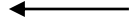


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak.



Tez, Yüksek Lisans’sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**“UVEAL MALİGN MELANOMLU HASTALARIN
PERİFERİK DOLAŞIMINDA MİRNA’LARIN
ARAŞTIRILMASI”**

“MASOUMEH HASSANİ”

**DANIŞMAN
“PROF. DR. HÜLYA YAZICI”**

**“TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI”
“KANSER GENETİĞİ PROGRAMI”**

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI



BEYAN



İTHAF

Sevgili aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Çalışmalarına gerekli rehberliği ile yön veren ve destek olan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Hülya YAZICI'ya,

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Müdürümüz Prof. Dr. Bülent Zülfikar'a,

Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hatice Bilge BECERİR'e,

İstatistiksel analizler konusunda yardımlarını esirgemeyen Dr. Demet Akdeniz'e,

Tez izleme aşamalarında destek olan Prof. Dr. Semra DEMOKAN ve Doç. Dr. Necat Vakur Olgaç'a,

Temel Onkoloji Anabilim Dalındaki tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, canım annem, babam ve kardeşlerim ve sevgili yeğenlerim'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:TDK-2019-35336

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiv
ÖZET	xviii
ABSTRACT.....	xx
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.UVEAL MALİGN MELANOMA.....	4
2.1.1.Göz anatomisi ve uveal melanoma.....	4
2.1.2.Tanı ve Tedavi.....	8
2.1.3. Epidemiyoloji.....	10
2.1.4.Risk Faktorler ve Prognoz.....	11
2.1.5. Histopatolojik Prognostik kriterler.....	12
2.1.6.Sitopatoloji.....	14
2.1.6.1.Sitogenetik Anormallikler.....	14
2.1.6.2. Moleküler Anormallikler.....	15
2.1.6.3. Epigenetik Anormallikler.....	19
2.1.7. Metastaz.....	22
2.2. MİKRORNA (miRNA).....	23
2.2.1. MikroRNA'ların Keşfi.....	23
2.2.2. MikroRNA'ların Biyogenezi ve Fonksiyonu.....	24
2.2.2.1. MiRNA Biogenezi.....	24
2.2.2.2.MiRNAFonksiyonu.....	26
2.2.3. MikroRNA'lar ve Kanser (Diagnoz, Prognoz ve Tedavi).....	27
2.2.4. Tümör Baskılayıcı ve Onkogenik mikroRNA'lar.....	29
2.2.4.1. Tümör Baskılayıcı mikroRNA'lar.....	30
2.2.4.2. Onkogenik mikroRNA'lar.....	31
2.2.5. MikroRNA'lar ve Uveal Melanoma.....	32

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1.Gereç	36
3.1.1.Materyal.....	36
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler.....	36
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	36
3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	37
3.2. Yöntem.....	37
3.2.1. Periferik Kandan Serum / Plazma ve Lenfosit İzolasyonu.....	38
3.2.2. RNA İzolasyonu.....	38
3.2.3.Agoroz Jelde RNA'ların Kontrolü.....	39
3.2.3.1. Agaroz Jel Hazırlanma aşaması.....	39
3.2.3.2. Örneklerin Agaroz Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi.....	39
3.2.4.RNA Konsantrasyon Ölçmesi Aşaması.....	39
3.2.5. cDNA Sentezi aşaması.....	40
3.2.6.Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT qPCR)....	41
3.3. Değerlerin Hesaplanması ve İstatistiksel Analizler.....	42
3.3.1. Değerlerin Hesaplanması.....	42
3.3.2. İstatistiksel Analizler.....	43
4. BULGULAR.....	44
5. TARTIŞMA.....	75
KAYNAKLAR.....	82
HAM VERİLER.....	97
FORMLAR.....	98
ETİK KURUL KARARI.....	101
PATEN THAKKI İZNİ.....	104
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	105
ÖZGEÇMİŞ.....	106



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Uveal melanomada en yaygın görünen mutasyonlar.....	16
Table 2-2: Kansерlerde bazı örnek miRNAların değışimi ve hedef genlere etkileri....	19
Table 2-3: Promotor metilasyonunun uveal melanomda fonksiyonu.....	21
Tablo 2-4: Uveal melanom'da önemli miRNA'lar.....	34
Tablo 3-1: Ters transkriptaz reaksiyonu inkübasyon koşulları.....	40
Tablo 3-2: Gerçek-zamanlı PZR reaksiyon koşulları.....	41
Tablo 4-1: Hastaların demografik ve klinik özellikleri.....	44
Tablo 4-2: Örneklere ait nanodrop ölçüm değeri.....	45
Tablo 4-3: miR-181b, miR-155, miR-454'ün ifade düzeyleri.....	52
Tablo 4-4: Normallik dağılımı testi.....	54
Tablo 4-5: Hasta ve kontrol grupları arasında miRNA gen ifade düzeylerinin Mann-Whitney U testi ile değeriendirilmesi.....	55
Tablo 4-6: miR-181b ifade düzeyi ile tümör lokasyonu ilişkisi.....	56
Tablo 4-7: miR-155 ifade düzeyi ile tümör lokasyonu ilişkisi.....	57
Tablo 4-8: miR-454 ifade düzeyi ile tümör lokasyonu ilişkisi.....	58
Tablo 4-9: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi tanı yaşı ile ilgisi	59
Tablo 4-10: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi cinsiyet ile ilgisi.....	60
Tablo 4-11: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi klinik evre ile ilgisi	61
Tablo 4-12: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi tümör çapı ile ilgisi.....	62
Tablo 4-13: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi metastaz varlığı ile ilgisi..	63
Tablo 4-14: miR-181b ifade düzeyi tedavi seçenekleri ile ilgisi	64
Tablo 4-15: miR-155 ifade düzeyi tedavi seçenekleri ile ilgisi	65
Tablo 4-16: miR-454 ifade düzeyi tedavi seçenekleri ile ilgisi	66
Tablo 4-17: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi riskli meslek ile ilgisi.....	67
Tablo 4-18: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi sigara kullanımı ile ilgisi..	68

Tablo 4-19: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi alkol kullanımı ile ilgisi..	69
Tablo 4-20: İfade düzeyi artan miRNA'ların olası hedef molekülleri	70
Table 4-21: Uveal Melanomlu hasta ve sağlıklı grubun ayrılmasında miRNA'ların ROC-AUC değerleri.....	74





ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Göz anatomisi.....	4
Şekil 2-2: Uveal melanom tümör yerleşimi.....	5
Şekil 2-3: Koroidal melanoma.....	6
Şekil 2-4:Siliyar cisimler melanoma.....	6
Şekil 2-5: İris melanoma.....	7
Şekil 2-6: Konjunktival melanoma.....	7
Şekil 2-7: Aktif Gα'nın etkileri arasında MAPK, PI3K– Akt – mTOR ve Hippo yolaklarının aktivasyonu	16
Şekil 2-8: miRNAların biogenez ve fonksiyonu.....	24
Şekil 2-9 miRNA biyogenezi.....	25
Şekil 2-10: Seed region.....	26
Şekil 2-11: miRNA Fonksiyonu.....	26
Şekil 2-12: MikroRNAlar, normal, tümör baskılayıcı ve onkogen olarak işlev görebilir	29
Şekil 3-1: MICqPCR cihazı	41
Şekil 3-2: MICqPCR tüpleri ve hazırlaması	41
Şekil 3-3: MICqPCR tüpleri yerleştirmesi	41
Şekil 3-4: MICqPCR tüp koruyucusu yerleştirme şekli	41
Şekil 3-5:miR-155 ifadeunun incelendiği örneklerin gerçek zamanlı PCR eğrileri.....	42
Şekil 3-6: miR-155 ifadeunun incelendiği örneklerin erime eğrileri görüntüsü..	43
Şekil 4-1: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen referans gen U6 genin gerçek-zamanlı PZR eğrileri	46
Şekil 4-2: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen U6 referans geninin erime eğrileri	46
Şekil 4-3: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen U6 referans geninin erime eğrisi analizi.....	47

Şekil 4-4: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miRNA-181b'nin gerçek-zamanlı PZR eğrileri.....	47
Şekil 4-5: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miRNA-181b'nin erime eğrileri	48
Şekil 4-6: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miRNA-181b'nin erime eğrisi analizi	48
Şekil 4-7: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miRNA-155'in gerçek-zamanlı PZR eğrileri.....	49
Şekil 4-8: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miRNA-155'in erime eğrileri	49
Şekil 4-9: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miRNA-155'in erime eğrisi analizi.....	50
Şekil 4-10: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miRNA-454'ün gerçek-zamanlı PZR eğrileri	50
Şekil 4-11: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miRNA-454'ün erime eğrileri	51
Şekil 4-12: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miRNA-454'ün erime eğrisi analizi	51
Şekil 4-13: Uveal Malign Melanomlu Hastaların Sağlıklı Kontrol Gruba göre miRNA İfade Düzeyleri	53
Şekil 4-14: Uveal Malign Melanomlu Hastaların Sağlıklı Kontrol Gruba göre miRNA İfade Düzeyleri.....	54
Şekil 4-15: miR-181b'nin hedef genleri için yapılan String analizi (P-value:0,000118).	71
Şekil 4-16: miR-155'in hedef genleri için yapılan String analizi (P-value: 0,000399)..	72
Şekil 4-17: miR-454'ün hedef genleri için yapılan String analizi (P-value: 0,000129)..	73
Şekil 4-18: Uveal melanomlu ve sağlıklı kontrol gruplar arasındaki miR-181b, miR-155 ve miR-454 ROC eğrileri.	74

MBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

aCGH:	array Comparative Genomic Hybridization
Ago2:	Argonaute2
ALT:	Alanin Transaminase
AML:	Akut Myeloid Leukemia
AST:	Aspartat Aminotransferase
BAP1:	Breast Cancer 1 (BRCA1)- associated protein 1
Bcl-2:	B cell lymphoma 2
BFB:	Bromur fenol Blue (Bromfenol mavisi)
BIC:	B-cell integration cluster
BRCA1:	Breast Cancer Antijen 1
BT:	Computerized Tomography (Bilgisayarlı tomografi)
CCND1:	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CDK:	Cyclin-dependent kinase
cDNA:	Complemented DNA
CfRNA:	Cell Free RNA
CGH:	Comparative Genomic Hybridization
CT:	Computerized Tomography
CT:	Threshold Cycle (Eşik döngüsü)
CT:	Chemotherapy
ctDNA:	Circulating tumor DNA
CYSLTR2:	cysteinyl leukotrien receptor2
DGCR8:	DiGeorge syndrome critical region 8
dH ₂ O:	Deionized water
DNA:	Deoxyribonucleic Acid
EDTA:	Etilen-Diamin-Tetra asetic asid

EIF1AX: Eukaryotic Translation Initiation Factor X-linked 1A

FISH: Floresan in Situ Hibridizasyon

EMT: Epitelial-Mezenkimal Transition

EtBr: Etidyum Bromid

GNAQ: Guanozin nucleotid associated protein Q polypeptid

GNA11: Guanozin nucleotid associated protein alfa-11

GTP: Guanazin Trifosfat

HGF: Hepatosit Growth Factor

IGF-1: Insulin Like Growth Factor 1

IRS-1: Insulin receptor substrat 1

KLL: Chronic Lymphocytic Lokemia

LDH: Lactat Dehydrogenase

lncRNA: Large non-coding RNA

M3: Monozomy 3

MFISH: Multi Fold Floresan in Situ Hybridization

miRNA: MicroRNA

MLPA: Multiplex Ligation Associated Prob Amplification

MMP: Matrix Metaloproteinase

MRI: Magnetic Resonance Imaging

MSA: Micro Sattelite Analysis

MYCBP2: MYC Binding Protein 2

NCCN: National Comprehensive Cancer Network (Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı)

ng: Nanogram

nm: Nanometre

ORF: Open Reading Frame (Açık Okuma Alanı)

PA: Fosfatidic asid

PBS: Phosfat Buffer Salin

PZR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PDCD4: Programmed Cell Death4 (Programlanmış Hücre Ölümü 4)

PLCB4: Fosfolipase C beta 4

PRAME: Melanoma Performed Ekspresyon Antijen

pre-miRNA: Precursor miRNA

pri-miRNA: Primer miRNA

PTEN: Phosphatase ve Tensin Homologus

RB1: Retinoblastoma 1

RISC: RNA-induced silencing complex

RNA: Ribonucleic Asid

rRNA: Ribozomal RNA

RT: Reverse Transcriptase

SF3B1: Splicing Factor 3B subunit 1

siRNA: Small interfering RNA

SKY: Spectral Karyotyping

sncRNAs: Small Nuclear RNAs

snoRNA: Small Nucleolar RNAs

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)

SRC: Steroid Receptor Co-activator

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TEB: Tris-EDTA-Boric Asid Tampon

TERT: Telomerase Reverse transkriptase

TIL: Tumor Infiltration Lymphocyte

TP53: Tumor Protein 53

tRNA: Small transfer RNA

TSG: Tumor Suppresor Genes (Tümör baskılayıcı genler)

UM: Uveal Melanoma

UMM: Uveal Malignant Melanoma

US: Ultrasonography

XPO5: Exportin-5

μL: microlitre

γGT: Gama-Glutamyl Transpeptidase



ÖZET

Hassani M. Uveal Malign Melanomlu Hastaların Periferik Dolaşımında miRNA'ların Araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. (2021).

Uveal malign melanom yetişkinlerde göz içerisinde, görme yeteneğini, yaşam kalitesini ciddi anlamda etkileyen bir malignitedir. Kötü prognozlu olan bu tümör erken aşamalarda metastaz yapma eğilimi olması nedeniyle sağkalım süresini kısaltmaktadır. Bu nedenle bu hastalıkta özellikle periferik kanda gerek tedavi protokollerinin geliştirilmesi ve tedavi takibinin yapılmasında gerekse erken tanıda kullanılabilecek belirteçlere gereksinim olduğu görülmektedir. Ayrıca Uveal malign melanoma ile ilişkili literatürde genetik ve epigenetik araştırmalar son derece kısıtlıdır. MikroRNA'lar yaklaşık 22 nükleotid içeren, protein kodlamayan RNA'ların bir üyesidir. miRNA'lar gen anlatımının baskılanması ve hedef mRNA'ların post-transkripsiyonel aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar. Bu nedenle kanser gelişiminde önemlidirler. miRNA'lar proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz yolları üzerinden hücrelerin malign transformasyonuna katkıda bulunmaktadır.

Sunulan çalışmada miR-181b, miR-155, miR-454 olmak üzere 3 farklı miRNA'nın ifade düzeyi 72 uveal malign melanom hastası ve 72 sağlıklı kişiye ait serum örneklerinde Real-Time PCR yöntemleri kullanılarak araştırıldı.

Çalışmanın sonucunda miRNA gen ifade düzeylerinin hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre 2 kattan fazla arttığı, istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0,05$) olduğu görüldü. Her bir miRNA için elde edilen p değerlerinin sırasıyla; miR-181b, $p < 0,001$; miR-155, $p < 0,001$ miR-454, $p=0,005$ olduğu belirlendi. Ayrıca miRNA ifade seviyeleri ile hastaların klinik verileri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde; hastaların miR-155 düzeyi ile radyasyon tedavisi arasında bir ilişki olduğu ve bu ilişkinin anlamlı olduğu ($p=0,040(p<0,05)$), miR-454'ün artan ifade düzeyi ile sırasıyla sigara ve alkol kullanımı arasında bir ilişki olduğu ($p=0,009$ ve $p=0,026 (p<0,05)$) saptandı. Elde edilen bulgular, incelenen miRNA'ların kanserli hastalarda onkogenik özellik gösterdiğini ve uveal malign melanoma hastalığının oluşumunu primer ve metastatik evrelerde tetiklediğini düşündürmektedir. miR-181b, miR-155 ve miR-454 uveal melanoma hastalığının diyagnozunda ve prognozunda kullanılmasında potansiyel biyobelirteçler niteliği taşıdığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Uveal malign melanoma, miR-181b, miR-155, miR-454, Biyobelirteç

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2019-35336



ABSTRACT

Hassani M. Investigation of MiRNAs in Peripheral Circulation of Patients with Uveal Malignant Melanoma. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Basic Oncology. Doctoral Thesis. İstanbul. 2021.

