta bir değişiklik olarak tespit edilmektedir (133, 134).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez kapsamında kullanılan hücre hatları, kimyasallar, Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları.

Hücre Hattı	Firma	Katalog Numarası
WM115	Rockland	WM115-01-0001
SK-MEL30	T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Şap Enstitüsü Hücre Kültür Bankası	03010901

Tablo 3.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal malzemeler.

Kimyasal	Firma	Katalog Numarası
%10’luk Fetal Sığır Serum (FBS)	Capricorn Scientific	FBS-HI-11A
%1 Penisilin/Streptomisin antibiyotiği (P/S)	Capricorn Scientific	PS-B
DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium) besi ortamı L-Glutamin’li ve Sodyum Piruvat’lı	Capricorn Scientific	DMEM-HPA
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) L-Glutamin’li besi ortamı	Diagnovum	D840-500ML
DPBS (Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline) tuz çözeltisi magnezyumsuz ve kalsiyumsuz	Gibco	14190-094
DPBS Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline) tuz çözeltisi magnezyumsuz ve kalsiyumsuz	Capricorn Scientific	PBS-1A
Trypsin EDTA çözeltisi (%0,25)	Gibco	25200-056
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Fisher Chemical	D/4121/PB17
Tryphan Blue	Sigma	T8154-100 ml

Kullanılan sarf malzemeler, cihazlar ve ekipmanlar sırasıyla Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’te verilmiştir.

Tablo 3.3. Kullanılan sarf malzemeler.

Malzeme	Firma
Flask (T25, T75)	ISOLAB
Falkon tüp (15 ml, 50 ml)	ISOLAB
Pastör Pipeti (3ml)	ISOLAB
Otomatik Pipet Uçları	ISOLAB

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan cihazlar ve ekipmanlar.

Cihaz	Marka/Model
Karbondioksit inkübatörü	Panasonic/ MCO-170AICUV
Class 2 Biyolojik güvenlik kabini	Telstar
Işık Mikroskobu	Euromex/ IN-SERIES
Santrifüj	Hettich/ Universal 320 R
Vorteks	MRC/ SI-100
Sıcak su banyosu	Memmert/ WNB 14
+4° C Buzdolabı	Klimasan/ S 900 SC DD
-80° Dondurucu (Ultra low temprature, ULT)	Haier Biomedical/ DW-86L628
Otomatik pipet seti (10,100,1000µL) Easypet3	Eppendorf
Thoma Lamı	ISOLAB
Kronometre	ISOLAB

3.1.1. Yeni Nesil DNA Dizileme

Yeni nesil dizileme çalışması için kullanılan kitler ve cihazlar Tablo 3.5 ve Tablo 3.6’da gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Yeni nesil dizileme için kullanılan kitler.

Kit	Marka	Katalog No
Ion Library Kit Plus	ThermoFisher Scientific	4488990
Ion 510™- Ion 520™- Ion 530™ Kit	ThermoFisher Scientific	A34461
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	ThermoFisher Scientific	Q32851
Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 Kit	ThermoFisher Scientific	4471250
Ion AmpliSeq™ Kanser Hotspot Panel v2	ThermoFisher Scientific	4475346

Tablo 3.6. Yeni nesil dizileme için kullanılan cihazlar.

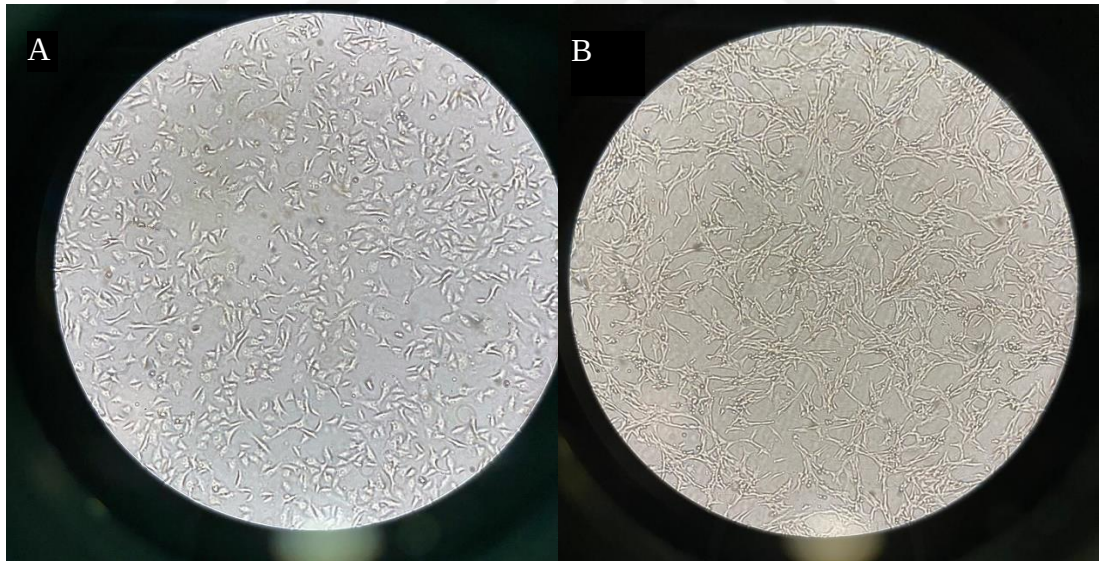
Cihaz	Marka	Katalog No
Ion GeneStudio™ S5 System	ThermoFisher Scientific	A38194
Ion Chef™ Instrument	ThermoFisher Scientific	4484177
ProFlex PCR System	ThermoFisher Scientific	A27937
Qubit 4 Fluorometer	ThermoFisher Scientific	Q33238
NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometre	ThermoFisher Scientific	ND-2000

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Sıvı nitrojende -196°C’de saklanmış olan hücreler kültüre edilmiştir.

- Azot tankından çıkarılan hücreler ve medium sıcak su banyosunda 37°C’de çözülür.
- Çözölmüş olan hücreler 50 ml’lik steril falkonda toplanır, üzerine 10 ml, %10 Fetal Sığır Serumı (Fetal Bovine Serume, FBS), %1 Penisilin/Streptomisin antibiyotiği (P/S) ve %1 L-Glutamin (L-Glu) içeren Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) besi ortamı eklenir.
- 805 rpm’de santrifüj edilir.
- Süpernatant atılır.
- 30 ml medium eklenir. 10’ar ml olarak bölünüp T25 flasklara ekilir.
- T25 flaskta 37 °C’de ve %5 CO2 içeren inkübatörde inkübe edilerek çoğaltılır.
- Hücre büyümesi her gün ışık mikroskopuyla takip edilir.
- Besi yeri taze DMEM medium ile iki günde bir değiştirilir.
- %80-90 konflüent olan hücreler flasklara pasajlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Konflüent olan hücreler (A. WM115 Primer melanom hücreleri B. SK-MEL30 metastatik melanom hücreleri.).

3.2.2. Hücre Hattının Pasajlanması

- Flask dik konumda tutularak içinde bulunan medium, hücre tabakasının olduğu yüzeye dokunulmadan pipet ile yavaşça çekilir.
- Oda ısına getirilmiş FBS'den 5 ml eklenir. Flask yavaşça hareket ettirilerek yüzey yıkanır ve FBS çekilir.
- 3 ml tripsin-EDTA eklenir. Yüzeye yavaşça yayılır. 3 dk CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrası mikroskop ile hücrelerin flask tabanından kalkıp kalkmadığı kontrol edilir.
- Hücreler kalkmış ise, flask içerisindeki tripsin-EDTA hücrelerin olduğu duvara doğru çek-bırak yapılarak hücrelerin akması sağlanır.
- Bu işlemin sonrasında pipeti flaskın tabanına oturtarak 5 defa yavaşça çek-bırak yapılır.
- Ardından 7 ml FBS flask üzerine eklenir ve süspanse edilir.
- Santrifüjde 2000 rpm'de, 10dk santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
- Pelletin üzerine medium eklenir ve pelleti çözmek için tüpün dibine birkaç defa hafifçe vurulur, flaslara bölünür.
- Yeni flask hazırlandıktan sonra ekim yapılır ve yaklaşık son hacim 20 ml olacak şekilde medium eklenir.
- Flask yavaşça eğilir ve CO₂ inkübatörüne yerleştirilir.