Uveal malignant melanoma is a type of intraocular malignancy in adults, that seriously affects eyesight and quality of life. As a poor prognosis tumor in the early stages, shortens the survival time. Therefore, it seems that there is a need for new markers for both the development of treatment protocols and for early diagnosis. In addition, genetic and epigenetic researches related to uveal malignant melanoma are extremely limited. MicroRNAs are a member of non-protein-coding RNAs, containing approximately 22 nucleotides, regulate the suppression of gene expression and post-transcriptional activity of target mRNAs. Therefore, it plays an important role in cancer development. It contributes to malignant transformation of cells by affecting proliferation, differentiation and apoptosis.

In the presented study, expression of miR-181b, miR-155, miR-454 occurred in serum samples of 72 uveal melanoma patients cohort and 72 healthy controls. For gene expression analysis, RNA isolation from peripheral blood, cDNA synthesis specific to miRNAs followed by Real-Time PCR methods were performed.

As a result of the study, it was seen that miRNA gene expression levels increased more than twice in the patient groups compared to healthy controls and it was statistically significant ($p < 0,05$). The p values obtained for each miRNA; p miR-181b, $p < 0,001$; miR-155, $p < 0,001$ miR-454, $p = 0,005$. In addition, when miRNA expression levels were compared with the clinical data of the patients; There was a significant relationship between miR-155 and radiation treatment option (P value= 0,040), and relationship between miR-454 and smoking (p value=0,009) and alcohol intake (p value= 0,026) of patients. The findings suggest that the miRNAs examined have an oncogenic character in cancer patients and thus, trigger primer and metastatic uveal malignant melanoma. The miR-181b, miR-155 and miR-454 molecules are thought to be highly potential biomarkers for detecting uveal melanoma and demonstrating prognosis.

Key Words: Uveal malignant melanoma, miR-181b, miR-155, miR-454, Biomarker.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TDK-2019-35336.



GİRİŞ VE AMAÇ

Uveal malign melanom yetişkinlerde göz içinde görülen, hastaların görme yeteneğini, yaşam kalitesini ciddi anlamda bozan bir kanser türüdür [1]. Kötü prognoza sahip bu tümör hastalığın erken aşamalarında metastaz yapmakta ve hastaların sağkalım süresini kısaltmaktadır [2, 3]. Günümüzdeki tedavi olanakları ile hastaların %50'si metastaz nedeniyle hayatını kaybetmektedir [4]. Her yıl Amerikan Birleşik Devletlerde 2000 yeni uveal melanoma tanısı koyulmaktadır [5]. Uveal melanomun, cilt melanomaya göre toplumda daha düşük oranda görülmektedir [6]. Uveal melanoma karaciğer metastazı için yüksek potansiyele sahip ancak bölgedeki lenf bezlerine yayılması nadir görülen bir kanser türüdür [7].

Uveal melanoma göz içinde iris, siliar cisimde ve yüksek oranda koroid bölgesinde yayılmakta, hem görme yeteneğinin kaybına, hem de metastatik potansiyelinin yüksek olması nedeniyle hastaların %40-50'si metastaz nedeniyle tanıdan sonraki ilk 4-5 ayda hayatlarını kaybetmelerine neden olmaktadır [8]. Bu nedenle söz konusu kanserin gerek tedavi protokollerinin geliştirilmesinde gerekse bu kanserin erken tanımlanması ve izlenmesinde yeni biyolojik belirteçlere gereksinim olduğu görülmektedir. Uveal malign melanom ile ilişkili olarak literatürde genetik ve epigenetik açıdan araştırmaların mevcut olduğu görülmekle beraber bu araştırmaların son derece kısıtlı olduğu dikkat çekmektedir. Bu sebeple uveal melanom ile ilişkili olabilecek biyolojik belirteçler ve ilaç hedefi olabilecek moleküllerin araştırması son derece önem arz etmektedir.

Klinikte birçok diyagnoz yolu olmasına rağmen, klinikteki bulgular, lezyon boyutu, opaklık veya kırılma ortamı ve göz içindeki kanamalar sebebiyle yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlarla karşılaşmaktadır. Bu nedenle günümüzde serum ve plazmada diagnostik ve prognostik amaçlı miRNA'ların araştırılmasının çok daha anlamlı olduğu düşünülmektedir. Periferik kanın kolay elde edilebilir oluşu, kısmen non-invaziv bir yöntem olarak kabul edilmesi ve hastalığın her aşamasını takip etmek için son derece kullanışlı bir materyal olması, dolaşımda hassasiyeti ve özgünlüğü yüksek olan miRNA'ların araştırılması ve bunların keşfini daha değerli kılmaktadır [9-11].

MikroRNA'lar yaklaşık 22 nükleotid içeren, küçük protein kodlamayan RNA'ların bir üyesi olarak tanımlanmaktadır. miRNA'lar gen anlatımının baskılanması ve hedef mRNA'ların transkripsiyon sonrası aktivitesini düzenlemektedir. Bu nedenle kanser

gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz olmak üzere farklı hücresel faaliyetleri kontrol ederek hücrelerin malign dönüşümüne katkı sağlamaktadırlar [12, 13]. Yapılan çalışmalarda miRNA'ların farklı anlatımı, miRNA'ların onkogen veya tümör baskılayıcı olarak sınıflandırılmasına neden olmaktadır. Kanseri oluşumu ve ilerlemesinde farklı miRNA'ların etkili olduğu ve miRNA'ların farklı hedefleri etkileyerek farklı kanserleri oluşturduğu görülmektedir [14]. İnsan tümörlerinde miRNA ifade profili araştırmaları, miRNA'ların diyagnoz, evreleme, prognoz ve tedavi yanıtı gibi olaylarla ilişkili olduğunu göstermektedir [15]. miRNA'lar vücut sıvılarında aktif veya pasif şekilde salgılanmaktadırlar. Parçalanmış ve apoptotik hücrelerden pasif bir formda [16] veya aktif olarak mikroveziküller şeklinde veya direkt olarak hücreden ekzozom (shedding vescicle) formunda salınmaktadır [17].

Uveal malign melanomun ilerlemesi onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde çok aşamalı genetik ve epigenetik değişimlere bağlıdır. Yeni araştırmalara göre küçük kodlanmayan RNA'ların uveal melanoma ilerlemesinde önemli rol aldıkları ortaya çıkmıştır. Tümör dokusu ve hücre hatlarında birçok miRNA'nın ifade değişimlerinin normal kontrole karşılaştırılması yapılmamıştır. Bu miRNA'ların gerek hücre siklusu ve apoptoz gibi hücresel yollarda gerekse metastazda etkili olduğu bilinmektedir. Uveal malign melanoma hasta dokularında ve hücre hatlarında yapılan çalışmalarda birçok miRNA'nın ifade profili araştırılmış, ilgili miRNA moleküllerinin birer biomarker ve ilaç hedefi olarak kullanılabileceği ile ilgili bilgiler ortaya koyulmuştur [18].

Günümüzde miRNA moleküllerinin birçok kanser türünde gerek kanser tedavisinde hedef molekül olarak gerekse kanserin tanı ve tedavisinin izlenmesinde biyolojik belirteç olarak kullanıldığı ve/veya bu olaylara aday olduğu bilinmektedir.

miR-181b, miR-155 ve miR-454 isimli miRNA'ların uveal malign melanom hücre hatlarında aşırı derecede anlatım yaptıkları bildirilmiştir. miR-181 gen ailesine ait moleküllerin hücre döngüsünde rol oynayarak, hücre döngüsünü negatif kontrol ettiği bilinmektedir. Bu nedenle miR-181'in ilaç hedefi olabilecek bir molekül olduğu bildirilmiştir [19].

Uveal malign melanom hücre hatlarında yapılan, miR-155'in incelendiği çalışmalarda ise tümör dokusunda aşırı eksprese olduğu gösterilmiş ve buna bağlı olarak

proliferasyon, invazyon ve metastaz da rol oynayabileceği ve terapötik bir hedef olabileceği ileri sürülmüştür [20].

miR-454'ün araştırıldığı çalışmada ise söz konusu miRNA molekülünün direkt hedefinin *PTEN* geni olduğu gösterilmiş ve tümör dokusunda ifadesi incelenmiş ve miR-454'ün tümör dokusunda aşırı anlatım yaptığı ve bu durumun hücre proliferasyonu ve invazyonunda etkili olduğu bildirilmiştir [21].

Yukarıda bahsi geçen çalışmaların hepsinin hücre soylarında yapılan çalışmalar olduğu dikkat çekmektedir. Ayrıca, miR-454'ün araştırıldığı çalışmada hücre soylarına ilave olarak çok kısıtlı sayıda insan tümör doku ve normal dokusunda miR-454'e ilişkin bilgiler bulunmaktadır. Ancak bahsi geçen üç miRNA'nın prognostik önemini belirlemek üzere hiçbiri insan periferik kan dolaşımında plazma ya da serum örneklerinde incelenmesine dair literatürde bir bilgi bulunmamaktadır.

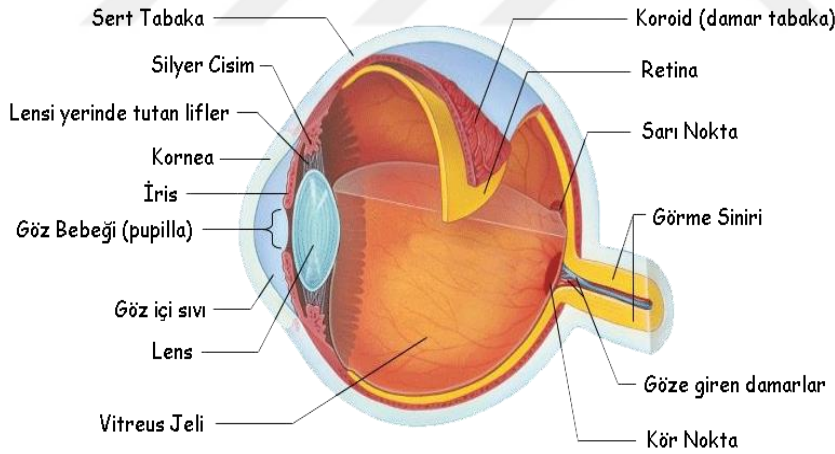
Sunulan çalışmada miR-181b, miR-155, miR-454 olmak üzere 3 farklı miRNA'nın ifadesi 72 uveal malign melanomlu hasta ve 72 sağlıklı kişiye ait serum/plazma örneklerinde karşılaştırılarak incelenmiş ve söz konusu moleküllerin diyagnostik ve prognostik öneminin olup olmadığı belirlenmiştir.

GENEL BİLGİLER

2.1. UVEAL MALİGN MELANOMA

2.1.1. Göz anatomisi ve uveal melanoma

Göz küreleri (glob; bulbus, okuli), orbita boşluğu içinde zengin bağ dokusuna sahip bir yağ dokusuna yerleşmiş görme fonksiyonu ile görevli olan bir çift organdır. Yaklaşık 22 mm yarıçapında bir küre olan gözlerin %20'si dışardan görünür haldedir ve göz çukurunun kemikleri tarafından çevrelenmektedir. Göz kapakları, gözyaşı bezleri, bezlerin drenaj sistemleri ve kirpikler yardımcı organlar olarak görev yapmaktadır. Beyinden gelen 12 çift sinirden (Kraniyal sinir) 6' sısı gözler ile ilgilidir. Retinada odaklanan ışık, fotokimyasal reaksiyonla elektrik enerjisine dönüşür ve optik sinir yolu ile beyne iletilir. Beyin iki gözden gelen bilgileri birleştirerek tek bir görüntü elde eder. İnsan retinası tarafından görülebilen en kısa dalga boyu 380 nm (nanometre) iken en uzun dalga boyu ise 760 nm dir. Göz anatomisi ve önemli bölgeleri şekil 2-1 de sunulmaktadır.

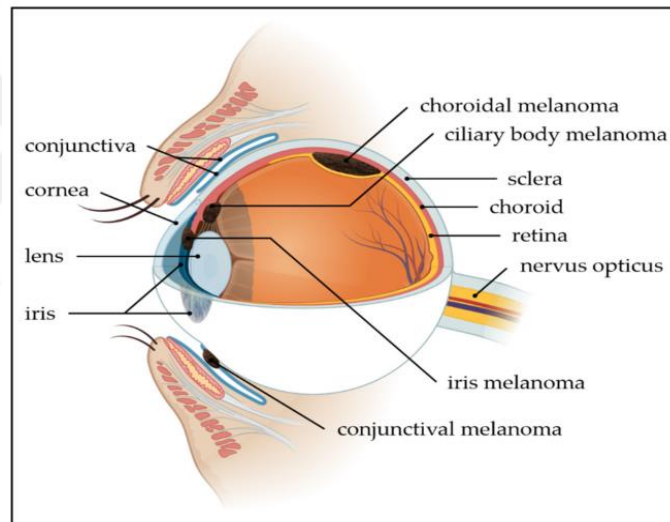


Şekil 2-1: Göz anatomisi

Göz içinde oluşan melanoma türü uveal melanoma adlandırılmaktadır. Tüm melanoma vakalarının %5'ini ve tüm melanoma ölüm oranlarının %13'ünü kapsamaktadır [22-24].

Uveal malign melanoma yetişkinde en sık görünen birinci göz içi tümörüdür ve metastaz riski %50 olan bir tümördür. Uveal melanoma, cilt melanomaya göre farklı etiyoloji, klinik özellikler ve moleküler genetiğe sahiptir. Primer tümör genelde kolaylıkla tedavi ve kontrol altına alınabilir ancak %50 uveal melanoma vakaları metastatik ve metastaz vakaları özellikle %90 karaciğerde görünmektedir. Bu hastaların sağkalım süresi bir yıldan daha düşüktür. Uveal melanoma yetişkinlerde göz içinde bulunan malignite ve % 80 kutanöz olmayan melanomaları kapsamaktadır [25].

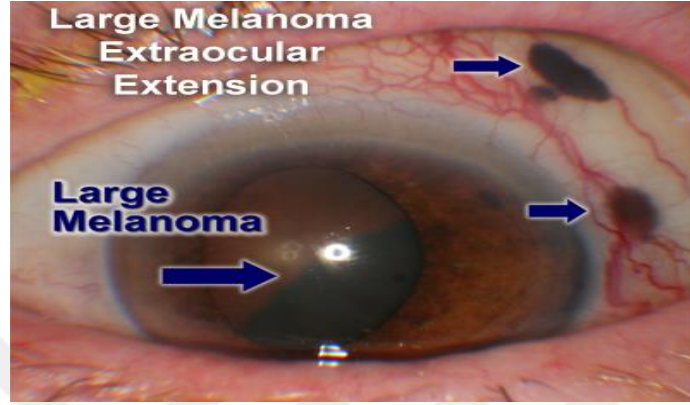
Tümörün anatomik yerleşimi üç farklı şekilde, sıklıkla yaklaşık % 90,3'ü koroid yerleşimli görülürken, daha az sıklıkla, % 3,5'ü iris melanomu ve % 6,1'i siliyer cisim melanomu olarak görülmektedir (Şekil 2-2) [26, 27].



Şekil 2-2: Uveal melanom tümör yerleşimi

Nadir görünen başka bir göz melanoma türü olan konjunktival melanoma, bazı kaynaklara göre tüm uveal melanomaların düşük oranını kapsamaktadır. Konjunktival melanoma bazı kaynaklara göre kutanöz melanom ile ilişkilendirilmiştir ancak hala sınıflandırmasında zorluklar görünmektedir [28, 29]. Uveal malign melanoma 55-60 yaş arasında ve ortalama görülme insidansı, beyaz ırkta daha yüksek, açık göz ve açık ten insanlarda daha sık görülmektedir. Koroidal melanom genellikle sporadik olarak görülmektedir[30]. Koroidal melanom tüm uveal melanoma vakalarının %80'inden fazla bir oranını kapsamaktadır. Melanom, zeminden kabarık, subretinal, oval bir

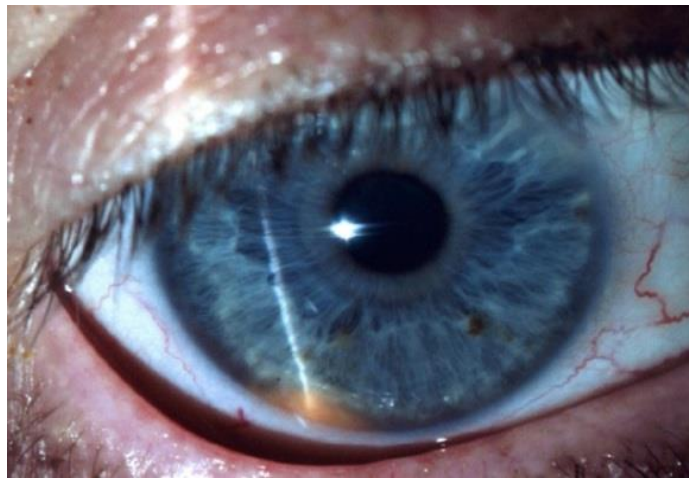
kitledir. Tümör kahverengi-siyah renkli melanotik olduğu gibi amelanotik bir görünüme de sahip olabilir. Aynı zamanda tümör membranı delip ve mantar şeklinde görünebilir (Şekil 2-3) [31].