3.2.3. Hücre Lizatı Hazırlama

- Pasajlama protokolüne uygun olarak hücreler kaldırılır ve falkon tüpüne alınır.
- 200 g'de 5 dk santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
- Pelleti çözmek için tüpün dibine birkaç defa hafifçe vurulur ve vortekslenir.
- Tüpe taze medium koyarak 3-5 dk -80°C'de bekletilir.
- Oda ısına alınır ve eridikten sonra vortekslenir, tekrar 200 g'de 5 dk santrifüj edilir.
- Bu işlem 3 kez tekrarlanır. (-80°C /Oda ısı/Santrifüj)

- Son santrifüjden sonra pelete değmeyecek şekilde süpernatant eppendorf tüpüne çekilir.
- Lizat olarak bu süpernatant kullanılır.
- Örnek seyreltilerek istenilen konsantrasyona ayarlanır.

3.2.4. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu Invitrogen PureLink® Genomic DNA Mini Kit (K1820-01) DNA izolasyon kiti ile memeli hücre protokolü uygulanarak yapılmıştır.

- 200 µl hücre örneği 2 ml'lik eppendorf tüp içinde 200 µl PBS ile süspanse edildi.
- 20µl proteinase K ve 20 µl RNAaz eklenerek kısa vorteks yapıldı.
- 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası 200µl lysis/ binding buffer eklendi ve homojen bir çözelti elde edilene kadar vortekslendi (20-30 sn).
- Çözelti 55°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonra lizata 200 µl %96-100'lük etil alkol eklenerek 5 sn vortekslendi.
- Lizat (~640 µL), spin kolonlara dikkatli bir şekilde aktarıldı.
- Spin kolon oda sıcaklığında, 10.000 x g'de, 1 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak temiz bir toplama tüpüne kolon yerleştirildi.
- 500µl Wash Buffer 1 eklenip, oda sıcaklığında, 10.000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak temiz bir toplama tüpüne kolon yerleştirildi.
- 500µl Wash Buffer 2 eklenip, oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası toplama tüpü atılarak temiz bir toplama tüpüne kolon yerleştirildi.
- 50µl elution buffer eklenip, oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi.

- İnkübasyon sonrası, oda sıcaklığında, maksimum hızda, 1 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası spin kolon çıkarılıp atıldı. Toplama tüpü saflaştırılmış genomik DNA içermektedir.

DNA parametreleri (konsantrasyon ve kalite) Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 cihazı ile belirlendi. 260 nm ve 280 nm dalga boylarında okumalar alındı. Optik yoğunluk (OD) oranı (A_{260} / A_{280}) otomatik olarak hesaplandı.

Saflık için standart parametre olarak, 1.7-2.0'lık bir OD değerinde ve 5 ng/μl konsantrasyonda DNA kullanıldı.

3.2.5. Hotspot Panel Dizileme

Ion AmpliSeq™ Kanser Hotspot Paneli v2, sıklıkla insan kanseri genlerinde mutasyona uğrayan "Hotspot" bölgelerden ampikon kütüphanelerinin hazırlanması için multipleks PCR gerçekleştirmek için kullanılan primer havuzudur (135).

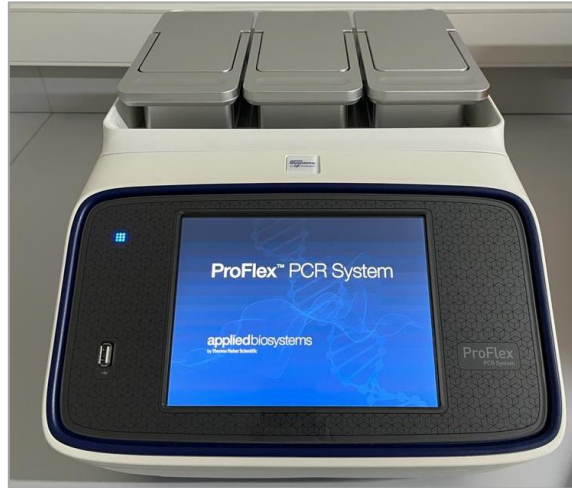
Kullanılan Ampliseq Cancer Hotspot DNA Panel v2 ile belirli genlerde seçilen hotspot SNV'ler (>2800 COSMIC veri tabanında yer alan mutasyonlar) eşzamanlı hem forward hem de reverse yönde multiplex olarak sekanslanmıştır (135).

- DNA'lar 5 ng/μl olacak şekilde seyreltilti. Spektrofotometrik okuma sonrası Qubit dsDNA HS Assay Kit ile florometrik ölçüm yapıldı (Resim 3.1).



Resim 3.1. Qubit 4 Fluorometer.

- 2 farklı primer havuzu içerisinde 50’den fazla hedef gen bölgesinin amplifikasyonu için Ion Library Kit Plus kullanıldı ve PCR plate’i üzerinde ayrılmış kuyucuklara önceden dağıtılmış örnek DNA ları ile birleştirilerek multiplex amplifikasyon yapıldı (Resim 3.2).



Resim 3.2. ProFlex PCR System.

- İndeks ve adaptör dizilerinin eklenmesi için DNA parçaları FuPa adlı enzim kimyasalı ile yapışkan uç haline getirilerek modifiye edildi.

- DNA parçalarının aynı anda amplifikasyonu ve okuma yapılabilmesi için adaptör ve indeks dizileri ile barkodlanması ve etiketlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle DNA ligaz enzimi kullanılarak adaptör ve barkotların ampliconlara bağlanması sağlandı.
- Manyetik boncuklar kullanılarak saflaştırılan kütüphane, sırası ile emülsiyon PCR, zenginleştirme ve çipe yükleme işlemleri için Ion Chef (Resim 3.3) sistemine yüklendi. Böylece bu adımlar otomatik olarak cihaz tarafından yapıldı.
- Barkotlama ve adaptörleme işlemleri ile birlikte yaklaşık 200-225 bp uzunluğundaki DNA dizilerinin okunması Ion Torrent™ Ion S5 cihazında (Resim 3.4) Ion S5 520 çip kullanılarak tamamlandı.
- Toplamda 5 Milyon okuma kapasitesine sahip çip ile aynı anda 4 DNA örneği ortalama 1000X okuma derinliği ile sekanslanmıştır.



Resim 3.3. Ion Chef™ Instrument.



Resim 3.4. Ion Torrent™ Ion S5.

3.2.6. Veri Analizi

- Biyoinformatik analiz kapsamında yeni nesil dizileme platformundan elde edilen yaklaşık 225bp ‘single-end dizi’ ham verileri (fastq veya UBAM) kullanıldı.
- DNA dizi verilerinin 5’ ve 3’ uçları daha önce sistemde belirlenen kalite parametreleri göz önüne alınarak belli uzunluklarda (primer, A adaptör, P1 adaptör ve Barkod adaptör) ile kesilip (sequence trimming), elde edilen dizi okuma sonuçları, Torrent Suite V5.8.4 yazılımı aracılığıyla referans insan genom (hg19/GRCh37.p13) dizisine göre hizalandı.
- Hizalama işlemi sonrasında varyantların belirlenmesi Torrent Variant Caller (TVC) ile gerçekleştirildi.
- Tek nükleotid değişimleri ve küçük indellerin lokasyon belirlenmesi, amino asit değişimleri, fenotip etkenleri gibi mutasyon tarama için eşleştirilmiş dizi okumaları Ion Reporter™ ve IGV (Integrative Genomics Viewer, Broad Institute) programları kullanılarak yapıldı.
- Ion Reporter™ platformunda oluşturulan filtrelemede benign, tespit edilen varyasyon yüzdesine göre güvenilir olmayan (<%20) varyasyonlar ve tespit

edilen varyasyonların okunma derinliğine göre güvenilir olmayan (<100x) varyasyonlar elenerek analiz yapıldı.

- Kalite skoru 30'un altında olan varyantlar elendikten sonra, tespit edilen varyasyonların daha önce tanımlanıp tanımlanmadığı “dbSNP”, “HGMD”, “5000 Exomes” ve “1000 genomes”, “COSMIC” gibi in silico programlar ve in house veritabanları aracılığıyla araştırıldı.



4. BULGULAR

Primer melanom hücre (WM115) hattında mutasyon tespit edilen genler ve mutasyonlar: *ERB4* geninde intronik c.884-8_884-7delTT (Variant of uncertain significance (VUS), c.884-21_884-18delinsTTTC (VUS) ve c.421+58A>G varyantı (Benign), *BRAF* geninde 15. ekzonda c.1799_1800delTGinsAT ve c.1799T>A varyantları (Patojenik), *FGFR3* geninde 9. ekzonda c.1205C>T (VUS), *MET* geninde 14. ekzonda c.3029C>T (VUS), *FLT3* geninde intronik c.1310-3T>C (Benign), *TP53* geninde 4. ekzonda c.215C>G (Benign) olmak üzere 9 tanedir. Mutasyon saptanan genlerin ilişkili olduğu hücre yolakları Tablo 4.1’de belirtildiği gibi; ErbB Sinyal İletim Yolağı, MAPK Sinyal İletim Yolağı, Hücre proliferasyonu, Neoanjiyogenez, Aktin Hücre İskeletinin Düzenlenmesi, RET sinyal iletim yolağı, Hücre Döngüsü, Apoptosis, DNA tamir mekanizması, Androjen Reseptörü Sinyal İletim Yolağı’dır. *ERBB4* ve *BRAF* geninde 2’şer adet ve diğer genlerde ise 1’er adet mutasyon gözlenmiştir.

Metastatik melanom hücre hattında (SK-MEL30) mutasyon tespit edilen genler ve mutasyonlar: *VHL* geninde 1. ekzonda c.259_261delGTainsTTG (Muhtemel Patojenik), *FBXW7* geninde 10. ekzonda c.1469_1470delCAinsGC (VUS), *MET* geninde 2.ekzonda c.507_508delCAinsAG (VUS), c.483A>G (VUS), c.563T>A (VUS), c.1028T>A (VUS), c.1048A>C (VUS), c.1116C>G (VUS), intronik c.2942-20T>C (VUS), *SMO* geninde 3.ekzonda c.584_585delTGinsCA (VUS) ve c.575A>G (VUS), *ATM* geninde 39.ekzonda c.5779_5780delATinsGC (VUS) ve c.5785A>G (VUS), *SMAD4* geninde 5.ekzonda c.516_517delGTinsAC (VUS) ve c.589A>G (VUS), *PIK3CA* geninde intronik c.1251+10T>C (VUS), c.1251+18G>T (VUS), c.1251+30T>C (VUS), *NOTCH1* geninde 26.ekzonda c.4793G>A (VUS), c.4763G>A (VUS), c.4740G>C (VUS), c.4738A>C (VUS), *KRAS* geninde intronik c.112-6T>C (VUS), c.112-10C>A (VUS), *ERBB2* geninde intronik c.2307+16C>T (VUS), *SMARCB1* geninde intronik c.1119-41G>A (Benign) olmak üzere 24 tanedir. Mutasyon saptanan genlerin ilişkili olduğu hücre yolakları Tablo 4.2’de belirtildiği gibi; ERK Sinyal İletim Yolağı, ErbB Sinyal İletim Yolağı,

Notch Sinyal İletim Yolağı, Hedgehog Sinyal İletim Yolağı, Homoloji Destekli Onarım Yolağı (Homology Directed Repair, HDR), Kanonik ve Kanonik Olmayan TGF-Beta Sinyal İletim Yolağı, RET Sinyal İletim Yolağı, Sonic Hedgehog Sinyal İletim Yolağı'dır. *MET* geninde 7 adet, *NOTCH1* geninde 4 adet, *PIK3CA* geninde 3 adet, *SMO*, *ATM*, *KRAS*, *SMAD4* genlerinde 2'şer adet, diğer genlerde 1'er adet mutasyon gözlenmiştir.

Primer ve metastatik melanom hücre hatlarında yapılan Hotspot panel çalışması sonucunda saptanan mutasyonlar, mutasyon sınıflaması ve hangi hücre yolağında etkili oldukları Tablo 4.1., Tablo 4.2.' de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. WM115 Primer Melanom Hücre Hattında Tespit Edilen Hotspot Mutasyonlar.

Gen	Transkript	Mutasyon	Amino asit dönüşümü	Mutasyon sınıflaması	İlişkili yolk
<i>ERBB4</i>	NM_005235.3	c.884-8_884-7delTT	-	VUS	ErbB Sinyal İletim Yolağı
		c.884-21_884-18delinsTTTC	-	VUS	
<i>BRAF</i>	NM_004333.6	c.1799_1800delTGinsAT	p.Val600Asp	Patojenik	MAPK Sinyal İletim Yolağı
<i>ERBB4</i>	NM_005235.3	c.421+58A>G	-	Benign	ErbB Sinyal İletim Yolağı
<i>FGFR3</i>	NM_000142.4	c.1205C>T	p.Pro402Leu	VUS	Hücre proliferasyonu, neoangiogenesis, Aktin Hücre İskeletinin Düzenlenmesi
<i>MET</i>	NM_001127500.3	c.3029C>T	p.Thr1010Ile	VUS	RET sinyal iletim yolağı, Fokal Adezyon
<i>BRAF</i>	NM_004333.6	c.1799T>A	p.Val600Glu	Patojenik	MAPK Sinyal İletim Yolağı
<i>FLT3</i>	NM_004119.3	c.1310-3T>C	-	Benign	Hücre proliferasyonu, antiapoptotik etki
<i>TP53</i>	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	Benign	Hücre Döngüsü, Apoptosis, DNA tamir mekanizması, AR Sinyal İletim Yolağı

Tablo 4.2. SKMEL30 Metastatik Melanom Hücre Hattında Tespit Edilen Hotspot Mutasyonlar.

Gen	Transkript	Mutasyon	Amino Asit Dönüşümü	Mutasyon Sınıflaması	İlişkili Yolak
<i>VHL</i>	NM_000551.4	c.259_261delGTAAinsTTG	p.Val87Leu	Muhtemel Patojenik	ERK Sinyal İletim Yolağı
<i>FBXW7</i>	NM_033632.3	c.1469_1470delCAinsGC	p.Thr490Ser	VUS	Notch Sinyal İletim Yolağı
<i>MET</i>	NM_001127500.3	c.507_508delCAinsAG	p.[Pro169=; Ser170Gly]	VUS	RET Sinyal İletim Yolağı
<i>SMO</i>	NM_005631.5	c.584_585delTGinsCA	p.Val195Ala	VUS	Hedgehog Sinyal İletim Yolağı
<i>ATM</i>	NM_000051.3	c.5779_5780delATinsGC	p.Ile1927Ala	VUS	HDR Sinyal İletim Yolağı
<i>SMAD4</i>	NM_005359.6	c.516_517delGTinsAC	p.[Leu172=; Ser173Pro]	VUS	TGF-Beta Sinyal İletim Yolağı
<i>PIK3CA</i>	NM_006218.4	c.1251+10T>C	p.?	VUS	RET Sinyal İletim Yolağı
<i>PIK3CA</i>	NM_006218.4	c.1251+18G>T	p.?	VUS	RET Sinyal İletim Yolağı
<i>PIK3CA</i>	NM_006218.4	c.1251+30T>C	p.?	VUS	RET Sinyal İletim Yolağı
<i>MET</i>	NM_001127500.3	c.483A>G	p.Ile161Met	VUS	RET sinyal iletim yolağı, Fokal Adezyon
<i>MET</i>	NM_001127500.3	c.563T>A	p.Val188Glu	VUS	RET sinyal iletim yolağı, Fokal Adezyon
<i>MET</i>	NM_001127500.3	c.1028T>A	p.Phe343Tyr	VUS	RET sinyal iletim yolağı, Fokal Adezyon
<i>MET</i>	NM_001127500.3	c.1048A>C	p.Lys350Gln	VUS	RET sinyal iletim yolağı, Fokal Adezyon
<i>MET</i>	NM_001127500.3	c.1116C>G	p.Asp372Glu	VUS	RET sinyal iletim yolağı, Fokal Adezyon
<i>MET</i>	NM_001127500.3	c.2942-20T>C	p.?	VUS	RET sinyal iletim yolağı, Fokal Adezyon
<i>SMO</i>	NM_005631.5	c.575A>G	p.Gln192Arg	VUS	Hedgehog Sinyal İletim Yolağı
<i>NOTCH1</i>	NM_017617.5	c.4793G>A	p.Arg1598His	VUS	Notch Sinyal İletim Yolağı
<i>NOTCH1</i>	NM_017617.5	c.4763G>A	p.Ser1588Asn	VUS	Notch Sinyal İletim Yolağı
<i>NOTCH1</i>	NM_017617.5	c.4740G>C	p.Met1580Ile	VUS	Notch Sinyal İletim Yolağı
<i>NOTCH1</i>	NM_017617.5	c.4738A>C	p.Met1580Leu	VUS	Notch Sinyal İletim Yolağı
<i>ATM</i>	NM_000051.3	c.5785A>G	p.Asn1929Asp	VUS	HDR Yolağı
<i>KRAS</i>	NM_033360.4	c.112-6T>C	p.?	VUS	RET Sinyal İletim Yolağı
<i>KRAS</i>	NM_033360.4	c.112-10C>A	p.?	VUS	RET Sinyal İletim Yolağı
<i>ERBB2</i>	NM_004448.3	c.2307+16C>T	p.?	VUS	ErbB Sinyal İletim Yolağı
<i>SMAD4</i>	NM_005359.6,	c.589A>G	p.Thr197Ala	VUS	TGF-Beta Sinyal İletim Yolağı
<i>SMARCB1</i>	NM_003073.5	c.1119-41G>A	p.?	Benign	Hücre döngüsü, WNT, Sonic Hedgehog Sinyal İletim Yolağı