Şekil 2-3: Koroidal melanoma

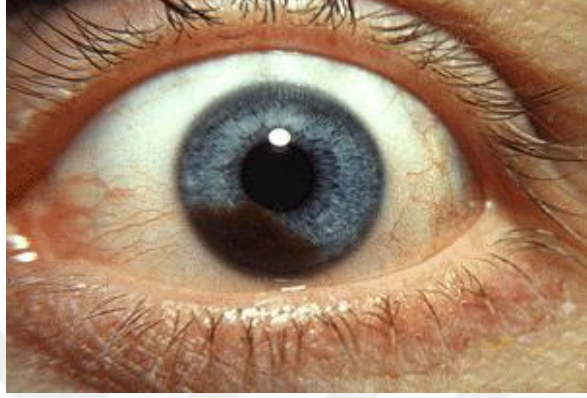
Siliyar cisim melanomu, uveal melanomların %15'ini kapsamaktadır. Siliyer cisimden köken alan kahverengi renkli kitlelerdir (Şekil 2-4). Hastalarda asemptomatik olabildiği gibi bazen görme azalması, görme alanı defekti, ağrı gibi şikayetler ile görülebilmektedir [30, 32, 33].

Tümör arkaya yayılarak retina dekolmanına sebep olabilmektedir. Erken teşhisin zor olması sebebiyle en kötü prognoza sahiptir [27, 34].



Şekil 2-4:Siliyar cisimler melanoma

İris Melanomu Uveal melanomların %5'ini oluşturmaktadır. İrisin alt bölümünde daha sık görülmektedir. Boyutu 3 mm ve kalınlığı 1 mm'den büyük pigmentli veya pigmentsiz lezyonlar olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2-5) [35]. İris melanoma göz melanomaları arasında en iyi prognoza sahiptir.



Şekil 2-5: İris melanoma

Göz melanomaları arasında oldukça nadir görünen aynı zamanda yüksek bir mortalite oranına sahip başka bir melanoma türü, konjonktival melanoma, tüm konjonktiva neoplazilerinin %53'ünü oluşturmaktadır (Şekil 2-6) [36].



Şekil 2-6: Konjonktival melanoma

Konjonktiva melanomları, tüm oküler malignitelerin %2'si ve tüm oküler melanomların %5'ini kapsamaktadır [37, 38].

Konjonktivanın en sık görülen yassı hücreli kanserlerinden sonra en yaygın malinedir. Bu lezyonların nadir olması nedeniyle, tanımlanması ve sınıflandırmasında ve tedavi konusunda literatürde fazla bilgi bulunmamaktadır. Göz melanomaları arasında en kötü huylu tumor siliyar cisimlerde oluşmakta iken en iyi huylu tümörler iris bölgesinde görülmektedir [26, 39-49]. İris melanomunun daha düşük metastaz oranı, onun daha düşük biyolojik aktivitesi veya daha küçük tümör boyutu ile ilişkilidir [26, 41, 46].

Yapılan bir çalışmada, 3432 uveal melanom vaka üzerinde, iris melanomunun ölüm oranının, siliyer cisimler ve koroid melanomu ile kıyaslanınca 10 kat daha düşük olduğu bildirilmiştir [41]. Uveal melanomlu 8033 hastayı içeren başka bir çalışmada, iris melanomundan 10 yıllık metastatik oran siliyer cisim melanomundan yaklaşık 5 kat, koroid melanomundan 4 kat daha düşüktü [26, 42]. Kalınlığı 7 mm'den fazla olan siliyer cisim melanom hastaları, metastatik hastalık ve melanoma bağlı ölüm için daha ince tümörlü hastalara göre 2,5 kat daha fazla risk altındadır [47].

Li ve arkadaşlarına göre, siliyer cisim tutulum derecesi (siliyer cisimdeki tümör tabanının% 'si) ile melanomla ilişkili metastaz arasında anlamlı bir ilişki vardır [48]. Bu çalışmaya göre, siliyer cisim kaynaklı olduğu varsayılan bir melanom (siliyer cisimdeki tümör tabanının $>50\%$ 'si), bir koroid melanomdan (siliyer cisimdeki tümör tabanının $<50\%$ 'si) 1.6-2.3 kat daha yüksek metastaz şansına sahipti. % 100 siliyer cisim tutulumu olan tümörlerin metastaz şansı koroid melanomuna göre 3.6 kat daha yüksekti [48]. Siliyer cisim melanomunun kötü prognozu, daha büyük tümör boyutu, monozomi 3 (M3) ve 8q kazanımı ve tümör mikrovasküler paternler ile ilişkilendirilmiştir [39, 41, 43, 45, 49].

2.1.2. Tanı ve Tedavi

Uveal melanomu, 10 yıllık metastatik oranı %34 ile erişkinlerde en sık görülen primer kötü huylu göz içi tümörüdür. Bununla birlikte, uveal melanom'lu hastaların neredeyse yarısının metastaz geliştirdiği gerçeği hala geçerliliğini korumaktadır. Bu da pratik olarak birincil neoplazm odağının erken saptanamamasından kaynaklanıyor olabilir [4]. Uveal melanoma kan yoluyla yayılır ve tercih edilen metastatik bölge karaciğer (% 89), ardından akciğerler (% 29) ve kemiklerdir (% 17) [50]. Uveal melanoma bağlı mortalite, uveal melanom tanısından 5 yıl sonra % 31'e; 15, 25 ve 35 yıl sonra sırasıyla

% 45, % 49 ve % 52'ye ulaşmaktadır [8]. Bu nedenle, onkolojik takibin primer tümör tedavisi tamamlandıktan sonra en az 15 yıl sürmesi gerektiği düşünülmektedir [22]. Aynı zamanda tümörün kalınlığı, boyutu ve yerleşimi tedavide önem arz etmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu küçük (<3 mm kalınlığında ve <10 mm bazal çap), orta (3 ila 8 mm kalınlığında ve <15 mm bazal çapta) ve büyük (> 8 mm kalınlığında ve > 15 mm bazal çapta) tümörler için, 5 yıllık genel mortalite sırasıyla % 16, % 32 ve % 53 olarak raporlanmıştır [22].

En yaygın metastaz bölgesi karaciğer olan uveal melanomlar, tümör boyutuna ve konumuna göre radyoterapi (plak, proton ışını veya stereotaktik radyoterapi), enüklasyon ve transpupiller termoterapi ya da bu tedavilerin kombinasyonu içeren farklı tedavi yaklaşımları ile tedavi edilmektedirler.

NCCN kılavuzuna göre, uveal melanoma tanı için, hangi çeşit tedavi yöntemlerinin gerekli olması, tümörün büyüklüğü ve kalınlığı üzerinden seçilmektedir. Aynı zamanda tümörün kritik bölgede olması da tedavi seçimini yakından etkilemektedir. Hastaların çoğu ağrısız görme kaybı ile başvurur. Daha büyük tümörlerde, yaygın olan bir retina dekolmanı ile ilişkilendirilmektedir[51]. Bazı durumlarda, hasta tamamen asemptomatik olup, rutin oftalmik taramada tümör tanımlanmaktadır. Uveal melanomu gözün ön segmentini etkilediğinde, hastalar irisin renginin değiştiğini veya episkleranın kalıcı enjeksiyonunu fark edebilir, aynı zamanda kronik konjunktivit de yönlendirici bir tanı olabilir. Siliyer cisim tümörleri artmış ve asimetrik göz içi lensin yer değiştirmesine bağlı, astigmatizme neden olabilmektedir. Nadiren, kör veya yoğun kataraktı olan göz içerisinde gizli melanom tümörü barındırabilir [52].

Şüpheli pigment lezyonları olan hastalar, oküler tümörlerde klinik uzmanlığı olan bir göz doktoru tarafından değerlendirilmelidir. Tanısal olarak küçük melanomların benign nevuslardan ayırt edilmesi gerekir. Klinik görünüm ve oftalmoskopik özellikler bu farklılığın anlaşılmasına yardımcı olur. Subretinal sıvı, turuncu pigment ve fundus fotoğrafında belgelenmiş büyüme varlığı melanom tanısını destekleyen bulgulardır [53]. Floresein anjiyografi, koroidin intrinsik sekonder vaskülatürünü gösterebilir; ancak oküler ekografi, klinisyenin kullanabileceği en etkili tanı aracıdır. Melanom tümörü, ultrasonda bir akustik sessiz bölge olduğunun yanı sıra düşük reflekt gösterme eğilimindedir. Tümör çoğu zaman kubbe şeklindedir, ancak bir "Mantar" konfigürasyonu büyük ölçüde melanoma tümörünü düşündürmektedir [54]. Apikal ve

bazal boyutlar ne kadar büyükse, lezyonun neoplastik olma olasılığı o kadar yüksektir. Bazı raporlara göre, tümörün artan kalınlığı ve metastaz uzaklaşma riski arasında bir korelasyon olduğunu öne sürülmektedir. Uzmanların çoğu, apikal yüksekliği 3 mm'den büyük bir lezyonun muhtemelen bir melanom olduğu konusunda hemfikirler. Nadiren tanıyı doğrulamak için klinik biyopsi gereklidir [55].

Bazı durumlarda, özellikle lezyon amelanotik olduğunda veya vitröz kanama veya debris nedeniyle değerlendirilmesi zor olduğunda tanısal bir biyopsi yapılması gerekli olabilir. İnce iğne aspirasyonu yapılabilir, ancak oküler patoloji bilgisi olan yetenekli bir sitoloğun yardımını gerektirir [56]. Tanısal biyopsi, prognostik biyopsiden (tümörün genetik ve gelecekteki metastaz riski açısından değerlendirildiği) ayırt edilmelidir. Gelecekteki risk sınıflandırması için prognostik biyopsinin faydası önem arz etmektedir. Büyük kitleler cerrahinin yanı sıra radyoterapi gerektirebilir. Bazen kitlenin aşırı büyük olması nedeniyle gözün tamamen alınması gerekmektedir. Küçük ila orta büyüklükteki melanom için tedavi seçenekleri görsel sonucu iyileştirse de, metastatik hastalıkta sağkalımı iyileştiren herhangi bir standartlaştırılmış tedavi yoktur. Metastatik uveal melanoma genelde karaciğer metastazı, ve tedavisi intravenöz kemoterapi ve immünoterapi gibi sistemik tedavi seçenekleri ümit verici sonuçlar veya sağkalım süresinin artması için yarar sağlamaktadır [57]. İmmünoembolizasyon, kemoembolizasyon, izole karaciğer perfüzyonu ve hepatik intra-arteriyel kemoterapi gibi çeşitli teknikler mevcuttur. Çoğu hastalarda, karaciğer metastazlarının cerrahi olarak çıkarılması yararlı olabilir. Primer tümör tanısından karaciğer metastazına geçen süre en fazla 24 aydır ve 4 den az sayıda karaciğer metastatik lezyonu ve multipl, diffüz, BT'de milimetre boyutunda, koyu noktalı lezyonlara sahip olan hastalar uzun süreli sağkalım ile ilişkilidir [58].

2.1.3. Epidemiyoloji

Uveal melanoma erişkinlerde en sık görülen primer intraoküler malignitedir ve tüm melanomların % 3-5'ini temsil eder [25, 59]. Uvea yolu, kürenin irisi, siliyer cismi ve koroidi kapsayan pigmentli tabakasıdır. Koroidal veya oküler melanom terimleri, bu kanser için alternatif terimlerdir çünkü uveal yolun çoğunluğu koroidaldir. Uveal primerlerden ziyade kutanöz gibi davranan ve yönetilen konjunktival ve adneksiyal melanomlar da bazen bunlara dahil edilmektedir. Uveal melanoma en yaygın olarak koroid melanositlerinden (%85-%90) ortaya çıkar, ancak aynı zamanda iris (%3-%5) ve

siliyer cisimden de (%5-%8) oluşabilir [25, 59]. Ortalama tanı yaşı yaklaşık 62 yıldır; ancak, tanı için en yüksek yaş aralığı, 70 ile 79 yıl arasındadır [6, 25, 60]. Uveal melanoma insidansı cinsiyet, ırk ve ülkeye göre değişir ve beyaz ten ve açık göz rengi olan ırklarda daha yaygındır. Erkeklerde kadınlara oranla % 30 daha fazla insidans vardır [25]. Amerikan Birleşik Devletlerde'de her yıl yaklaşık 1.500 yeni vaka teşhis edilmektedir [25]. Amerikan Birleşik Devletler'de insidansı yaklaşık milyonda beş ve İspanyol olmayan beyazlarda milyonda 6,02 iken, Siyah ve Asyalılar ırkları milyonda 0,31 ve 0,39 olarak bariz bir şekilde daha düşüktür. Hispanik'teki insidansı, milyonda 1,67 ortada seviyesindedir [25, 61, 62]. Avrupa'da, insidans İspanya ve İtalya'da milyonda iki, Orta Avrupa'da da milyonda dört ila altı, Danimarka ve Norveç'te milyonda sekizden fazla değişik oranlar göstermektedir [63]. Güney Kore'de görülme sıklığı Amerikan Birleşik Devletleri'ndeki Asyalılara benzer, milyonda 0,42'dir [64].

2.1.4. Risk Faktörleri ve Prognoz

Uveal melanoma cinsiyete göre farklı dağılım göstermemekle birlikte, medyan başvuru yaşı 58 olan orta yaşlı beyaz ırklarda daha yaygındır. Beyaz ırkından ya da beyaz kökenli olamakta risk faktörleri arasındadır. Beyaz nüfusunun %7-8'inde koroidal nevüs varlığı bildirilmiştir. Bununla beraber displastik nevüs sendromu gibi belirli cilt durumları da uveal melanom ile ilişkilendirilmiştir [65].

Ultraviyole radyasyona maruz kalmanın neoplazi riskini artırdığı ileri sürülmüştür, ancak bu kesin olarak kanıtlanamamıştır. Bazı somatik mutasyonlar neoplastik büyüme ve uzak metastaz ile ilişkili olsa da, söz konusu malignitede kalıtsallıktan sorumlu olan etkili bir gen henüz bulunmamıştır. Ancak germline *BAP1* mutasyonları olan bireylerin uveal ve kutanöz melanomun yanı sıra mezotelyoma ve böbrek kanserleri için de yüksek risk altında olduğu düşünülmektedir [66]. Klasik olarak, uveal melanom tanısı ve prognostik tahmin, klinik tabloya ve histopatolojik değerlendirmeye dayanmaktadır. Genetik mutasyonlar, kromozomal anormallikler ve gen ifade profili için moleküler prognostik testler, uveal melanomda daha yaygın hale gelmektedir ve adjuvan terapi denemelerine yüksek riskli hastaların tanımlanmasına ve kaydedilmesine yol açmıştır. Mikroarray yaklaşımlarının, standart klinik veya histopatolojik parametrelere kıyas, sonucu tahmin etmek için daha iyi performans gösterdiği bildirilmiştir [67]. Kromozom 3 monozomisi hastalığın prognoz ile 8q'daki ek kopyaların varlığı ise azalmış sağkalım

süresi ile ilişkililidir [68, 69]. Ayrıca monozomi 3 ile eşzamanlı kromozom 1'deki delesyonların hastalısız sağkalımın bağımsız öngörücüsü olduğu gösterilmiştir [70]. Tümör çapının tek başına monozomi 3'ten daha büyük bir prognostik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [45]. Nadir sayıda uveal melanoma vakalarında, kromozom 3'ün tek bir primerinde heterojenite olabilir, bu gözlem daha büyük sayılarla doğrulanmalıdır [71]. Ayrıca, yayınlanmış literatürde bildirildiği gibi, bu tür tek tip olmayan kromozom 3 değişikliklerinin sıklıkları % 0-%48 arasında değişmektedir. Abdel-Rahman ve arkadaşlarının yaptığı 47 uveal melanoma vakasının 36 ay boyunca takip edildiği ortalama takip süresinin 36 ay olduğu çalışmada, kromozom 3 değişikliğinin, oldukça agresif olduğu ve uveal melanomda tedaviden sonraki ilk 3 yıl içinde metastaz gelişme riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [72]. Kromozom 3 kaybının aksine, 6p kromozomu kazancı genellikle metastatik olmayan uveal melanom ile ilişkilidir [73].