5. TARTIŞMA

Kanserin en önemli özelliklerinden biri neoplastik hastalığın kompleks yapısını organize etmek için bir düzen oluşturmaktır. Bu amaçla, temel ayırt edici özelliklerin yanı sıra büyüme sinyallerine bağımlı olmadan kendi kendine yetebilme, bağışıklık sisteminden kaçış, enerji metabolizmasını yeniden programlama, sınırsız replikasyon potansiyeli, büyüme inhibitörü sinyallerine duyarsızlık, apoptozdan kaçış, kanserleşmeyi teşvik eden inflamasyon, anjiyogenez gelişmesi, genom instabilitesi ile invazyon ve metastaz yeteneğini amacına uygun olarak gerektiği her an ve her yerde kullanır. Bu kavramların kanser gelişimindeki rolü konusunda artan bilgilerimiz kanserin tedavisinde yeni araçların geliştirilmesini giderek daha fazla etkilemektedir (31).

Tüm kanserler, kanser hücrelerinin genomlarının DNA diziliminde meydana gelen değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu değişikliklerin çoğu yetişkin bir insanda, sınırlı anormal büyüme potansiyeline sahip ve görünmez olarak veya cilt benleri gibi yaygın iyi huylu büyüme olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, zaman zaman, tek bir hücredeki değişiklik, hücrenin otonom bir şekilde çoğalmasına, dokuları işgal etmesine ve metastaz yapmasına izin veren bir dizi mutasyon elde etmesi neticesinde kanserle sonuçlanmaktadır (136).

Kanser hücrelerine ek olarak, "tümör mikroçevresi" hakkında elde ettiğimiz bilgiler ve bu mikroçevrenin kanser hücreleri ile iletişimi sonucu metastazın gelişimine sunduğu katkı da tedavi modellerinin geliştirilmesinde oldukça önemli hale gelmiştir (31).

Sürücü (öncü, driver) Mutasyonlar, normal bir hücrenin kansere dönüşümüne sebep olan mutasyonlardır ve genelde hücrenin çoğalması ve yaşamı için kritik önemi olan sinyal ileti proteinlerinin genlerinde görülür. Bu mutasyonların varlığı kanser hücrelerine büyüme avantajı sağlar, kişinin kanser olmayan hücrelerinde görülmez ve genelde bir tümörde aynı anda birden fazla sürücü mutasyon saptanmaz (137). Kanser hücrelerine büyüme avantajı sağlamayan, onkogenik fenotip için önemli olmayan

mutasyonlar ise Yolcu (passenger) Mutasyonlardır (137). Çalışmamızda kullandığımız paneldeki genler yaygın tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerdir. Test edilen genlerin hepsi kanserin başlaması, ilerlemesi veya metastazında rol oynayan sürücü genlerdir. Ion Ampliseq Cancer Hotspot DNA Panel v2'de test edilen varyantlar, meme, yumurtalık, akciğer, kolorektal, karaciğer, cilt, beyin ve kan dahil olmak üzere bilinen tüm kanserler ile ilişkilidir (14).

Melanom yatkınlığı oluşturan genler tipik olarak düşük, orta ve yüksek penetranslı genler olarak gruplandırılmaktadır. Melanom risk genleri, melanom büyüme yollarını etkilemek ve etkinleştirmek için diğer genler veya çevresel risk faktörleri ile doğrudan etkileşime girebilmektedir (12). Son yıllarda, melanomun genomik özelliklerine ve mutasyonlarına ilişkin bilgimizde önemli artış olmuştur. Birkaç öncü çalışma arka planda yer alan karmaşık yolcu mutasyonlarından ve önemli sürücü mutasyonların kesin olarak ayırt edilip tanımlanmasına katkıda bulunmuştur. Ayrıca bu mutasyonlardan işlevsel olarak kullanılabilen olanları sınıflandırmayı amaçlayan çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Örneğin, Vogelstein ve arkadaşları bir öncü genin onkogen olarak tanımlanabilmesi için bu gende saptanan mutasyonların en az %20'sinin yanlış anlamlı mutasyon (missense) olması gerektiğini ve aynı şekilde tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanabilmesi içinse meydana gelen mutasyonların %20'sinin inaktifleştirici olması gerektiğini belirten "20' de 20 Kuralı" nı ortaya atmışlardır (138). Ayrıca Stratton ve arkadaşlarının yaptığı matematik modellemeleri çalışmasında kanser gelişimi için 5-8 sürücü mutasyonun gerekli olduğu tahmininde bulunmuşlardır (136, 139).

Bununla birlikte, yolcu mutasyonlarının sayısı, sürücü mutasyonlarının sayısı ile karşılaştırıldığında çok daha fazla sayıda oldukları görülmektedir. Bizim çalışmamızda kullandığımız hotspot paneli içinde yer alan genler sürücü mutasyonlar olarak seçilmiş ve dizayn edilmişlerdir. Buna rağmen WM115 ve SK-MEL30 hücre hatlarında hotspot mutasyon paneli seçilerek yapılan yeni nesil dizileme çalışmasında Primer Melanom Hücre hattında sadece 9 mutasyon (7 gen) görülürken, Metastatik Melanom Hücre hattında 26 adet mutasyon (10 gen) görülmüştür. Bu oransal farkın ($26/9= 2,99$) özellikle PIK3CA/RET Sinyal İletim Yolağı, MET/ RET sinyal iletim yolağı-Fokal Adezyon, NOTCH1/ Notch Sinyal İletim Yolağı, KRAS/RAS/MAPK

yolağı, RET Sinyal İletim Yolağı genlerinden kaynaklandığı ve genlerden *MET* geninde 7 adet, *NOTCH1* geninde 4 adet, *PIK3CA* geninde 3 adet, *ATM* geninde 2 adet, *KRAS* geninde 2 adet, *SMAD4* geninde 2 adet mutasyon saptandığı görülmüştür.

KRAS geninin içinde yer aldığı MAPK Sinyal İletim Yolağı özellikle fosforilasyon olaylarında önemli rol oynayan bir tümöregenezis mekanizması yolağıdır. Bu yolağın aktive edilmesi, hücre büyümesi regülasyonunda, farklılaşmada, çoğalmada, apoptosiz ve migrasyon fonksiyonlarında anahtar rol oynar. Özellikle fonksiyon kazandıran ve reseptör protein kinazların anormal aktivite kazanmasını sağlayan mutasyonlar nedeniyle kanserlerde sıkça rastlanan yolaklardandır (140).