2.1.5. Histopatolojik Prognostik Kriterler

Uveal melanomada önemli histopatolojik faktörler olan, hücre tipi, mitotik aktivite, tümör infiltrate eden lenfositler (TIL'ler), ekstrasvasküler matris modeli, pigmentasyon derecesi ve ekstraskleral uzantı prognoz için belirleyici kriterler olarak sayılmaktadır [22].

Epiteloid hücre tipi, tüm uveal melanoma'nın yaklaşık % 3-5'ini oluşturur ve en kötü prognozla ilişkili hücre tipidir. Epiteloid hücre tipi uveal melanoma tanısı alan hastalarda 15 yıllık ölüm oranı % 75'tir. İğ (spindle) hücre tipi, tüm uveal melanoma'nın yaklaşık % 40'ını kapsar ve 15 yıllık ölüm oranı % 20'dir. Tüm uveal melanomların % 50'sinde karışık hücre histolojisi mevcuttur ve 15 yıllık ölüm oranı yaklaşık % 60'tır ve bu oran epiteloid ve iğ hücrelerin yüzdesine bağlı olarak önemli farklılıklar göstermektedir [74].

Uveal melanoma, klinik muayenede neredeyse %100 doğrulukla potansiyel olarak teşhis edilebilmesine rağmen [30], birçok hastada tümör gözden kaçır veya yanlış teşhis edilir [62].

Neredeyse yönlendiren semptomların eksikliği hastaların üçte birinde, ve eşlik eden göz bozuklukları veya tanıyı engelleyen hastalıkların yanı sıra yanlış teknik bazı sorunların nedeni olabilir. Tümör yerleşimi de tanıyı zorlaştırabilir. Uveal melanomanın % 3,5'i iriste, % 6,1'i siliyer cisimde ve % 90,3'ü uveanın arka kısmında meydana gelir [26]. Siliyer gövdede bulunan uveal melanoma başlangıçta görme bozukluğu ve irisi

bozacak veya kenarının altından çıkacak ve göz küresi içinde diğer yapısal ve işlevsel değişiklikleri tetikleyecek kadar büyük olana kadar genellikle teşhis edilmemiş olarak kalır. Bazen sadece ekstraoküler yayılma gözlemlendikten sonra teşhis edilir. Siliyer cisim yerleşimli uveal melanoma tümörün boyutu veya hücresel tipine bakılmaksızın, olumsuz bir prognostik faktör olsa da [74], siliyer cismi tutan uveal melanoma'nın epitelooid hücreler içermesi ve uveanın arka kısmına sınırlı olmadığı ve daha geniş bir çapı olması gösterilmiştir [49].

Erken teşhisi engelleyen anatomik bir konumun yanı sıra siliyer cismin yüksek hareket kabiliyetine sahip olduğu varsayılmaktadır. Siliyer kasın kasılmaları nedeniyle, çok sayıda damar ve bu alanda kötü prognozlu ekstrasvasküler matriks paternlerinin oluşması, uveal melanom'un daha yüksek metastatik potansiyeli ile ilişkili olabilir [44, 49].

İris kaynaklı uveal melanoma, daha iyi prognozla ilişkilidir, bu da iris tümörlerin daha kolay tespit edilebilmesinden ve sonuç olarak tedavinin çok daha erken uygulanmasından kaynaklanabilir [74]. McLean ve arkadaşları uveal melanomlu hastalarda 40 yüksek güç alanı (HPF) gözlemlenen mitoz sayısı ve prognoz arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir [75]. Düşük mitotik aktiviteye sahip tümörler (0-1 / 40 HPF) 6 yıllık ölüm oranı % 15-23, orta aktiviteye sahip olanlar (2-8 / 40 HPF) % 40-47 ve yüksek aktiviteye sahip olanlar (9-48 / 40 HPF) % 56 idi [22].

Genel olarak, artan sayıda lenfosit, makrofaj ve insan lökosit antijeni (HLA I ve HLA II) ifadesini içeren uveal melanom'daki inflamatuvar infiltrasyon, daha kötü prognozla ilişkilidir [76]. Lenfosit infiltrasyonu, uveal melanoma vakalarının % 17'sinde [77], siliyer cisim uveal melanom'de, uveanın arka kısmına sınırlı tümörlere göre daha sık görülür [49].

Siliyer cisim melanomlarının agresif davranışı, bu lokasyonda vasküler ağların gelişme eğilimiyle ilişkili görünmektedir. Siliyer cisim veya koroid melanomda tümör yeri nerde olursa olsun vasküler ağların varlığı sağkalımı kısaltır [49]. Daha kötü prognozla ilişkili ekstrasvasküler matriks örüntüleri oluşturan bağ dokusu, septanın daha fazla sayıda kan damarı içerdiği bulunmuştur [78].

McLean ve arkadaşları, epitelooid hücre içeren tümörleri olan hastalarda tümör pigmentasyonu derecesinin prognostik değeri olmadığını göstermiştir [75]. Öte yandan, ışık hücreli tümörlerde pigment miktarı histopatolojik örneğin hazırlanması sırasında üretilen artefaktler nedeni ile prognostik değer ölçümünde yanlışlara sebep olabilir.

Pigmentasyonun prognostik öneminin doğru tanımı, daha fazla histopatolojik ve istatistiksel analizi gerektirir [22]. Sulu kanallar (% 29,8), siliyer arterler (% 27,4), vorteks damarlar (% 18,5), siliyer sinirler (% 8,9) veya optik sinir (% 0,8) yoluyla ekstraskleral ekstansiyon oluşabilir. Hastaların % 10,4'ünde tümör, çeşitli yollarla aynı anda göz dışı boşluğuna da yayılır. Ekstroskleral uzanım, ön kamara açısının tutulumu, tümörün bazal çapı, epiteloid hücrelerin varlığı, kapalı bağ dokusu halkaları ve monozomi 3 ile güçlü bir şekilde ilişkilidir [22].

Schmittel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ekstraoküler tümör büyümesi olmayan hastalarda uveal melanoma'nın ekstraoküler yayılımı olan hastalara kıyas, 5 yıllık metastazsız sağkalım % 28'e karşılık % 80,6 idi [79].

2.1.6. Sitopatoloji

Uveal melanomdaki sitogenetik değişiklikler rastgele değildir ve monozomi 3, trizomi 8, kromozomdaki delesyonlarla karakterizedir. Kromozom 1 ve kromozom 6'nın yapısal veya sayısal anormallikleri ve kromozom 9p'deki değişiklikler daha az görülmektedir.

2.1.6.1. Sitogenetik Anormallikler

Uveal melanoma tümör dokusunda çoğu solid tümörlerden farklı ve özel kromozom değişimlerine sahiptir [80-82]. Bunlar, kromozomlarda materyal kaybı, kazanımı ve tek kromozom kaybı gibi değişimlerdir. Çok sayıda araştırmalara göre daha fazla metastaz eylemli sitogenetik bozukluğu monozomi 3 kromozom kaybı olarak tanımlanmıştır. Andrea G.M. ve arkadaşları uveal melanoma hastalarında 105 tümör dokusu üzerinde kromozom 3 kaybı olan dokuları PZR metodu ile incelemişler ve sonuç olarak monozomi 3 bozukluğunun epiteloid tümörlerde, metastaz nedeni ile hayatını kaybeden hastalar dokusunda, bu kaybın daha fazla metastaza sebep olduğu ispatlanmıştır [80]. Monozomi 3 aynı zamanda %40-%50 arasında başka değişimlere de yol açabilir. Bu değişimlerin en önemlisi 8.kromozomun kısa kolunun kaybı ve uzun kolunun kazanımı ve izokromozom (8q+) yapılmasıdır. Yaklaşık %45 oranında uveal melanoma tümör dokusu özellikle siliyer cisimlerde olan tümörlerde hem monozomi 3 (M3) hem 8q+ değişimleri birliktedir [80-93], ancak bazı uveal melanoma tümör dokularında da sadece 8q+ gözlemlenmiştir. Başka kromozom anomallikleri, 1.kromozomun kısa kolunun kaybı (1p-) ve 6.kromozomun kısa kolunun kazanımı ve bazen uzun kolunun kaybı (6p+ veya 6q-) varlığı uveal melanoma tümör dokularında görülebilir. Sitogenetik anomallikleri önemli metodlar olan çok katlı floresan in situ

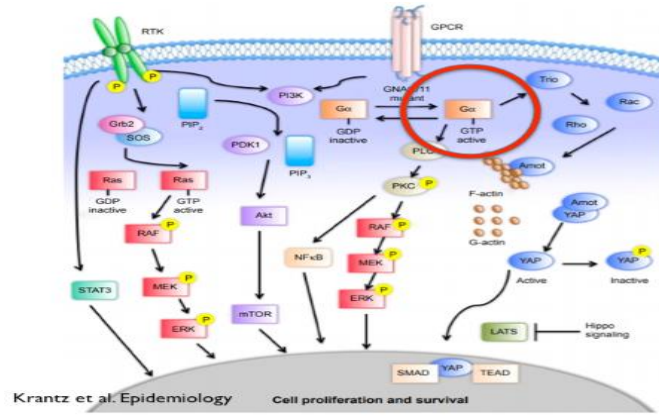
hibridizasyon (MFISH) ve dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH) sayesinde keşfedilmiştir. Ayrıca kromozom 6'nın materyal kaybı ve kazanımı toplamda %60-70'dir ve bu durumda en yüksek değişim oranına sahiptir [80, 81].

Uveal melanomda birkaç tekrarlayan kromozom anomaliliği, 1p, 3, 6q, 8p ve 9p kaybı ve 1q, 6p ve 8q kazanımı dahil olmak üzere prognostik amaçlı kullanılmaktadır. Çeşitli Standart karyotipleme teknikleri bu değişimleri tespit etmek için kullanılmıştır [80-85]. Bu teknikler, floresan in situ hibridizasyon (FISH) [80, 81], karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) [82-88], spektral karyotipleme [89], mikro uydu analizi (MSA) [90, 91], multipleks ligasyona bağlı prob amplifikasyonu (MLPA) [92] ve tek nükleotid polimorfizmler (SNP'ler) metodlarıdır [93]. Kromozom 3'ün bir kopyasının kaybının (monosomi 3) uveal melanomda önemi ve bu kromozomal kaybın en önemli prognostik biyomarker olarak bildirilmiştir [90-94]. Kromozom 3 durumunun prognostik doğruluğu dahil olmak üzere, 6p ve 8q material kazanımı ve diğer kromozomal değişimler, klinik ve prognostik grupların çoklu kombinasyonlarına yol açan histopatolojik bilgilerdir [92, 95, 96].

Tümörlerin yaklaşık % 10-20'sinde meydana gelen monozomi 3 ve izokromozom (8q) ile birlikte diğer değişiklikler, kromozom 9, 10 ve 11'i etkilerken, 16q'nun çıkarılması ve 21'in kazanılması [82-84, 89, 94, 97, 98] görülmektedir.

2.1.6.2. Moleküler Anormallikler

Günümüzde uveal malign melanomanın birçok önemli mutasyon ile ilişkili olduğu ve bu mutasyonların hangi sıklıkla meydana gelmesi, rolü ve önemi belirlenmiştir. Ancak arka uveal melanomada, tespit edilmiş en yaygın mutasyonlar, guanozin nükleotit bağlayıcı protein Q polipeptidi (GNAQ) ve bunun paralogu, guanozin nükleotit bağlayıcı protein alfa-11 (GNA11) mutasyonlarını içerir. Uveal melanomada mutasyonlar iki ayrı grup ve farklı önem taşımaktadır. Bir grup, GNAQ, GNA11, CYSLTR2 ve PLCB4 gibi mutasyonlar tümörün oluşumuna ve ilk aşamalara ait mutasyonlar ikinci grup ise prognostik anlam taşıyan, EIF1AX, SF3B1/SRSF2 ve BAP1 mutasyonlardır. Uveal melanomada genelde az sıklıkla mutasyonlar görülmektedir, bu hastalıkta Gα-sinyal yolunun önemini yeniden doğrulamaktadır. Yapısal olarak aktif Gα'nın etkileri arasında MAPK, PI3K – Akt – mTOR ve Hippo yollarının aktivasyonu bulunur (Şekil 2-7) [99].



Şekil 2-7: Aktif Gα'nın etkileri arasında MAPK, PI3K – Akt – mTOR ve Hippo yollarının aktivasyonu Kısaltmalar: PiP₂, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat; PiP₃, fosfatidilinositol (3,4,5) -trisfosfat;Gα, G-protein alfa alt birimi; GDP, guanozin difosfat; GPCR, g-protein birleşik reseptörü; GTP, guanozin trifosfat; P, fosfat; RTK, Reseptör tirozin kinaz.

Uveal malign melanoma hastalığında en önemli mutasyona uğrayan genler GNAQ ve GNA11 başta olmak üzere, BAP1, SF3B1, EIF1AX, CYSLTR2, SRSF2, PLCB4 ve PLCB4 genlerdir (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Uveal Melanomada En Yaygın Görülen Mutasyonlar. cBioPortal[100, 101].

GEN ADI	BULUNMA ORANI	MUTASYONLAR
GNAQ	50%	Q209P/L (90%) R183Q (5%) G48*/V (5%)
GNA11	45%	Q209L (94%) R183C (3%) R166H (3%)
BAP1	33%	Multiple
SF3B1	23%	R625H/C (78%) K666T (11%) H662R (5%) T663P (5%)

EIF1AX	13%	G6D (20%) G8R (20%) G9R/D (20%) G15D (20%) W70R (10%)
CYSLTR2	4%	L129Q (100%)
SRSF2	4%	Multiple
PLCB4	2.5%	D630N/V/Y (100%)
MAPKAPK5	2.5%	

Kutanöz melanomaya kıyas uveal melanomada daha az mutasyona rastlandığı bildirilmektedir. Kutanöz melanomlar MAPK aktivasyonu ile BRAF, NRAS mutasyonları veya NF1 fonksiyon kaybıyla tanımlanırken, uveal melanomada bu gibi mutasyonlar nadir görünmekle birlikte, G-protein α -alt birimindeki nokta mutasyonları ile karakterize edilir [102]. Uveal melanomada görülen mutasyonların %90'ını kapsayan ve ilk aşamada oluşan, diyagnostik açıdan önemli olan mutasyonlar *GNAQ* ve bunun paralogu olan *GNA11* mutasyonlarıdır. *GNAQ* ve *GNA11* mutasyonları genelde arka uveal melanomada ve 209'uncu kodonda Glutamin amino asitinin Prolin'e değişmesi ile ortaya çıkar. Bu mutasyon arka uveal melanomalarda yaklaşık %90 oranında görülmektedir [43, 103-106]. *GNAQ* / *GNA11* mutasyonları arasında 183'üncü kodonda yer alan mutasyondur. Bu mutasyon uveal malign melanom hastalarının tümör dokularında %5 oranında görülmektedir. *GNAQ/GNA11'deki* aktif edici mutasyonların varlığı, bu genlerdeki mutasyonların uveal melanoma onkogenezinde erken bir olay olduğunu göstermektedir. Bu mutasyonel değişikliklerin benign nevuslarda da görülmesi ilgili mutasyonların uveal malign melanom gelişiminde erken bir olay olduğunu kanıtlamaktadır [104, 107, 108].

İn vitro çalışmalar, *GNAQ/GNA11* mutasyonlarının hücre büyümesindeki aktif rolünü desteklemiştir, ancak kodon 183'teki mutasyonların, kodon 209'a göre MAPK yolu

aktivasyonu için daha az etkili olduğunu düşündürmektedir [109]. *GNAQ* veya *GNA11* aktive edici mutasyonların, uveal melanoma ilerlemesinin tüm aşamalarında (iyi huylu lezyonlar dahil olmak üzere) mevcut olduğu görülmüştür. Bu mutasyonların gelişiminin uveal melanomanın başlangıcını oluşturduğu düşünülmektedir [103, 110].

Meme kanserine bağlı protein 1 (BAP1) yaklaşık %80 metastatik uveal melanoma dokusunda ve bir tümör baskılayıcı rolü olabileceği uveal melanomada düşünülmektedir. BAP1 geni üçüncü kromozomun 3p21.1 lokusundadır ve özellikle metastatik uveal melanoma durumlarında kromozom 3 'ün bir kopyası sıklıkla silinir. BAP1 proteini, tümör baskılayıcı gen BRCA1 de dahil olmak üzere çeşitli proteinlerle etkileşime girer ve böylece BAP1 proteini, genom stabilitesinin korunması, epigenetik modifikasyon, transkripsiyon düzenlemesi ve DNA hasarı cevabında temel rol almaktadır.