MET geninin içinde yer aldığı RET sinyal iletim yolağı-Fokal Adezyon, hücre büyümesi, çoğalması, morfogenezis ve metastazda etkin bir yolağın parçasıdır (141). Güncel bilgiler ışığında Reseptör tirozin kinazların da içinde yer aldığı çeşitli sinyal yollarının, öncü melanositik lezyonların ve malign melanomun etyopatogenetik gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında hepatosit büyüme faktörü/*MET* geni, sadece tümörün kendisinde değil, aynı zamanda tümörün büyüdüğü ve gelişiminde ilerlediği immün mikroçevrede de kritik bir oyuncu olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, bu yolun aktivasyonunun, modern hedefli tedavilere karşı tümör direncinin bir bulgusu olarak değerlendirildiği ve hasta örneklerinde ifadesinin ölçülmesinin, tümör ilerlemesinin ve hedefe yönelik tedaviye yanıtın değerli bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir (142).

Bizim çalışmamızda Metastatik Melanom hücre hattında en çok mutasyon *MET* geninde görülmüştür. Bu mutasyonların fonksiyon kazandıran mutasyonlar olması halinde bu yolağın aktivasyonundaki ifade artışının, tümörün ilerlemesi ve direnç mekanizması kazanması anlamına gelebileceği düşünülmüştür. Ne yazık ki çalışmanın sınırlamaları gereği tümör hücre hattında gen ifade profiline bakılamadığı için fonksiyon kazandıran mutasyonlar olup olmadığı hakkında kesin bir yorum yapılamamaktadır.

Bazı çalışmalar, Notch sinyal yolunun melanomlarda pro-tümörijenik olduğunu düşündürmektedir. Notch1 ekspresyon seviyeleri, melanomların %50-60'ında ve melanom hücre dizilerinde %65'inde yüksek olarak bulunurken, normal melanositlerde ve nevüslerde çok düşük veya saptanamaz düzeydedir. Notch; Melanom hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını desteklemesinin yanı sıra, tümörün daha agresif bir fenotiple seyretmesine sebep olmaktadır. (143). Bizim çalışmamızda Primer Melanom hücre hattında *NOTCH1* geninde hiç mutasyon görülmezken Metastatik Melanom hücre hattında 4 adet mutasyon görülmüştür. Bu mutasyonların fonksiyon kazandıran mutasyonlar olup olmadığı bilinmemekle birlikte Metastatik Melanom hücre hattında fazla sayıda görülmüş olması nedeniyle daha agresif bir kliniğe neden olabileceği yönünde düşünülmüştür.

Kendroth ve arkadaşlarının 11 yetişkin kanser türünden alınan örneklerde yaptığı bir çalışmada ekzonlarda ortalama 200 somatik nokta veya küçük ekleme/silme (indel) mutasyonu saptandığı bunlardan sadece 2 ila 6 mutasyonun sürücü olduğu öngörülmüştür. (144).

Benzer şekilde, Vogelstein ve arkadaşlarının yaygın solid tümörlerde yaptığı bir çalışmada ise protein değiştiren somatik mutasyonlara sahip sürücü genlerin ortalama toplamda 33 /66 gene ulaştığı görülmüş olmasına rağmen örnek başına sadece 3 ila 6 mutasyona uğramış genin sürücü olduğu tahmin edilerek rapor edilmiştir (138). Bizim çalışmamızda ise Metastatik Malonom hücre hattında 10 farklı gende 26 sürücü mutasyon bulunmuş olup bu durum bu hücre hattının çok agresif ve çeşitli hedefli tedavilere direnç gelişmiş bir tümörden elde edildiğini düşündürmüştür.

Yeni nesil dizileme ile tüm mutasyonların işlevsel olarak pratik bir şekilde tespit edilebilmesi, sürücü mutasyonlardan çok daha fazla yolcu mutasyonların var olduğunu göstermiştir. Bulunan genomik değişikliklerden, hangi genlerin ve mutasyonların büyük olasılıkla daha etkin olacağını tahmin etmek için biyoinformatik yöntemler geliştirilmiştir. Bu biyoinformatik analizlerin sonucunda en olası adaylara daha sonra fonksiyonel testler ile bakabilmek için iş gücünün azaltılması hedeflenmiştir. Bu biyoinformatik analizlerde iki ana yaklaşım vardır: Bir tanesi mutasyonların sıklığının değerlendirilmesi, diğeri ise mutasyonların işlevsel etkisini

tahmin etmektir (145). Ancak, biz çalışmamızda sadece sürücü mutasyon paneli çalıştığımız için seçilecek fonksiyonel testlerinin yapılması ile ilgili herhangi bir yorum yapmayı uygun bulmadık.

Melanomun gelişimine ve ilerlemesine birçok hücre sinyali yolağı katılmaktadır. Bunların arasında melanoma patogenezisinde iki RAS sinyal iletim ağı önemli rol oynar. Bunlar; PI3K/AKT/mTOR ve BRAF/MEK/ERK yolağıdır (146).

Bizim çalışmamız da göstermiştir ki her iki hücre hattında bu yolaklar ile ilişkili farklı yolaklarda genetik teknolojisindeki hızlı ilerleme gelişen sürücü mutasyonlar arasındaki sayısal farklılıklar ve değişik genlerde gelişen sürücü mutasyonlar hem melanomun gelişmesinde, hem de metastatik melanom hücre hattında fonksiyon kazandıran mutasyonlar neticesinde bozulmuş sinyal ileti yolu nedeniyle hücre çoğalmasının artması, otonomi kazanması, metastaz yapabilecek etkinliğin kazanılması ve çeşitli hedef tedavilere direnç kazanılması gibi özellikler elde edilmesine neden olmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız sonucunda WM115 ve SK-MEL30 hücre hatlarında yapılan Hotspot mutasyon paneli ile yeni nesil dizileme çalışmasında Primer Melanom hücre hattında 7 gende 9 mutasyon görülürken, Metastatik Melanom hücre hattında 10 gende 26 mutasyon saptanmıştır. Bu oransal farkın ($26/9=2,99$) özellikle PIK3CA/RET Sinyal İletim Yolağı, MET/ RET sinyal iletim yolağı-Fokal Adezyon, Notch Sinyal İletim Yolağı, KRAS/RAS/MAPK Yolağı, RET Sinyal İletim Yolağı genlerinden kaynaklandığı görülmüştür. Bu genlerden *MET* geninde 7, *NOTCH1* geninde 4, *PIK3CA* geninde 3, *ATM* geninde 2, *KRAS* geninde 2, *SMAD4* geninde 2 mutasyon saptanmıştır. Her iki hücre hattında bu yolaklarda gelişen sürücü mutasyonlar arasındaki sayısal farklar ve değişik genlerde gelişen sürücü mutasyonlar hem melanomun gelişiminde hem de metastatik melanomda fonksiyon kazandıran mutasyonlar sonucunda bozulmuş sinyal iletim yolu nedeniyle hücre çoğalmasının artması, metastaz yapabilecek itici gücün kazanılması ve hedef tedavilere direnç kazanılması gibi özellikler elde edilmesine neden olmuştur.

Günümüzde yeni teşhis ve tedavi stratejileri geliştirmek amacıyla mutasyonların klinik önemini anlamaya çalıştığımız çeşitli araştırmalar insanlığın kanser ile olan savaşında oldukça önemlidir. Somatik genetik mutasyonların bir kısmı tümör oluşumu ve ilerlemesinde rol oynamanın yanı sıra tedaviye dirençle ilgili mekanizmalarla da ilişkilidir. Bu nedenle hassas tıp çağına girerken, genomik değişikliklerin bir bireyin hastalığının ve tedavisinin tüm yönleriyle ilişkisini anlamak için son derece önemli bilgiler haline geldiğinin farkındayız (147).

Melanomdaki öncü mutasyonları karakterize etmede önemli bir ilerleme kaydetmiş olsak da belirlenen mutasyonlarla ilgili keşfedilecek, öğrenilecek ve araştırılması gereken daha çok bilinmeyen alan mevcuttur. Bu nedenle klinik öneme sahip olabilecek nadir mutasyonların tespitine olanak sağlayacak kadar büyük hasta kohortları ile çalışmak büyük öneme sahiptir. Bunun yanı sıra genomdaki kodlanmayan bölgedeki mutasyonların etkisinin araştırılması da gittikçe önemli hale

gelmiştir. Örneğin bizim çalışmamızda yer almayan özellikle 5' UTR (Untranslated region) ve promotor bölgelerinde, transkripsiyon faktörü bağlama bölgelerini modüle eden veya onkojenik transkript izoformları oluşturan birkaç önemli öncü mutasyon tespit edilmiş olması, buna ek olarak, 3' UTR' deki somatik mutasyonların, yolakların downstream yönünde düzenlemesi için gerekli olan mikroRNA bağlanma bölgelerini bozduğunun gösterilmesi kayda değer gelişmeler arasında sayılmaktadır (148). Genetik teknolojisindeki hızlı ilerleme ile birlikte veri setlerinin kapsamlı ve entegre bir şekilde veri analizinde gelişen yaklaşımlar bizi özellikle Metastatik Melanomlu hastalar için daha iyi tedavi seçenekleri konusunda hedefe bir adım daha yaklaştırmaktadır (147).



KAYNAKLAR

1. Aktaş D. Genetik ve Kanser. İçinde: Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Alikashiçoğlu M. (eds) *Tıbbi Genetik*, Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 6, Ankara, Güneş Kitabevi, 2005:311-333
2. Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton MR. Cancer and genomics, *Nature*, 2001, 409(6822):850-2.
3. Clavel J. Progress in the epidemiological understanding of gene-environment interactions in major diseases: cancer. *CR Biol.*, 2007, 330(4):306–317.
4. Martin TA, Ye L, Sanders AJ, et al. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/>
5. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*, AICR, 2007:30-48.
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *Cancer J Clin.*, 2018, (68):394-424
7. Pavlopoulou A, Spandidos DA, Michalopoulos I. Human cancer databases (review). *Oncol Rep.*, 2015, 33(1):3-18.
8. Özçelik S, Akyol M. Melanoma epidemiyolojisi, *Türkderm*, 2007, 41:2:1-5
9. Giblin AV, Thomas JM, Incidence, mortality and survival in cutaneous, Melanoma Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2007, 60:32-40.
10. Kızılbey K, Akdeste ZM. Melanoma kanser, *Sigma: Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 2013, (31):555-569.
11. Bandarchi B, Jabbari CA, Vedadi A, Navab R. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells, *J Clin Pathol.*, 2013, 66:644-648
12. Read J, Wadt KAW, Hayward NK, Melanoma genetics, *J Med Genet.*, 2016, 53:1–14. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103150

13. Hartl DL. Molecular Mechanisms of Mutation and DNA Repair. In: Hartl DL (ed). *Essential Genetics and Genomics*, 7th ed. Burlington, Jones & Bartlett Learning, 2020:381-415.
14. Primbio Cancer Hotspot Panel. <https://www.primbioresearch.com/cancer-hotspot-panel.html>. 10 Aralık 2020.
15. Fışkım K. Kanser ve Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi. İçinde: Genetik Kavramlar, Sümer S, Açık L, Tuncer M. (Çeviri editörleri). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, 11. Baskı, Ankara, Palme Yayınevi, 2018:469-488
16. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/what-cancer>. 01 Aralık 2020.
17. Doğruoğlu B. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserli Hastalarda Egfr Gen Mutasyon ve Amplifikasyonlarının Real Time Pcr ve Fish Analizleri ile Belirlenmesinin Hastalık Tanısındaki Öneminin Araştırılması, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi, 2014.
18. Kumar R, Srivastava R, Srivastava S. Detection and Classification of Cancer from Microscopic Biopsy Images Using Clinically Significant and Biologically Interpretable Features. *Journal of Medical Engineering*, 2015:457906.
19. Malarkey DE, Hoenerhoff M, Maronpot RR. Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, Bolon B, Ochoa R, Mahler BW (eds). *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*, 3 rd ed. Academic Press. 2013:107-146
20. Nussbaum RL. McInnes RR. Willard HF. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, Sixth Edition. Philadelphia, PA, W.B. Saunders; 2001:311-333.
21. Baba I, Cătoi C. *Comparative Oncology Alecsandru*. Bucharest (RO), The Publishing House of the Romanian Academy, 2007.
22. Henry C, Pitot MD. The molecular biology of carcinogenesis, *Cancer*, 1993, 72(3 Suppl):962-70.
23. İçli F, Akbulut H. Onkolojiye Giriş. İçinde: Biberoglu K, Süleymanlar G. (eds). *İç Hastalıkları*. Güneş Kitapevi, 2005:2007-2014.

24. Lahtz C, Pfeifer GP. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer, *J Mol Cell Biol.*, 2011, 3(1):51-58.
25. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer, *The urnal of Pathology*, 2012, 226:352–364. doi: 10.1002/path.3022
26. Geçkil H. Bilim Blogu. Hücre döngüsü ve kanserle ilişkisi <https://bilimblogum.wordpress.com/2017/03/10/haftanin-posteri-hucre-dongusu-ve-kanser/>. 06 Aralık 2020.
27. Park MT, Lee SJ. Cell cycle and cancer, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 36(1):60-65.
28. Vermeulen K, VanBockstaele DR, Berneman Z N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 2003, 36:131- 149.
29. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.*, 1995, 9(10): 1149-1163.
30. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2008, 9(3):51-61.
31. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 2011, 144(5):646-674. PMID: 21376230. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
32. Lazebnik Y. What are the hallmarks of cancer?, *Nature reviews Cancer*, 2010, 10:232-235.
33. Murti G, Kim SH. Cell Cycle Regulation and Cancer. In: Klug WS, Cummings MR, Spencer CA.(eds). *Concepts of Genetics*, 8th ed. New Jersey, Pearson, 2013, 434-456
34. Manning AL, Dyson NJ. RB: mitotic implications of a tumour suppressor. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(3):220-226. PMID: 22318235. DOI: 10.1038/nrc3216
35. Pehlivanoglu B vd. Neoplastik Hastalıkların Moleküler Patolojik Mekanizmaları, 2019, 3(2), 62-80.
36. Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol* 2011, 223(2):116-126. PMID: 21125670. doi: 10.1002/path.2784
37. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer, *Cell*, 2000,100(1):57-70. PMID: 10647931

38. Koff J, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer, *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 16(2):2942–2955.
39. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Neoplasia. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC (eds). *Robbins Basic Pathology*, 9th ed. Philadelphia, Elsevier, 2013, 161-214.
40. Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., & Micheau, O. Differential Inhibition of TRAIL-Mediated DR5-DISC Formation by Decoy Receptors 1 and 2, *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26(19): 7046–7055.
41. Eröz R, Bircan D, Yüce H, Özmerdivenli R. Survivin hakkında bilinenler: Survivin ile ilgili Türkiye’de yapılmış olan çalışmalar, *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2015, 5(3):39-58.
42. Pietras K, Ostman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma, *Exp Cell Res*, 2010, 316(8):1324-1331. PMID: 20211171. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.02.045
43. Liberti MV, Locasale JW. The warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 2016, 41(3), 211–218.
44. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*, 2016, 23(1):27-47. PMID: 26771115. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.12.006
45. Aslan G. Tümör İmmünolojisi, *Türkiye Turk J Immunol*, 2010, 15:1.
46. Qian CN, Tan MH, Yang JP, Cao Y. Revisiting tumor angiogenesis: vessel co-option, vessel remodeling, and cancer cell-derived vasculature formation. *Chin J Cancer*, 2016, 35:10.
47. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11(3), 220–228. doi:10.1038/nrm2858
48. Sever R, Brugge JS. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2015;5(4). PMID: 25833940. DOI: 10.1101/ cshperspect.a006098
49. Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms, *Elsevier*, 2009, 1796(2): 293-308.
50. Özkara G, Öztürk O, Aydoğan HY. Kanser ve metastaz: Hücre adezyon molekülleri ve hücreler arası bağlantıların önemi, *Experimed*, 2020, 10(1):38-48.