BAP1'in mutasyonları (*GNAQ* / *GNA11*'in mutasyonlarının aksine), melanositik lezyonlarla sınırlı değildir ve uveal melanoma'nın yanı sıra diğer kanserlerde BAP1'in etkisinin, S- fazındaki hücreleri durdurarak proliferasyonunu doğrudan etkilemesi olduğu çeşitli durumlarda ileri sürülmüştür [109]. Uveal melanomlu genç hastalar arasındaki germ line mutasyonları, böbrek kanserleri ve mezotelyoma için bir eğilim oluşturan, ailelerde BAP1 mutasyonları ile korelasyonu ve BAP1'in kalıtsal uveal melanoma hastaları için yüksek metastaz riskli hastalar sınıfı arasında prognostik değeri olan bir gen olabileceğini düşündürmektedir [111-113].

Bir başka mutasyon ekleme faktörü 3B alt ünite 1 (SF3B1) geninde meydana gelir ve uveal melanoma vakalarının %10-% 20'sinde, ancak sadece monozomi 3 olmayan alt kümesinde bulunmaktadır [114-116]. SF3B1 geni, ikinci kromozomun q33 bölgesinde bulunur ve mRNA öncülünü (spliceosome) işlemekten sorumlu olan büyük bir kompleksin alt ünitesini kodlar ve splicing aktivitesinde mRNA'yı koruma ve doğru kodlamayı sağlamakta önemli rol almaktadır [117].

Bu nedenle SF3B1'in mutasyonları, birçok gen için alternatif değişkenleri üreten, uveal melanoma ve diğer kanserlerde farklı mutasyonlarla, çoklu genler için alternatif ekleme (splicing) olaylarına yol açan bir gen sayılmaktadır. SF3B1 mutasyonları dizomy 3 ve BAP1 mutasyonları ile ters korelasyonda ve daha iyi prognoz ve gecikmiş metastaz gelişimi ile ilişkilidir [116, 118].

EIF1AX ökaryotik translasyon başlatma faktörü 1A'nın X'e bağlı mutasyonları, yaklaşık %13'ü arka uveal melanomda görünmektedir [115, 119]. Protein kodlamasında

hedef mRNA'nın tanınmasında ve ribozomun stabilizasyonunda görev alan translasyonun başlatmasında önem arz eden EIF1AX, translasyonda mRNA ile etkileşime girer [119].

Bununla birlikte, hem SF3B1 hem de EIF1AX'in, dizomi 3 olmayan uveal melanoma tümörlerinin ilerlemesinde önem taşıdığı öne sürülmektedir [120].

Kutanöz melanomun aksine, uveal melanoma'daki mutasyon yükü düşüktür. Uveal melanomada TCGA cohort somatik mutasyonun miktarını her megabazda 1,1 olduğu ancak kutanöz melanomada 18 olduğu bulunmuştur [102, 121].

Uveal melanomada daha önce tartışılan genlerin yanı sıra bazı arka plan ve % 1'lik düşük insidansa sahip olan telomeraz ters transkriptaz (TERT) gibi genler aynı zamanda birçok kanserde yaygın olarak bildirilmiştir [122, 123]. TERT, telomer uzunluğunun korunmasında, hücre döngüsü kontrolünde ve DNA hasarı yanıtında çok işlevli bir role sahiptir [122, 124-126]. Uveal melanoma tümör dokusunda meydana gelen başka bir mutasyon %5'i sisteinil lökotrien reseptör 2 (CYSLTR2) ve fosfolipaz C beta 4 (PLCB4) genlerinde meydana gelir. Ancak çok düşük bir oranda ve uveal melanomada etkisini açığa çıkarılması daha fazla araştırmalar gerektirir.

2.1.6.3. Epigenetik Anormallikler

Epigenetik modifikasyonlar, kanserde DNA ve histon metilasyonu, miRNA ifadesinin değişmesi ile ilgili mekanizmaları temsil eder [127, 128].

Uveal melanom'de epigenetik mekanizmalar aşağıda gruplanmaktadır:

Kodlamayan RNA'lar

- MikroRNA'lar

Son araştırmalar, miRNA'lar olarak bilinen kodlamayan RNA sınıfının UM'deki rolüne ışık tutmuştur. miRNA'lar kısa (17-22 nükleotid uzunluğunda), endojen, kodlamayan RNA sınıfıdır ve gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynar [129]. Birçok miRNA, uveal melanoma dokularında ve hücre dizilerinde farklı ifade seviyeleri gösterir. mRNA'ların 3' çevrilmemiş bölgesindeki (3'UTR) tamamlayıcı bölgeler ile baz eşleşmesi yoluyla, miRNA'lar mRNA'ları indirgeyerek ve çevirilerini bastırarak hedef genleri düzenler [130].

Birkaç çalışma, miRNA'ların düzensizliğinin hücre döngüsü ilerlemesini destekleyebileceğini, apoptoza karşı direnç sağlayabileceğini ve kanser hücrelerinin yayılımını ve metastazını artırabileceğini bildirmiştir (Tablo 2-2).

Table 2-2: Kanserlerde bazı örnek miRNAların değişimi ve hedef genlere etkileri.

İsim	İfade düzeyi	Hedef gen	Rol	Referans
miR-34a	Azalmış	c-Met, Akt	Tümör baskılayıcı	[131]
miR-137	Azalmış	MITF, c-Met, CDK6	Tümör baskılayıcı	[132]
miR-149*	Artmış	GSK-3 α	Onkogen	[133, 134]
miR-134	Artmış	VEGFA, FOXM1, MYCN, CD9, WWOX1	Onkogen	[134, 135]
miR-214	Azalmış	PTEN, AP2, TP53	Tümör baskılayıcı	[136, 137]
miR-146b	Artmış	NF-kB, SMAD4	Onkogen	[138]
Let7b	Azalmış	cyclin D1	Tümör baskılayıcı	[139-142]
miR-34b/c	Azalmış	c-Met, Akt	Tümör baskılayıcı	[143]
miR-182	Azalmış	MITF, BCL2, cyclin D2, Akt and ERK1/2	Tümör baskılayıcı	[144]

- Uzun kodlamayan RNA'lar

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA), başlangıçta genomun 'karanlık maddesi' olarak kabul edilen 200 nükleotidden daha uzun, protein kodlaması olmayan transkriptleridir. Son yıllarda lncRNA'ların gen ifadesinin düzenlenmesinde oynadığı rolün önemi giderek artan bir şekilde kabul edilmektedir. miRNA'lardan farklı olarak, lncRNA'lar karmaşık ikincil ve üçüncül yapıları gösterir, düzenleyici işlevlerini yerine getirmek için hayati proteinleri, RNA'yı ve DNA'yı bağlarlar [145]. Biriken kanıtlar, lncRNA'ların, transkripsiyon dahil olmak üzere bir dizi süreçte, düzenleme, tümörijeniz ve metastatik kaskad önemli roller oynadığını göstermektedir [146, 147]. Örneğin, lncRNA Kcnq1ot1, genomik baskıyı kontrol etmek için kromatin döngüleri oluşturur [148].

Son çalışmalar ayrıca CASC15 lncRNA'nın melanom ilerlemesi sırasında yukarı regüle edildiğini ve melanomun hücre proliferasyonu ve invazyon fenotipleri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur [149].

DNA Metilasyonu

DNA hipermetilasyonu

CpG adalarının anormal promotor hiper-metilasyonunun kanserde tümör baskılayıcı genlerin (TSG'ler) inaktivasyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir [150]. Önceki çalışmalar sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A (p16INK4a) kaybının ilerleyen melanomlu hastalarda ifadesi, artan tümör hücresi proliferasyonu ve azalmış hasta sağkalımı ile ilişkilidir [151, 152]. Hücre döngüsünün

G1fazı boyunca tümör hücrelerinin ilerlemesi, siklin D'nin Rb'yi fosforile eden sikline bağımlı kinazlarla (CDK'ler) birleşmesiyle uyarılır [153]. Rb fosforilasyonunun ardından, E2F aktive olur ve S fazına özgü gen ifadesini arttırır. P16INK4a, siklin D-CDK4 ve siklin D-CDK6 kinazlarını kısıtlayabildiği ve G1-S kısıtlama noktasında hücre döngüsü kontrolü ile sonuçlanabildiği için siklin D/CDK kompleksinin bir inhibitörü olarak tanımlanmıştır [154]. P16INK4a, birçok malign durumda yaygın olarak inaktive olmasına rağmen [155], p16 INK4a'nın germ hattı mutasyonları, uveal melanoma yerine ailesel kutanöz melanoma ile benzersiz bir şekilde ilişkilidir [156, 157]. Tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu için genellikle alternatif bir mekanizma transkripsiyonu azaltan CpG adalarının de novo metilasyonudur. P16INK4a promoter bölgesinin de novo metilasyonu, çok çeşitli malignitelerde meydana gelir [158] ve hücre güçlü bir hücre döngüsü inhibitörünü kaybeder. Başka araştırmalarda farklı genlerin metilasyonu üzerine yapılmıştır (Tablo2-3).

Table 2-3: Promotor metilasyonunun uveal melanomda fonksiyonu.

Gen	Hiper metilasyon oranı	Fonksyon	Referans
RASSF1A	91%	RAS ailesine bağlı bölge	[159-166]
MGMT O6-	10%-30%	DNA'ya metilguanin transfer eder	[167]
DcR1, DcR2	91%-97%	TRAIL reseptörü	[168]
p16/INK4a	/	Tümör supresörleri stabil eder	[151-158, 169, 170]
CXCR4, CCR7	/	Hipermetile olması metastazı engelliyor	[171]
RASEF RAS	46%-54%		[172-174]

DNA hipometilasyonu

Tümörjenezde tümör baskılayıcı genlerin DNA hipermetilasyonu ile karşılaştırıldığında, DNA hipometilasyonu daha az yaygındır. Örneğin, Melanomda Tercihli Olarak Eksprese Edilen Antijen (PRAME), uveal melanomda metastazın doğru bir biyobelirtecidir [175].

Field ve arkadaşları PRAME promoter etrafındaki belirli CpG sitelerinin farklı olarak hipometillenmesini raporlamışlar. Sonuç olarak, gen Sınıf 1 ve Sınıf 2 uveal melanomlarda aktive olur ve her iki sınıfta da artmış metastatik risk ile ilişkilidir [176].

Histon Modifikasyonu

Histon modifikasyonu, histon metilasyonu, asetilasyon, fosforilasyon, poliadenilasyon, ubiquitinasyon ve ADP ribosilasyon, ilgili enzim yardımıyla gerçekleştirilir. Histon metilasyonu, histonun lizin veya arginin kalıntılarının gerçek transkripsiyon sonrası metilasyonu yaygındır ve gen regülasyonunda önemli roller oynar. Gen mutasyonuna bağlı anormal histon metilasyonu, translokasyon veya aşırı ifade genellikle bir kanserin başlamasına neden olabilir. Örneğin, H4K20 ve H2BK5'in monometilasyonu; H3K4, H3K36 ve H3K79'un trimetilasyonu gen ifadesini desteklerken, H3K9'un dimetilasyonu ve H3K9 ve H3K27'nin trimetilasyonu gen ifadesini inhibe eder [177-179].

2.1.7. Metastaz

Uveal melanoma'nın birincil tedavisine bakılmaksızın hastaların yaklaşık yarısında metastaz gelişir [180]. Uveal melanoma yüksek oranda metastaz yapma eğilimi olan, hematogen ve metastatik tümörler % 90-95'inde karaciğere yayılır. Primer tümörün kontrolünden yıllar sonra yeni uzak metastaz gelişiminin bir açıklaması, dolaşımdaki ilk tanı anında yayılan tümörün hücrelerinin varlığıdır [181]. Başka bir deyişle, hastalık genellikle tümör teşhisi sırasında zaten yayılmıştır. Hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi, tümör hücrelerinin karaciğere tercihli ve buna karşılık gelen reseptör c-Met, insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) ve kemokin CXCL12 yönlendirilmesinde çeşitli yollar yer almıştır [182].

Karaciğer metastazı durumunda prognoz, yaklaşık 8 aylık bir ortalama sağkalımla kötüdür [183]. Sağkalımı veya yaşam kalitesini iyileştiren metastatik uveal melanoma için hiçbir terapötik seçenek olmamasına rağmen, karaciğer metastazının taranması için aşağıdaki yöntemler kullanılabilir: karaciğer fonksiyon testleri (gama-glutamil transpeptidaz (γ GT) ve laktat dehidrojenaz (LDH) kan örneğinden), US, CT ve MRI ile karaciğer görüntüleme. Her yıl veya altı ayda bir taramaya rağmen, karaciğer fonksiyon testleri ile karaciğer metastazı için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yaygın karaciğer metastazları ve normal karaciğer fonksiyon testleri raporları bulunmaktadır [184, 185]. Negatif prediktif değerin yüksek olması nedeniyle, hastaların normal karaciğer fonksiyon testlerinde metastaz olmama şansı %97,5 veya daha fazladır. Bununla birlikte, aspartat aminotransferaz (AST), alanin transaminaz (ALT), γ GT, LDH ve fosfatidik asit (PA) için izole veya kombine karaciğer fonksiyon testleri, erken karaciğer

metastazının saptanması için endike değildir [186]. Uveal melanomda diğer metastaz bölgeleri akciğer ve kemikler daha az sıklıkla görülmektedir.

2.2. MİKRORNA (miRNA)

mikroRNA'lar (miRNA'lar) yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda küçük tek iplikli fakat proteine translasyonu gerçekleştirmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir. mikroRNA'lar genellikle transkripsiyonal gen regülasyonuna dahil olup, post-transkripsiyonel gen ifadesini düzenlemesi, translasyon baskılama, özel olarak dizilerde mRNA bozunmasıyla gen ifadesini düzenlemesi ve çeşitli aktiviteler sağlamaktalar. Aynı zamanda mikroRNA hücre proliferasyonu, metabolik olayları, farklılaşma ve apoptoz gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol almaktadır. Son çalışmalar, bazı miRNA'ların kanser oluşumunda önemli olan hücre çoğalmasını ve apoptoz süreçlerini düzenlediğini göstermektedir [187-190]. Son çalışmalar, bazı miRNA'ların kanser oluşumunda önemli olan hücre çoğalmasını ve apoptoz süreçlerini düzenlediğini göstermektedir [187].

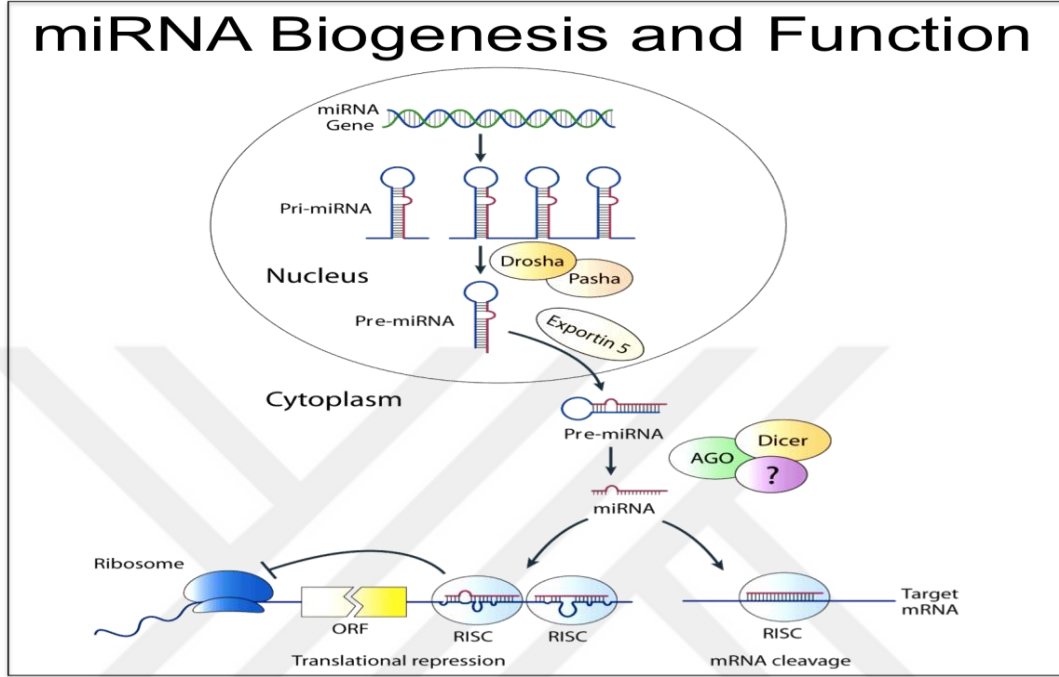
İnsan genomunda miRNA'ları kodlayan yüksek seviyede korunmuş yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir ve şu an itibarıyla, insan genomunda 1000'in üzerinde mikroRNA tanımlanmıştır [14, 191]. Bir miRNA birden fazla mRNA'nın ifade düzeyini etkiler ve her mRNA birden fazla miRNA etkisine maruz kalması mümkündür [192]. MiRNA genleri bağımsız şekilde veya kümeler içerisinde ifade edilmektedir [193] ve çoğunlukla intronik bölgelerde bulunmaktadır. MikroRNA'lar hem ekzojenik hemde introjenik etkiye sahip moleküllerdir ve aynı zamanda tüm insan kromozomlarında, Y kromozomu hariç bulunmaktadır [194, 195]. Protein kodlayan genlerin %30 oranını düzenleyen miRNA'lar tüm genlerin yaklaşık % 1-3'ünü kapsar [196, 197].