51. Yadav GPD. Genetics of cancer. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ers&AN=94462087&lang=tr&site=eds-live>. 14 Aralık 2020.
52. Knudson AG. Cancer genetics, *American Journal of Medical Genetics*, 2002, 111(1).
53. Bütüner BD, Kantarcı G. Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi, *Ankara Ecz. Fak. Derg*, 2006, 35(2): 149-170.
54. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Boerkoel CF. İnsanlarda Genetik Varyasyon: Mutasyon ve Polimorfizm. İçinde: Tıbbi Genetik, Emre S, (Çeviri editörü). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, 6. Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 2005, 79-94.
55. Bozkaya ÖG. Klinisyenler için mutasyon ve polimorfizm, *Türkiye Klinikleri J Pediatr*, 2009, 18(2):147-153.
56. Schrock E, Manoir S, Reid T, Clarke R, Shiell R, McCoy W, Weaver DD, Wagner K, Lilly M. Chromosome mutations: Variation in number and arrangement. In: Klug WS, Cummings MR (eds). *Concepts of Genetics*, 8th ed. New Jersey, Pearson, 2013, 187-214.
57. Mikhail FM. Chromosomal Basis of Inheritance. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE (eds). *Principles And Practice of Medical Genetics*, 6th ed., Birmingham, Academic Press, 2013:1-26.
58. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Boerkoel CF. Klinik Sitogenetiğin Prensipleri. İçinde: Tıbbi Genetik, Utine E, Alikaşifoğlu M, (Çeviri editörleri). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*, 6. Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 2005: 135-155
59. Decraene C, Silveira AB, Bidard FC, Vallée A, Michel M, Melaabi S, Salomon AV, Saliou A, Houy A, Milder M, Lantz O, Ychou M, Denis MG, Pierga JY, Stern MH, Proudhon C. Multiple hotspot mutations scanning by single droplet digital PCR, *Clinical Chemistry*, 2018, 64(2): 317-328.
60. National Cancer Institute. What Is Cancer? <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer?> 05 Aralık 2020
61. Jaina S, Jagtap V, Pise N. Computer aided melanoma skin cancer detection using image processing, *Procedia Computer Science*, 2015, (48):735–740.

62. Yalcin H. Çeşitli özneliliklerle kötü huylu melanom karakterizasyonu, *Tıp Teknolojileri Ulusal Kongresi*, Muğla, 2015, 353-356.
63. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Melanoma: Introduction. <https://www.cancer.net/cancer-types/melanoma/introduction>. 20 Aralık 2020
64. Canan S. Deri fizyolojisi ve duyuları. https://aybu.edu.tr/sinancanan/contents/files/322009_Duyu.pdf. 10 Aralık 2020
65. Baroni A, Buommino E, Gregorio VD, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties, *Clinics in Dermatology*, 2012, 30(3):257-262.
66. Süoğlu Y. Cilt kanserleri, <https://www.yusufhansuoglu.com/cilt-kanserleri.html>. 10 Aralık 2020.
67. Madan V, Lear JT, Szeimes RM. Non-melanoma skin cancer, *The Lancet*, 2010, 375(9715):673-685.
68. Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma, *New England Journal of Medicine*, 2001, 344(13): 975-983.
69. Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care, *Molecular Oncology*, 2011, 5(2), 124–136.
70. Savage LM, Boehmer L, McBride A. Melanoma: review of pathogenesis and treatment options, *US Pharm.*, 2010, 35(9):8-16.
71. Alphonse AS, Starvin MS. A novel and efficient approach for the classification of skin melanoma, *J Ambient Intell Humaniz Comput*, 2020, <https://doi.org/10.1007/s12652-020-02648-x>
72. Akram T, Khan MA, Sharif M, Yasmin M. Skin lesion segmentation and recognition using multichannel saliency estimation and M-SVM on selected serially fused features, *J Ambient Intell Humaniz Comput*, 2018, <https://doi.org/10.1007/s12652-018-1051-5>
73. Fagnoli MC, Kostakı D, Piccioni A, Micantonio T, Peris K. Dermoscopy in the diagnosis and management of non-melanoma skin cancers, *Eur J Dermatol*, 2012, 22(4):456-463.
74. Gökdemir A, Özden MG, Bek Y, Aydın F, Şentürk N, Cantürk T, Turanlı AY. Melanositik ve non-melanositik lezyonlarda dermoskopik ve histopatolojik tanı korelasyonu. *Türkiye Klinikleri J Dermatol*, 2011, 21(1):7-16.

75. National Comprehensive Cancer Network. National Comprehensive Cancer Network melanoma practice guidelines, *Oncology*, 1998, 3:153.
76. Kasmi R, Mokrani K. Classification of malignant melanoma and benign skin lesions: implementation of automatic ABCD rule. *IET Image Process*, 2016, 10(6), 448–455.
77. Siroy AE, MacLennan GT. Primary melanoma of the bladder, *The Journal of Urology*, 2011, 185(3):1096–1097.
78. American Joint Committee on Cancer, Carcinoma of the Skin. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. (eds). *AJCC Cancer Staging Manual*, 6th ed., New York, Springer, 2002:203-204.
79. Parlak A, Çayırılı M, Parlak N, Ekin Ş. Melanoma genel bakış, *Konuralp Tıp Dergisi*, 2014, 6(1): 22-27.
80. Devrim T, Karahan N. Süleyman Demirel Üniversitesi tıp fakültesi tıbbi patoloji anabilim dalında tanı alan kutanöz malign melanom olgularının retrospektif değerlendirilmesi, *SDÜ Tıp Fak Derg.*, 2015, 22(1):8-13.
81. Keohane SG, Proby CM, Newlands C, Motley RJ, Nasr I, Mustapa MFM, Slater DN. The new 8th edition of tnm staging and its implications for skin cancer: a review by the british association of dermatologists and the royal college of pathologists, U.K., *British Journal of Dermatology*, 2018, 179(4).
82. Balch CM, Soong SJ, Atkins MB. An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. *CA Cancer J Clin.*, 2004, 54(3):131-49.
83. Cañueto J, Román-Curto. Novel additions to the ajcc’s new staging systems for skin cancer, *Actas Dermosifiliogr.*, 2017, 108(9):818-826.
84. Artaş G, Üçer Ö, Şimşek S, Dağlı FA, Varlı G. Sinovyal Membran Metastazı Gösteren Malign Melanom Olgusu, *Fırat Tıp Dergisi*, 2017, 22(1): 49-51.
85. Ostrowski SM, Fisher DE. Biology of melanoma, *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2020, 35(1): 29-56.
86. Alpay L, Ocakçioğlu İ, Aksoy F, Yalçinkaya İ. Akciğere metastaz yapan ve VATS lobektomi ile tedavi edilen malign melanom olgusu, *J Kartal TR*, 2003, 24(2):126-129.
87. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system, *J Clin Oncol.*, 2001, 19:3622-34.

88. National Cancer Institute. Browse the SEER Cancer Statistics Review 1975-2017.
https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/browse_csr.php?sectionSEL=16&pageSEL=sect_16_zfig.03#content. 12 Aralık 2020.
89. Raimondi S, Suppa M, Gandini S. Melanoma epidemiology and sun exposure, *Acta Derm Venereol*, 2020, (100):250-258.
90. Gene Cards The Human Gene Database. CDKN2AGene (Protein Coding).
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDKN2A#summaries>. 13 Aralık 2020.
91. Xiao F, Ma J, Cai G, Fang S, Lee JE, Wei Q, Amos CI. Natural and orthogonal model for estimating gene-gene interactions applied to cutaneous melanoma. *Hum Genet.*, 2014, 133:559–74.
92. Caenepeel S, Cooke K, Wadsworth S, Huang G, Robert L, Moreno BH, Parisi G, Cajulis E, Kendall R, Beltran P, Ribas A, Coxon A, Hughes PE. MAPK pathway inhibition induces MET and GAB1 levels, priming BRAF mutant melanoma for rescue by hepatocyte growth factor. *Oncotarget*, 2017, 8(11):17795-17809.
93. De Silva DM, Roy A, Kato T, Cecchi F, Lee YH, Matsumoto K, Bottaro DP. Targeting the hepatocyte growth factor/Met pathway in cancer. *Biochem Soc Trans*, 2017, 45(4):855-870.
94. Segers V.F., Dugaucquier L., Feyen E. et al. The role of ErbB4 in cancer. *Cell Oncol*, 2020, 43:335–352
95. Lau C, Killian K J, Samuels Y, Rudloff U. ERBB4 mutation analysis: emerging molecular target for melanoma treatment. *Methods Mol Biol*, 2014, 1102:461-80.
96. Savoia P, Fava P, Casoni F, Cremona O. Targeting the ERK Signaling Pathway in Melanoma. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6):1483.
97. Fang J.Y.; Richardson B.C. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol*, 2005, 6, 322–327.
98. Chang C., Lee S.O., Yeh S., and Chang T.M... Androgen receptor (AR) differential roles in hormone-related tumors including prostate, bladder, kidney, lung, breast and liver. *Oncogene*, 2014, 33:3225–3234.

99. Wang Y, Ou Z, Sun Y, Yeh S, Wang X., Long J, Chang C. Androgen receptor promotes melanoma metastasis via altering the miRNA-539-3p/USP13/MITF/AXL signals. *Oncogene*, 2017, 36:1644–1654.
100. Yang Z, Qi Y, Lai N, Zhang J, Chen Z, Liu M, Zhang W, Luo R, Kang S. Notch1 signaling in melanoma cells promoted tumor-induced immunosuppression via upregulation of TGF- β 1. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):1.
101. Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by notch. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(6):427–37.
102. Golan T, Messer AR, Amitai-Lange A, et al. Interactions of melanoma cells with distal Keratinocytes trigger metastasis via notch signaling inhibition of MITF. *Mol Cell*, 2015, 59(4):664–76.
103. Qiu H, Tang X, Ma J, et al. Notch1 autoactivation via transcriptional regulation of Furin, which sustains Notch1 signaling by processing Notch1-activating proteases ADAM10 and membrane type 1 matrix metalloproteinase. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(21):3622–32.
104. Liu ZJ, Xiao M, Balint K, et al. Notch1 signaling promotes primary melanoma progression by activating mitogen-activated protein kinase/phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathways and up-regulating N-cadherin expression. *Cancer Res*, 2006, 66(8):4182–90.
105. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci*, 2018, 18(1):8-20.
106. O'Reilly KE, de Miera EV, Segura MF, et al. Hedgehog pathway blockade inhibits melanoma cell growth in vitro and in vivo. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2013, 6(11):1429-1450.
107. Peng Y., Clark K.J., Campbell J.M, Panetta M.R., Guo Y, Ekker S.C. Making designer mutants in model organisms. *Development*, 2014, 141:4042–4054.
108. Liu M, Rehman S, Tang X, et al. Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Front Genet*, 2019, 9:691.
109. Hata A, Chen YG. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(9): a022061.

110. Ohnuki H, Jiang K, Wang D, et al. Tumor-infiltrating myeloid cells activate Dll4/notch/TGF-beta signaling to drive malignant progression. *Cancer Res*, 2014, 74(7):2038–2049.
111. Sjölund J, Boström AK, Lindgren D, et al. The notch and TGF-beta signaling pathways contribute to the aggressiveness of clear cell renal cell carcinoma. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23057.
112. WHO International Agency for Research on Cancer. Globacon 2018: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2018. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. 03 Aralık 2020.
113. Mahendraraj K, Sidhu K, Lau CS, McRoy GJ, Chamberlain RS, Smith FO. Malignant melanoma in African-Americans: a population-based clinical outcomes study involving 1106 African-American patients from the Surveillance, Epidemiology, and End Result (SEER) Database (1988–2011). *Medicine (Baltimore)*, 2017, (96): e6258.
114. Curado MP, Edwards B, Shin HR. *Cancer Incidence in Five Continents*. Vol. IX. IARC Scientific Publications No. 160, Lyon: IARC; 2007.
115. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification, *Vivo*, 2014, 28(6):1005–11.
116. Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J. Cutaneous melanomas associated with nevi, *Arch Dermatol.*, 2003, (139):1620-1624.
117. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure, *Eur J Cancer*, 2005, (41):45–60.
118. O’Sullivan DE, Brenner DR, Villeneuve PJ, Walter SD, Demers PA, Friedenreich CM, King WD. Estimates of the current and future burden of melanoma attributable to ultraviolet radiation in Canada, *Elsevier*, 2019, (122):81–90.
119. Oliveria SA, Saraiya M, Geller AC. Sun exposure and risk of melanoma, *Arch Dis Child*, 2006, 91(2):131–8.
120. Miller AJ, Mihm MC. Mechanism of disease melanoma, *N Eng J Med*, 2006, (355):51-65.

121. Türk Dermatoloji Derneği. Displastik Nevüs Nedir? http://turkdermatoloji.org.tr/media/files/file/DISPLASTIK_NEVÜS_NEDİR.pdf.
122. Yavuz GÖ, Yavuz İH. Melanositik nevüsler, *Van Tıp Dergisi*, 2014, (21):259-268.
123. Ağadayı Ö, Alsancak AD, Üstünol D, Şencan İ, Küçükceran H, Kahveci R, Özkara A. Aile hekimliği polikliniğine başvuran hastalarda malign melanom risk faktörlerinin değerlendirilmesi ve güneşten korunma hakkındaki tutumları, *Konuralp Tıp Dergisi*, 2017, 9(3):177-182.
124. Zeineldin R. Nanotechnology for cancer screening and diagnosis, *Biomaterials for Cancer Therapeutics*, 2013, 137–164.
125. Yalçın-tepe S, Özdemir Ö, Güler Z, Silan F. Günümüzde kanser tanısında kullanılan geçerli ve güvenilir moleküler tetkikler, *Türkiye Klinikleri J Med Genet*, 2017, 2(2):113-122.
126. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(12), 5463-5467.
127. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74:560-564.
128. Petersen BS, Fredrich B, Hoepfner MP, Ellinghaus D, Franke A. Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genet.*, 2017, 18 (1):14.
129. Smith M. DNA Sequence Analysis in Clinical Medicine, Proceeding Cautiously, *Front Mol Biosci.*, 2017, 4:24.
130. Hood LE, Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SBH. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis, *Nature*, 1986, 321:674-679.
131. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next generation sequencing Technologies, *Nat Rev Genet*, 2016, 17(6), 333-51.
132. Zhao M, Wang Q, Wang Q, Jia P, Zhao Z. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives, *BMC Bioinformatics*, 2013, 14(11).
133. Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology, *Trends Genet*, 2014, 30(9): 418-426.

134. Buermans HPJ, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1842(10):1932-1941.
135. Thermo Fisher Scientific. Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4475346#/4475346>. 28 Aralık 2020.
136. Stratton M, Campbell P, Futreal P. The cancer genome, *Nature*, 2009, 458:719–724.
137. Pon J R, Marra M A. Driver and Passenger Mutations in Cancer, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 2015,10: 25-50.
138. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. *Cancer genome landscapes*, *Science*, 2013, 339: 1546-1558.
139. Armitage P, Doll R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br. J. Cancer*,1954, 8(1):1–12
140. Santarpia L, Lippman S M, El-Naggar A K. Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 2012 Jan; 16(1):103–119
141. Gene Cards. MET Gene-MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MET#drugs_compounds . 21.11.2021
142. Zhou Y, Song KY, Giubellino A. The Role of MET in Melanoma and Melanocytic Lesions. *The American Journal of Pathology*, 2019,189(11)
143. de Oliveira Filho RS, Soares AL, Paschoal F M, Rezze GG, Oliveira E, Macarenco R, Buzaid AC, Ferreira LM. Literature Review of Notch melanoma recept
144. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*,2013,502(7471):333-39ors. *Surgical and Experimental Pathology*, 2019,2(27)
145. Ticha I, Hojny J, Michalkova R, et al. A comprehensive evaluation of pathogenic mutations in primary cutaneous melanomas, including the identifcation of novel loss-offunction variants. *Scientific Reports*, 2019,9:17050

146. Manca A , Lissia A, Capone M, et al. Activating PIK3CA mutations coexist with BRAF or NRAS mutations in a limited fraction of melanomas. *Journal of Translational Medicine*, 2015,13:37
147. Reddy B Y, Millefr D M, Tsao H. Somatic Driver Mutations in Melanoma. *ACS Journals*, 2017,123(S11):2104-2117
148. Zhang T, Dutton-Regester K, Brown KM, Hayward NK. The genomic landscape of cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016,29(3):266-283