2.2.1. MikroRNA'ların Keşfi

Günümüze kadar, insan genomunda etkili yaklaşık 2000 miRNA tanımlanmıştır [198]. İlk mikroRNA, Lee ve çalışma arkadaşları tarafından 1993 yılında Victor Ambros laboratuvarında yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans*'ta lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe etmesiyle rapor edildi [14, 199]. Reinhart ve arkadaşları 2000 yılında, 22 nükleotid uzunluğunda *C.elegans* gelişim zamanlamasını düzenleyen miRNA let-7 yi aynı canlıda keşfetmişler [200, 201]. Ancak bulunan bu genetik

materyal için mikroRNA terimi ilk defa 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır [199].

2.2.2. MikroRNA'ların Biyogenez ve Fonksiyonu (Şekil 2-8)



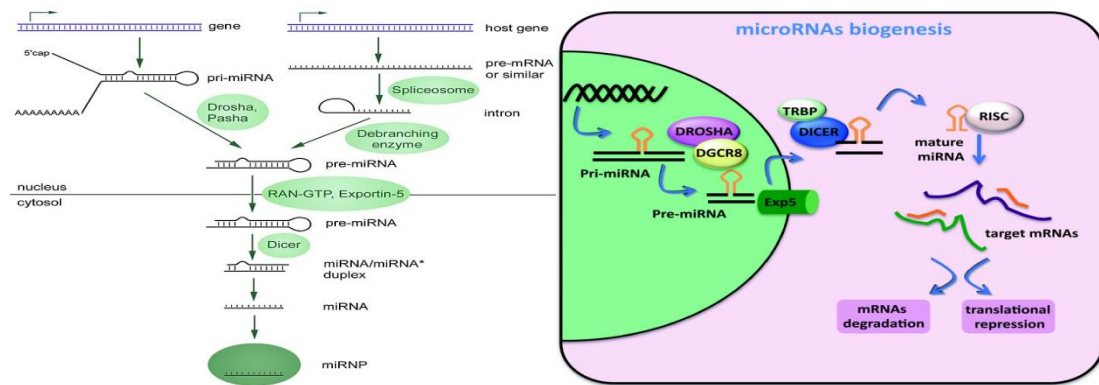
Şekil 2-8: miRNAların biyogenez ve fonksiyonu

2.2.2.1 miRNA Biogenezi

Küçük transfer RNA (tRNA), ribozomal RNA(rRNA), küçük nükleolar RNA (snoRNA), küçük müdahale RNA (siRNA) ve mikroRNA (miRNA) gibi birçok küçük endojen RNA molekülleri hücrelerde bulunmaktadır. Bunların arasında miRNA ve siRNA, biyokimyasal ve işlevsel olarak ayırt edilemez. Her ikisi de 5'-fosfat ile 3'-hidroksil uçlarına sahip, 19-22 nükleotid (nt) uzunluğunda ve çok özel gen ifadesini susturmayı sağlamak için RISC kompleksi ile birleştirilebilmektedir [191, 202, 203]. Bu nedenle bu moleküller kökenlerine göre ayırt edilmektedir [13, 191, 202].

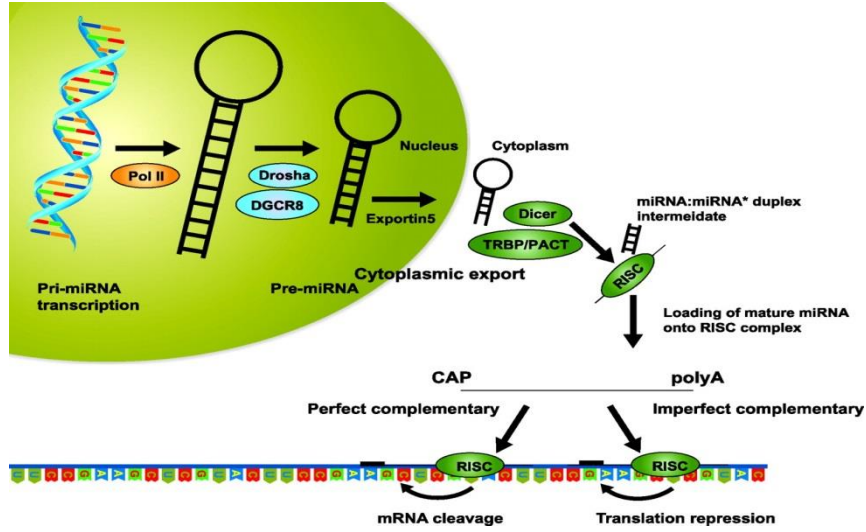
Aslında RISC aracılığıyla transkripsiyon sonrası gen susturmaya aracılık eden tüm küçük RNA, kökenine bakılmaksızın siRNA olarak adlandırıldı, ancak miRNA ve siRNA arasında ayırım yapmak yaygın bir prosedürdür. MiRNA öncülleri genellikle kümelerde bulunur. Genomun birçok farklı bölgesi aracılığıyla, en sık olarak genler arası bölgeler ve protein kodlayan genlerin intronları bölgesinden oluşmaktadır [204, 205].

miRNA biyogenezi iki aşamalı bir mekanizmaya sahip ve birinci aşama çekirdekte, ikinci ise sitoplazmada gerçekleşmektedir. miRNA'lar çekirdekte RNA Polimeraz II veya RNA Polimeraz III enzimleri tarafından transkripte edilmektedir [206]. MikroRNA biyogenezi çekirdekte RNA polimeraz II aracılığıyla transkripsiyon ile başlar ve daha sonra enzimler aracılığıyla hairpin olgun miRNA dizisini içeren uzun miRNA (pri-miRNA) yapısına dönüştürülür [207] ve son adımda sitoplazma içerisinde olgun miRNA'ların oluşumu gerçekleştirilir [208]. Bu hairpin şeklindeki yapı Drossha (RNAase III enzimi) ve onun kofaktörü DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8) ile kesilir ve prekürsör miRNA oluştuktan sonra çekirdekte sitoplazmaya Exportin-5(XPO5)/ RanGTP yardımı ile taşınır ve aynı zamanda EXP-5 varlığı pre-miRNA'nın stabilizasyonu sağlamak da yardımcı olur. RNAase III enzimi Dicer tarafından yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki dubleks miRNA'ya kesilir [209-215]. Pri-miRNA yapısının normalde tüm mRNA'larda olduğu gibi 5'cap ve 3' Poli A yapısı mevcuttur [216]. Bu çift zincirli yapı kılavuz ve antikılavuz olarak adlandırılmaktadır. Argonaute (Ago) ya yüklenen susturma kompleksi (RISC) efektörü klavüz ipliğini içermektedir [192, 198-200, 206, 208, 217-220] aynı zamanda antikılavuz iplik degrade olmaktadır. Aktif RISC kompleksinin çalışması için olgun tek zincirli miRNA ve Ago2 ile birleşmesi gerekmektedir (Şekil 2-9) [221, 222].



Şekil 2-9: miRNA biyogenezi

RISC kompleksi içerisindeki olgun miRNA, hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlandıktan sonra mRNA'nın yıkımı veya translasyon baskılanmasında rol almaktadır [223].



Şekil 2-11: miRNA Fonksiyonu

2.2.3. MikroRNA'lar ve Kanser (Diagnoz, Prognoz ve Tedavi)

MikroRNA'lar hücrel mekanizmaların düzenlemesinde anahtar rollere sahip olduğu ve düzensizliklerinin kanser hücrelerinin kötü huylu fenotipini korumak için gerekli olduğunu günümüzde birçok araştırma sonucu göstermiştir. MikroRNA'ların farklı tümör türlerinde ve alt kümelerindeki bozulmuş ve benzersiz ifade profili, biyolojik sıvılar ve hücre içerisindeki değişimleri miRNA'ları hassas biyobelirteçler olarak çekici bir kaynak haline getirmesiyle birlikte prognostik değerleri günümüzde önemli araştırma konuları arasında yer almaktadır. miRNA genlerinin yarısından fazlasının kanserle ilişkili genomik bölgelerde veya hassas bölgelerde bulunduğunu gösteren çeşitli raporlar vardır. Geniş bir kanser dokularından elde edilen hücrelerin mikro dizi ifade verileri, anormal miRNA ifadeunu kanser oluşumu ve ilerlemesinde önemli bir neden olduğunu göstermiştir. miRNA'ların birçok kanser türünde oynadığı rol ve katılım, lösemi, lenfoma, glioblastoma, meme, kolon, mide, akciğer, prostat, tiroid, karaciğer ve yumurtalık kanseri dahil olmak üzere farklı kanser türlerinde bildirilmiştir [227-245].

miRNA'nın ifadesi kanser dahil çeşitli hastalıklarda geniş çapta bozulduğunu gösteren araştırmalar vardır. Tümör dokuları ve kültürlenmiş tümör hücreleri, sıklıkla anlamlı derecede azalmış olgun miRNA ifade seviyelerini sergiler [240]. miRNA'nın oligonükleotid mikroarray analizi, çok sayıda kansere özgü hücre tipinde yüzlerce miRNA'nın ifade seviyelerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan yüksek

verimli tekniktir [246, 247]. miRNA profillemesini kullanan çalışmalar, kanser hücrelerinde bulunanlarla aynı dokudaki normal hücreler ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde farklı miRNA profilleri raporlamışlar. Aynı zamanda miRNA ifade düzeyi in situ ve invaziv kanserde farklı görülebilir. Örneğin, meme kanseri dokusu kullanılarak yapılan ayrı ve benzer bir araştırmada, let7d, miR-210 ve miR-221'in duktal karsinomda in situ iken aşağı regüle edildiği bulundu ancak invaziv geçişte yukarı regüle edilmiştir [248].

miRNA'nın anormal ifadesi ile ilgili farklı mekanizmalar öne sürülmüştür. En önemli üç mekanizma: (i) genetik değişiklikler ve tek nükleotid polimorfizmi (SNP), (ii) epigenetik susturma ve (iii) miRNA biyogenez yolağındaki kusurlar olarak görülmektedir.

(i) Genetik değişiklikler ve SNP: İnsan miRNA genlerinin tam haritalanması, miRNA'ların büyük çoğunluğunun kırılğan bölgeler, kansere özgü translokasyon kırılma noktaları, tekrarlayan dizileri ve CpG adaları olduğunu öne sürdülmektedir [249]. Bununla birlikte, bazı çalışmalar, bu tür bir ilişkinin doğrudan olmadığını ve spesifik kanser türüne bağlı olduğunu göstermiştir [250]. Ayrıca, tek nükleotidlerde (SNP'ler) polimorfizmin varlığı yaygın olarak bilinmektedir ve SNP'lerin kanserle ilişkili yolaklarda miRNA hedefleri üzerindeki etkisini düşündüren kanıtlar sunulmuştur [251]. SNP'ye bağlı bir işlev kazanımı, bunun miRNA'ların hedef gen ile etkileşimini artırabilir ve böylece bir tümör baskılayıcı gibi rol gösterebilir, aksine, SNP'ye bağlı işlev kaybı, daha sonra bir onkogen görevi gören miRNA ifadeunun artmasına neden olabilir [252]. Tüm bu gözlemler SNP'lerin miRNA'ların biyogenez ve fonksiyonunun düzenlenmesinde katkıda bulunan faktörlerden biri olabileceğini öne sürdü.

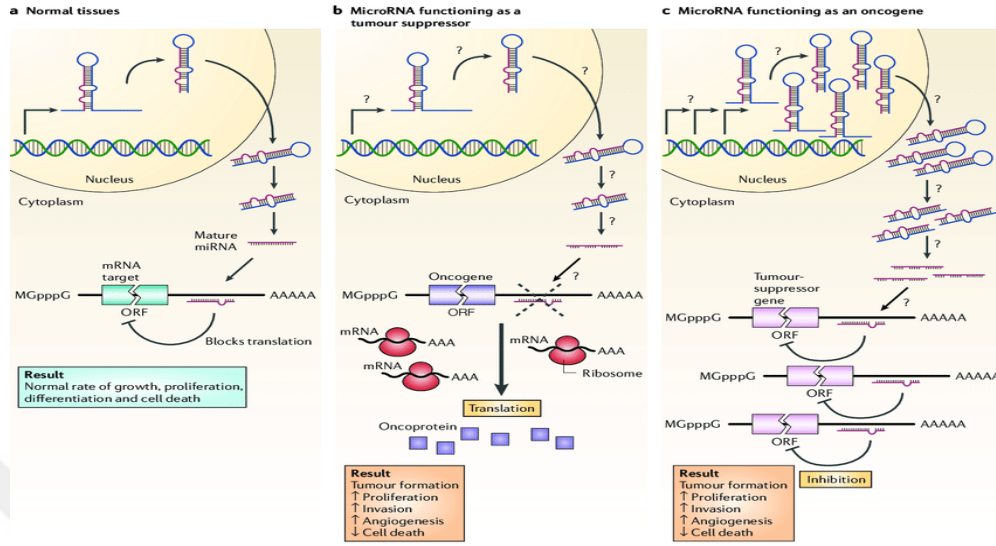
(ii) miRNA ifadeunun epigenetik düzenlenmesindeki değişiklikleri çeşitli araştırma grubu, örneğin hiper veya hipo-metilasyonun miRNA genlerinin aktivitesini etkilediğini gözlemlemiştir [253-255], çünkü miRNA genlerinin özellikle CpG adalarının yakınında bulunanların ifadeu, metilasyon süreçlerinden daha kolay etkilenme eğilimindedir [253, 254, 256]. Örneğin, kolorektal kanserlerde tarama araştırmaları komşu CpG adalarının hiper metilasyonuna bağlı olarak miR-34b ve miR-34c'nin epigenetik susturulması ve metilasyon sürecindeki değişiklik miR-9 ailesi genlerini etkiledi [257].

(iii) miRNA yolağındaki kusurlar önemli bir mekanizma olarak tanımlanmıştır çünkü insanlarda miRNA'ların çoğu, kodlamayan veya kodlayıcı olmayan transkriptlerin intronları tarafından kodlanır. Bununla birlikte, bazı miRNA'ların ekzonik bölgeler tarafından kodlandığı bildirilmiştir. miRNA'yı kontrol eden genler genellikle kümelenir ve polisistronik mesajlar olarak kopyalanır veya mRNA'lardan kaynaklanıyor [215]. Çoğu miRNA geni için promoterlerin kesin konumları henüz haritalandırılmamıştır, ancak bunlar CpG adalarının kolektif analizi, RNA dizilimi ve kromatin immün çökeltme ve ardından ChIP-dizileme yoluyla çıkarılabilir [258]. Polimeraz-II ile ilişkili çok sayıda transkripsiyon faktörünün birkaç miRNA genini aktive ettiği veya baskıladığı bildirilmiştir. Bazı miRNA'ların seviyesi, RNA stabilite seviyesinde düzenleyici rolü olduğu gösterilmiştir [259].

2.2.4. Tümör Baskılayıcı ve Onkogenik mikroRNA'lar

MikroRNA farklı normal doku türünde çeşitli yollarda ve fonksiyonlar da rol almaktadır. Hayvanlar ve bitkilerde olduğu gibi insan hücrelerinde de önemli düzenleyici moleküllerdir. miRNA'lar hücre içerisinde zaman zaman fonksiyon ve seviyelerinde artış veya azalma görülebilmektedir. MiRNA'lar, hedef mRNA'larını tamamlayıcı sekansına dayalı olarak tanırlar böylece mRNA'nı degrade ederek, protein translasyonunu inhibe eder. MikroRNA'lar, gelişmeye ve normal işleve katkıda bulunmanın yanı sıra çeşitli insan hastalıklarında da işlevlere sahiptir. MiRNA'ların hücrel farklılaşma ve proliferasyonu düzenlemede önemini göz önüne aldığımızda, yanlış düzenlemelerinin kanserle bağlantılı olması da şaşırtıcı değildir. miRNA ifadeleri kanser hücreleri ve farklı evrelerinde değişim göstermektedir. miRNA ların kanserli hücrelerde hem onkogenik hem tumor baskılayıcı fonksiyonları ispatlanmıştır (Şekil 2-12). miRNA'ların amplifikasyonu veya aşırı ifadesi, tümör baskılayıcı genleri veya hücre farklılaşmasında rol oynayan diğer genleri aşağı regüle edebilir, böylece proliferasyonu, anjiyojenez ve invazyonu uyararak tümör oluşumu ve ilerlemesine katkıda bulunabilir ve onkogen rolü oynar. Benzer şekilde miRNA'lar, onkogenik aktiviteye sahip farklı proteinleri aşağı regüle ederek, tümör baskılayıcı olarak hareket ederler.

miRNA ifade profilleri, kanser teşhisi için yararlı biyobelirteçler haline gelebilir. Ek olarak, miRNA tedavisi kanserin önlenmesi ve tedavisi için güçlü bir araç olarak da kullanılabilir.



Şekil 2-12: MikroRNA'lar, normal, tümör baskılayıcı, ve onkogen olarak işlev görebilir. A. normal dokuda uygun transkripsyonu ve hedef gen ve protein üzerinde normal etkisi ve sonuç normal hücresel büyüme ve proliferasyon, farklılaşma ve hücre ölümü. B. Tümör baskılayıcı işlevi gören bir miRNA azalması veya silinmesi sonuç olarak tümör oluşumuna yol açar. miRNA biogenezin herhangi bir aşamasında kusurlar nedeni ile azalır ve dokuda artan proliferasyon, invazyon ve anjiyogenez ve azalmış apoptoz ve farklılaşma seviyelerine neden olur. C. Onkogenik işlev görür ve bir miRNA'nın aşırı ifade tümör oluşumuna sebep olur.

2.2.4.1. Tümör Baskılayıcı mikroRNA'lar

Gelişmiş ülkelerde yetişkinlerde sık görülen lösemi formu Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastalarında yaklaşık % 50'sinde 13q14 bölgesi delesyona uğradığı bilinmektedir. Kanser gelişim sürecine mikroRNA'ların katkıda bulunduğu ilk kanıtı 13q14 bölgesindeki delesyona uğrayan miR-15a ve miR16-1, 2001 yılında Calin ve meslektaşları tarafından moleküller bir çalışmada KLL hastaları üzerinde ortaya çıkmıştır. Detaylı delesyon analizleri sonucunda bu bölgede yalnızca mir-15a ve mir-16-1 genlerinin bulunduğu saptanmış ve yapılan bu mikroarray çalışmasında B hücreli KLL hastalarının % 68'inde mir-15a ve mir-16-1'in ifade düzeylerinin azaldığı veya hiç yapılmadığı bulunmuştur. Ayrıca miRNA ifade KLL hastalarının klinik özellikleri ile yakın ilişkili olduğu raporlanmıştır. Yapılan çalışmada miR-15a ve miR-16-1 ifade seviyelerinin KLL hücrelerinde, anti-apoptotik B hücreli lenfoma proteini olan Bcl-2' nin üretimi ile ters ilişkili olduğu tespit edilmiştir [231, 260, 261], dolayısıyla miR-15a ve miR16-1'in düşük seviyeleri (tümör süpresör fonksiyon kaybı) apoptozu önler ve kontrolsüz hücre büyümesine sebep olur [261]. MikroRNA ifade farklılığı, kanserli ve normal dokular arasında, miRNA'ların kanser patogenezinde önemli rol oynadığını vurgulamıştır [231].

Tümör süpresör özelliği gösteren bir diğer miRNA, let-7 ailesinin üyeleri (let-7b, let-7c, let-7d, let-7f ve let-7g) dir. Hücre kültüründe akciğer dokusundaki let-7 seviyelerinin arttığında, kanser hücrelerinin büyümesinin önemli derece de azaldığı saptanmıştır [262]. Let-7 gibi kanserlerdeki yetersiz ifade edilmemiş miRNA'lar, tümör baskılayıcı genler olarak işlev görür ve hücre farklılaşmasını veya apoptozu kontrol eden onkojenleri veya genleri düzenleyerek kanserleri inhibe edebilir. Let-7'nin düşük seviyeleri, RAS onkogeninin kontrolsüz bir şekilde fonksiyon göstermesine sebep olur [243, 260-264] ve bu durumda tümör süpresör fonksiyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, let-7 mikroRNA ailesinin üyeleri HMGA230 ve c-Myc31 onkogenlerinin mRNA'larını da inhibe ettikleri raporlanmıştır [264]. Üç izoformu olan miR-29 (miR-29a, miR-29b, miR-29c), tümör süpresör karakter sergileyen diğer mikroRNA'lar arasındadır. Mir-29 ailesini kronik lenfositik lösemi (KLL), akciğer kanseri, invaziv meme kanseri, akut miyeloid lösemi (AML) ve kolanjiyokarsinom hücrelerinde baskılayıcı aktivite gösterdiği öne sürülmüştür [228, 264-270].

Başka bir mikroRNA, miR-143 birçok histolojik tümör türlerinde, anormal büyümeyi baskıladığı görülmüştür. B-hücreli kanserler, meme, serviks, kolorektal, mesane ve hipofiz tümörlerinde, miR-143'ün tümör süpresör olarak görev yaptığı rapor edilmiştir [270-275].

2.2.4.2. Onkogenik mikroRNA'lar

Onkogenik miRNA'lar birçok kanser türünde kontrolsüz büyümeye sebep olup, antiapoptotik fonksiyon göstermektedir. miR-155 bulunan ilk onkogenik miRNA'lardan biri olarak, protein kodlamayan BIC (B cell Integration Cluster) geni ile beraber eksprese edilir ve hedef mRNA'sı tam olarak belirlenememiştir. Ancak yapılan bazı çalışmalarda, miR-155'in B-hücreli lenfoma, meme, pankreas, akciğer ve Hodgkin lenfoma gibi kanserlerde yüksek ekspresiyon sergilediği gösterilmiştir [228, 235, 268, 276-278]. Başka bir onkogen fonksiyonu gösteren mikroRNA, miR-21'dir. MiR-21'in AML, KLL gibi hematolojik malignite ve birçok solid tümörler, pankreas, prostat, mide, kolon, akciğer, meme ve karaciğer kanseri gibi farklı kanser türlerinde yüksek seviyede ifadesi rapor edilmiştir [241, 267, 269, 279, 280] aynı zamanda miR-21, invazyon ve metastaz olaylarında önemli rolü saptanmıştır. MiR-17-92 gibi kanserlerde aşırı eksprese edilen miRNA'lar, onkogenler olarak işlev görebilir ve tümör baskılayıcı genleri, hücre farklılaşmasını veya apoptozu kontrol eden genleri negatif olarak düzenleyerek kanser gelişimini teşvik edebilir. miR-17 ve miR-92 gen kümesi, insan

genomunda kromozom 13q31.3 bölgesine yerleşmektedir. Altı adet miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-92-1) kodlayan bu bölge, ekspresyon sonucu, proliferasyonu artışı ve apoptoz inhibisyonu sağlayarak aynı zamanda tümör anjiyogenezini tetikleyerek kanser gelişimine katkı sağlamaktadır [281, 282]. Akciğer gelişiminde, bağışıklık ve hematopoeitik sistemlerin düzenlenmesinde anahtar rol oynayan bir bölge olması sebebiyle, miR-17-92 gen kümesi hematolojik malignitelere ve çok çeşitli solid organ tümörlerinde (meme, kolon, akciğer, pankreas, prostat, mide ve lenfomalar) de yüksek seviyede ifadesi gerçekleşmektedir. MiR-17-92 transgenik farelerde yüksek seviyede c-MYC onkogeninin ifadesine neden olarak B hücreli lenfomanın gelişiminde artırdığı görülmüştür [281, 282].

2.2.5. MikroRNA'lar ve Uveal Melanoma

Uveal malign melanomda bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucuna göre çeşitli miRNA'ların hastalıkta yükseldiği veya azaldığı ve bu hastalıkta tümör supresor veya onkogen rolü aldığı tartışılmıştır. Chen ve arkadaşları uveal malign melanom hücrelerinde miRNA-137 ekspresiyon seviyesinin azalmasını keşfettiler. MiR-137'nin aşırı ifadesi, G1 / S faz geçişini bloke ederek hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe edebilir. Aynı zamanda hedef gen taraması ve biyoinformatik teknikleri kullanarak, miR-137'nin potansiyel hedef genlerinin c-Met, CDK6 ve MITF olduğunu buldular [132]. Başka bir çalışma, steroid reseptör koaktivatörlerinin (SRC'lerin) p160 ailesinin, ana düzenleyicisi olduğu ve kritik onkogenik rolü, tümör büyümesi, metastaz ve ilaç direncine katkısı olduğunu ortaya koymuştur. miR-137, SRC'lerin ifadesini azaltabilir ve uveal melanomda hücre proliferasyonunu baskılayabilir [283].

Li ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada uveadaki melanositler ve uveal melanoma hücreleri üzerinde uveal melanositlerin aksine, uveal melanoma hücrelerinin daha düşük bir miR-145 seviyesine sahip olduğunu buldular. miR-145, G1/ S fazlarının geçişini bloke ederek yukarı düzenlemesi ve hücre proliferasyonunu inhibe ve apoptozu teşvik edebilir. miR145'in aşırı ifadeuna, hedef geni olan insülin reseptörü substratı 1'in (IRS-1) devrilmesine sebep olabilir [284]. Başka bir çalışmada miR-144 ifadesinin hem uveal melanoma dokularında hem de hücre hatlarında (OCM-1A, MUM-2B, MUM-2C, C918) azaldığını gösterdi. miR-144, c-Met aracılı uveal melanoma hücre proliferasyonunu ve c-Met'in 3'-UTR bölgesi ile bağlanma yoluyla invazyonu inhibe edebilir [285].

Venza ve meslektaşları miR-92a-3p nin uveal melanoma hücre hatlarında yukarı regüle edildiğini ve apoptoza inhibitör etkisini buldular. Bu çalışmada miR-92a-3p'nin uveal melanomda onkogen rolü olduğunu ortaya koymuşlar. MS-275 histon deasetilaz inhibitörü, miR-92a-3p'nin ifadesini azaltabilir ve miR-92a-3p'nin hedef geni olan MYC Bağlayıcı Protein 2'yi (MYCBP2) yukarı düzenleyebilir. Böylece uveal melanoma'nın programlanmış hücre ölümüne yol açabilir [286].

Yapılan başka bir çalışmada, uveal melanomda miR-181b'nin teşvik edici etkisi bildirildi [19]. Biyoinformatik teknikleri ve fonksiyonel analiz, miR-181b'nin, karboksi terminal alanı küçük fosfataz benzeri (CTDSPL) hedeflenerek hücre döngüsü ilerlemesini artırdığını ve onkogenik etkisini ileri sürdü.

miR-296-3p bir tümör supresor olarak matriks metaloproteinaz (MMP) üzerinde etkili ve tümörlerin oluşumu ve ilerlemesi ile yakından ilgilidir. MMP-2 ve MMP-9'un uveal melanoma anjiyogenezine ve metastaza etkisi kanıtlanmıştır. Wang ve diğerleri, uveal melanoma hücrelerinde miR-296-3p, MMP-2 / MMP-9'u düzenleyerek hücre proliferasyon, göç ve invazyonunu baskılayabileceğini ve apoptozu uyurabileceğini gösterdi [287].

Zhou ve arkadaşları, miR-20a'nın uveal melanomda onkogenik bir rol olarak işlev gördüğünü keşfetti. miR-20a MUM-2B hücrelerinde, invazyon ve göç dahil olmak üzere hücre hareketliliğinde bir artışa neden olmuştur [288]. Benzer şekilde miR-155, uveal melanom hücre proliferasyonunu teşvik ederek onkogenik bir özellik gösterdi [20]. miR-454, PTEN tümör baskılayıcı geni üzerinde onkogenik etki ederek, kanser hücresi döngüsünün düzenlenmesinde etkilidir ve uveal melanoma hücrelerinin proliferasyonu ve G1 / S geçişi yoluyla hücre ilerlemesine sebep olabilir [21]. Başka bir çalışmada, miR367, PTEN'i hedefleyerek, hücre proliferasyon ve göç dahil olmak üzere onkogenik rolü gösterdi [289].

Li ve arkadaşları, uveal melanoma hücrelerinde hedef geni PIK3R3/AKT3 olan miR-224-5p'nin düşük ifadesini gözlemlediler. Normal hücrelerde miR-224-5p, tümör baskılayıcı rolü olduğu ve hücre çoğalması, göç ve invazyonu inhibe etmektedir [290]. Başka bir çalışma miR-21 seviyesinin uveal melanoma hücrelerinde, normal uveal melanositlere kıyas, daha yüksek olduğunu bildirdi. Bu çalışmada miR-21 in onkogenik rolü olduğu ispatlanmıştır [291].

Normalde tümör baskılayıcı olan ve epitel-mezenkimal geçişini (EMT) baskılayan miR-23a uveal melanoma hücrelerinde azaldığı Wang Y. ve meslektaşları tarafından gözlemlenmiştir. Bu durumda epitel hücrelerinin hücre adezyonunu kaybederek mezenkimal hücrelere dönüşmesi ve göç ve invazyon yeteneği kazanmasına neden olmuştur. Bu nedenle EMT'nin tümör metastazının başlangıcında meydana geldiği kanıtlanmıştır [292]. Bugüne kadar uveal melanoma'da dahil olduğu bildirilen miRNA'ların listesi ve hastalıkta görülen rolü Tablo 2-4'de bulunmaktadır.

Tablo 2-4: Uveal melanom'da Önemli miRNA'lar

miRNA	Hedef	Gen ifadesi	Mekanizma	Numune	Rol	Kaynak
miR-137	c-Met, CDK6, MTF, p160, SRCs	Azalmış	Proliferasyonu inhibe eder.	Hücre hatları (M17, M23, SP6.5, OCM-1/3, OMM1/1.3, Mel202, 92.1)	Tümör baskılayıcı	[132, 283]
miR-145	IRS-1	Artmış	Proliferasyonu inhibe ve apoptozu teşvik eder.	Doku ve hücre hatları (OCM-1, MUM-2B)	Tümör baskılayıcı	[284]
miR-144	c-Met	Azalmış	Proliferasyon ve invazyonu inhibe eder.	Doku ve hücre hatları (OCM-1A, MUM-2B/2C, C918)	Tümör baskılayıcı	[285]
miR-92a-3p	MYCBP2	Artmış	Apoptozu inhibe eder.	Hücre hatları (OCM-1/3, 92.1)	Onkogen	[286]
miR-181b	CTDSPL	Artmış	Hücre siklusunu ilerlemesini teşvik eder.	Doku ve hücre hatları (SP6.5, VUP, OCM-1/1A, MUM-2B, 92.1)	Onkogen	[19]
miR-296-3p	MMP-2, MMP-9	Azalmış	Proliferasyon, göç ve invazyonu inhibe ve apoptozu teşvik eder.	Doku ve hücre hatları (C918)	Tümör baskılayıcı	[287]

miR-20a	Not reported	Artmış	Proliferasyon, göç ve invazyonu teşvik eder.	Doku ve hücre hatları (MUM-2B/2C)	Onkogen	[288]
miR-155	NDFIP1	Artmış	Proliferasyon ve invazyonu teşvik eder.	Doku ve hücre hatları (OCM-1A, MUM-2B/2C, C918)	Onkogen	[20]
miR-454	PTEN	Artmış	Proliferasyon, invazyon ve klon yapılması ve hücre siklüsü ilerlemesini teşvik eder.	Doku ve hücre hatları (OCM-1A, MUM-2B/2C, C918)	Onkogen	[21]
miR-367	PTEN	Artmış	Proliferasyon ve göçü teşvik eder.	Doku ve hücre hatları (M17/23, MUM2B, C918)	Onkogen	[289]
miR-224-5p	PIK3R3/AKT3	Azalmış	Proliferasyon, göç ve invazyonu inhibe eder.	Doku ve hücre hatları (OCM-1A)	Tümör baskılayıcı	[290]
miR-21	p53	Artmış	Proliferasyon, göç ve invazyonu teşvik eder.	In vivo (BALB/c) and hücre hatları (OCM1A)	Onkogen	[291]
miR-23a	Zeb1	Azalmış	Hücre göçünü inhibe eder.	Hücre hatlarında (OCM-1)	Tümör baskılayıcı	[292]

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Materyal

Tez çalışması, İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 20.09.2019 tarih ve 16 sayılı etik kurulu toplantısı sonucu kabul edilmiş ve İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı ve İstanbul Tıp Fakültesi, Göz hastanesine başvuran Uveal Melanoma hastaları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma grubu Mart 2019 - Ağustos 2019 ayları arasında İstanbul Üniversitesi, Göz hastanesi, polikliniğine başvuru yapan 72 uveal malign melanomlu hasta ile hasta popülasyonu ile yaş ve cinsiyet olarak eşleştirilmiş, kendisinde ve üç generasyon geriye dönük kanser hastalığı bulunmayan 72 sağlıklı kişiden oluşan iki farklı deney grubundan oluşturulmuştur. Çalışmaya dahil edilen tüm bireyler, periferik kan örnekleri alınmadan önce çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve gönüllü onam formu imzalatıldıktan sonra çalışmaya alınmıştır.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Biocoll Separating Solution (Ficoll) [BIOCHROM]
 Etilen-Diamin-Tetraasetikasit (EDTA),
 Etidyum Bromid (EtBr), Bromfenol Mavis (BFB) [SIGMA]
 Etanol [RIEDEL DE HAEN]
 Quick-cfRNA Serum and Plasma Kit [ZYMO RESEARCH]
 ID3EAL cDNA Synthesis System [MIRXES]
 ID3EAL miRNA qPCR Starter Kit [MIRXES]

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

-20 Derin Dondurucu (Model: SANYO)
 -80 Derin Dondurucu (Model: SANYO)
 Santrifüjler (Model: HERAUS, HETTICH, JOUAN)
 Termal Döngü Cihazı (Model: TECHNE)
 Mikropipetler (Model: GILSON)
 Yatay Gel Elektrophorez Tankları ve Jel Dökme Sistemleri (Model: BRL)
 Vorteks (Model: FINEPZR)
 Distile Su Cihazı (Model: MILLIPORE)
 Spektrofotometre NanoDrop 2000 (Model: THERMO SCIENTIFIC)
 MIC Gerçek-Zamanlı PCR Cihazı (MIC qPCR)
 Mikrodalga Fırın (Model: ARÇELİK)
 Gel Dökümantasyon Sistemi (Model: BRL)
 Etüvler (37°C ve 56°C) (Model: NÜVE)
 HERAUS ETÜV (Model: W.C. HERAEUS GMBH, HANAU)

Vakum Manifold (Model: Zymoresearch S7000)

Vakum pompası (Model: Rocker 300)

Manyetik Karıştırıcı (Model: NÜVE)

3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

10X PBS Tampon Çözeltisi 1 litre için;

80 g NaCl

2 g KCl

11,5 g Na₂HPO₄

2 g KH₂PO₄

10X BFB Yükleme Tamponu 2 mL için;

%1 SDS

5 mg Bromfenol Mavisi

2mL Gliserol

10X TEB (Tris-EDTA-Borik Asit) Tampon Çözeltisi

0.88 M Borik Asit

5 M Tris

0.02 M EDTA (pH :8.00) Etidyum Bromür: 10 mg/mL 25

%1,5'lik Agaroz Hazırlanması

1,5 g Agaroz

100mL 0.5X TEB

5µL Etidyum Bromür (10mg/mL)

1X Lysis Buffer (100mL)

10 mL 10X Lysis Buffer (ABM)

90 mL distile su

Buffer R.(100mL)

49 mL PBS

2 mL FBS

50 µL EDTA

Bilgisayar Programları

IBM Support SPSS 21.0

3.2. Yöntem

Çalışmada hasta ve sağlıklı kontrol grubundan alınan 10 mL periferik kan örneklerinden EDTA lı ve normal tüplerde öncelikle plazma / serum ayrımı yapıldı sonrasında lenfositler ayrıştırıldı. Elde edilen serum / plazma örneklerinden total RNA izole edildi. Bu RNA örneklerinden Ters Transkriptaz yöntemiyle hedef miRNA'lara özgü cDNA sentezlendi. Çalışmada hedef olan miR-155, miR-454 ve miR-181b miRNA'ları, miRNA U6 referans geni ile birlikte hasta ve sağlıklı kontrol örneklerinde

Gerçek-Zamanlı PZR yöntemiyle çoğaltıldı. Hasta ve sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grupları arasındaki miR-155, miR-454, miR-181b gen ifade düzeyleri, miR- U6 geni ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.2.1. Periferik Kandan Serum / Plazma ve Lenfosit İzolasyonu

Öncelikle normal tüplerde alınan kan örneğinden santrifüj yardımıyla serum ayrıştırıldı ve -80 derece dondurucuya Total cell free RNA izolasyonunda kullanmak için aktarıldı. EDTA'lı tüpe alınmış 10 mL periferik kan örneği 1/1 oranında % 0.9'luk NaCl ile dilüe edildi.

Dilüe edilmiş kan örneği 2 mL Ficoll üzerine pipet yardımıyla yüklendi. 1910 RPM'de 30 dk. santrifüj edildi.

Üst fazında plazma, orta fazında lenfositler alt fazında eritrositler, Üst fazdan 1ml plazma özel tüplerde ayrıldı ve -80 derece dondurucuya aktarıldı.

Tüpte toplanmış olan lenfositler pastör pipet yardımıyla temiz bir tüpe aktarıldı. 1910 RPM'de 10 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant dökülerek pellet üzerine 2 mL PBS eklendi ve pipetleme yapılarak pellet çözüldü. Elde edilen pellet 2 krio tüpe 1'er mL olacak şekilde dağıtıldı.

Kriyo tüpler 1910 RPM'de 4 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant döküldü. Elde edilen hücreler -80 derecede bir gün süreyle inkübe edildi.

Son olarak kriyo tüplerdeki hücreler uzun süreli saklanmak üzere azot tanklarına kaldırıldı.

3.2.2. RNA İzolasyonu

Elde edilen serum / plazma örneklerinden RNA izole etmek için ticari bir kit olan Quick-cfRNA Serum and Plasma Kit [ZYMO RESEARCH] protokolü kullanıldı. Kit protokolüne göre RNA izolasyon işlem basamakları şu şekildedir:

Azot tankından çıkarılan 1ml serum / plazma üzerine 1ml Digestion Buffer ve 50 µL proteinaz K eklendi ve çözülene kadar pipetaj ve vorteks yapıldı.

25ml tüp aktarıldı ve vakum cihazına yerleştirildi.

Vacum cihazı çalıştırıldı ve tüpler boşalana kadar bekletildi.

Sonra 600 µL RNA prep buffer ilave edildi ve yine vakum cihazı tüpler boşalana kadar çalıştırıldı.

Spin-away filteri bir collection tüp yerleştirildi ve 2 dakika, bauffer tamamen çıkana kadar bekletildi. Sonra mikrosantrifüje yerleştirildi.

12,000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi.

Sonra 200 µL RNA recovery buffer ilave edildi ve 3 dakika santrifüj yapıldı.

300 µL etanol(%95-100) ilave edip, pipetaj yapıp ve zymo-spin tubelerine yerleştirildi. Santrifüj yapıldı ve yeni tüplere yerleştikten sonra 400 µL RNA preb buffer ilave edildi ve yeniden santrifüj yapıldı.

700 µL RNA wash buffer ilave edildi ve yine santrifüj yapıldı ve filtreler yeni tüplere yerleştirildi ve yine 400 µL wash buffer ile yıkandı. 2 dakika tüm buffer çıkana kadar bekletildi ve temiz 1,5 mL'lik yeni bir santrifüj tüpüne alındı.

Son olarak 15 µL DNaz/RNaz içermeyen steril distile su eklendi. 10,000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.

Elde edilen RNA'ların kontrolleri yapıldıktan sonra birkaç tüp bölünerek -80°C'de saklandı.

3.2.3. Agoroz Jelde RNA'ların Kontrolü

RNA izolasyonunun ardından total RNA'nın degrade olup olmadığının kontrolü agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. Elektroforez işlemi sonucunda yürütülen RNA'nın 28S ve 18S rRNA'ları temsil eden iki majör bandın varlığına ve DNA bandının yokluğuna bakılarak sağlamlığı belirlendi. Çalışmada araştırılması gereken cell free RNA lardan özel kitler ile miRNA ların kaliteli bir şekilde ilerlemesi ve bir sonraki basamak olan cDNA sentezinin başarısı için yüksek kalitede RNA kullanılmalıdır. Bu nedenle elde edilen RNA, degrade olmamış ve genomik DNA kontaminasyonu içermemiş olması gerekmektedir.

3.2.3.1. Agoroz Jel Hazırlanma aşaması

RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ile kalite kontrollerinin yapılması için % 1.5'luk agaroz jel hazırlandı. Agoroz jel yapılması için belirlenen basamaklar gerçekleşti:

1,5 g agaroz 100 mL 0.5X TEB tamponu içinde koyuldu.

Bu karışım mikrodalga fırının sıcaklık ve zaman koşulu ayarlandı ve karışım uygun aralıklarla karıştırılarak kaynatıldı.

Karışım homojen hale geldiğinde, sıcaklığı 60°C'ye düştüğünde konsantrasyonu 10 mg/mL olan EtBr (Etidyum bromür) çözeltisinden 5 µL ilave edildi ve böylece jel soğutmaya hazır hale getirildi.

Jel, yirmi dişli tarak yerleştirilmiş jel tabağına döküldü.

Jele araştırılan örneklerin yüklenebilmesi için polimerize olması beklendi. Jel kullanılacağı ana kadar ya TBE tamponu içinde ya da stretch filme sarılarak +4°C de saklandı.

3.2.3.2. Örneklerin Agoroz Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Elde edilen RNA'lardan 5 µL örnek, 1 µL 10X BFB (brom fenol mavisi) ile karıştırıldı ve jel üzerinde bulunan kuyucuklara yüklendi. 150 volt akımda 3 cm kadar yürütüldü ve UV altında görüntülendi.

3.2.4. RNA Konsantrasyon Ölçmesi Aşaması

Elde edilen RNA'ların ölçümleri NanoDrop 2000 Spektrofotometre (THERMO SCIENTIFIC) cihazına örneklerden 1 µL yüklenerek yapıldı. İzole edilen RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu A260/A280 nm dalga boylarındaki absorbans ile belirlendi. Absorbansı 1.5-2.0 OD aralığında olan RNA'lar saf/uygun RNA örneği olarak kabul edildi. RNA'nın 260 nm'de vermiş olduğu 1 OD'lik absorbans 40 µg RNA molekülüne

eşittir. NanoDrop ile RNA konsantrasyonu ölçülürken 1 µL hacim yeterli olduğundan RNA konsantrasyonu direkt olarak ölçülebilmekte ve RNA'nın sulandırılmasına gerek kalmamaktadır. Buna göre NanoDrop ile ölçülen RNA'nın konsantrasyonu aşağıda verildiği şekilde hesaplanır:

$$\text{RNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/mL}) = \text{ODA260} \times \text{Sulandırma Katsayısı} (1) \times 40 \mu\text{g}$$

Ölçümleri belirlenen RNA'ların bir sonraki aşamada yapılacak deneylerde kullanılırken konsantrasyonlarının eşit olması gerekmektedir ve bunun için hasta ve kontrol gruplara ait RNA örneklerinin konsantrasyonu 200 ng/µL olacak şekilde sulandırıldı.

3.2.5. cDNA Sentezi Aşaması

Gerçek-Zamanlı PCR reaksiyonu için ticari bir kit olan ID3EAL cDNA Synthesis System (MIRXES) yardımı ile miRNA spesifik Ters Transkriptaz enzimi kullanılarak RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. cDNA reaksiyon bileşenleri cDNA reaksiyonunun gerçekleştirileceği tüp içerisine sırasıyla, kalıp RNA (1 µg), ID3AL RT Buffer (5 µL), ID3AL RT Primer (1 µL), ID3AL RT (revers transkriptaz) (1 µL) eklenerek pipetaj yapıldı ve vortekslendi ardından BioRad PCR cihazına yerleştirildi.

Reaksiyonlar bu aşamada ve tüm işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi. 20 µL'lik reaksiyon karışımı, Ters transkriptaz reaksiyonunun gerçekleşmesi için PCR cihazında inkübe edildi. Ters transkriptaz reaksiyon inkübasyonu tabloda anlatılan şekilde gerçekleştirildi: (Tablo 3-1)

Tablo 3-1: Ters Transkriptaz Reaksiyon Inkübasyon Koşulları

Döngü	Sıcaklık (°C)	Süre
1x inkübasyon	42 °C	30 dk
1x enzim aktivitesinin	95 °C	5 dk

Bu aşamada elde edilen cDNA örnekleri -20 derecede saklandı.

3.2.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT qPCR)

Elde edilen cDNA'lar 1:10 oranında distile su kullanılarak sulandırıldı. Sulandırılmış cDNA'lar Real Time PCR Reaksiyonu: Mic qPCR için üretilmiş özel tüpler içerisine total hacim 20 µL olacak şekilde aşağıda verilen hacimde karıştırıldı:

10 µL ID3AL qPCR Master Mix

2 µL ID3AL qPCR assays

5 μ L sulandırılmış cDNA

3 μ L Nükleaz içermeyen distile su (dH₂O)

Mikropipet yardımıyla pipetaj yapıldı ve ardından vortekslendi. Sonrasında araştırdığımız mikroRNA'ların anlatım düzeyleri MIC Gerçek Zamanlı PCR Cihazı (MIC qPCR Cycler) kullanılarak analiz edildi (Şekil 3-1, 3-2, 3-3, 3-4).



Şekil 3-1: MİCqPCR cihazı



Şekil 3-2: MicqPCR tüpleri ve hazırlaması



3-3: MicqPCR tüpleri yerleştirmesi



Şekil 3-4: MicqPCR tüp koruyucusu yerleştirme şekli

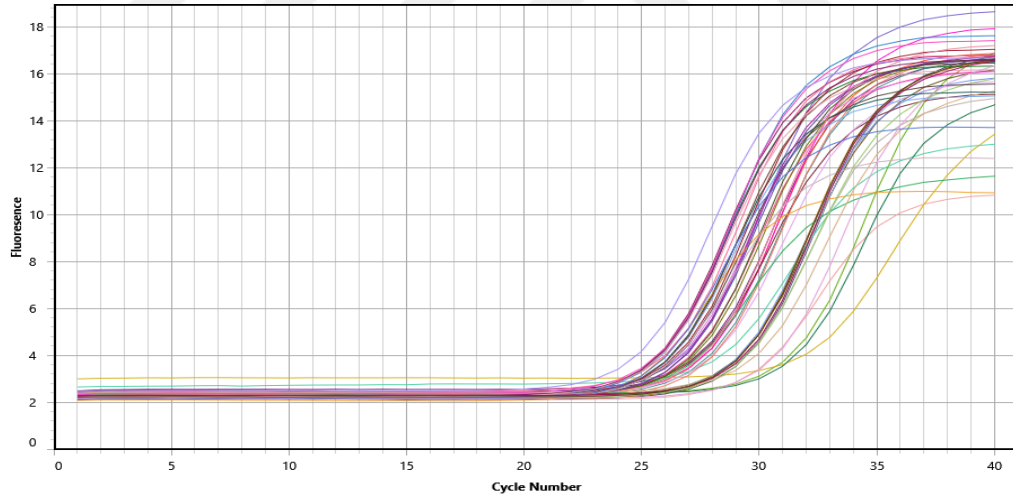
Reaksiyon sırasında çoğalan gen ürünlerinin saptanabilmesi için SYBR Green floresan boyası kullanıldı. Gerçek zamanlı PCR işlemi sırasında hedef gen ile referans gen dışında başka bir ürünün çoğalmadığından ve primerlerin düzgün bağlandığından emin olabilmek için PCR döngüsü sonuna “Erime Eğrisi Analizi (Melting Curve Analysis)” eklendi. Hastaların Serum ve plazmasından elde edilen cDNA örnekleri hedef ve referans genlerine ait primerler kullanılarak yapılan gerçek-zamanlı PCR işlemiyle hasta grupları ile sağlıklı kontroller arasında var olan gen ifade değişiklikleri değerlendirildi.

Gerçek-zamanlı PCR reaksiyon koşulları ve aşamaları tablo içerisinde verilen sıcaklık ve sürelerde gerçekleşti. (Tablo 3-2)

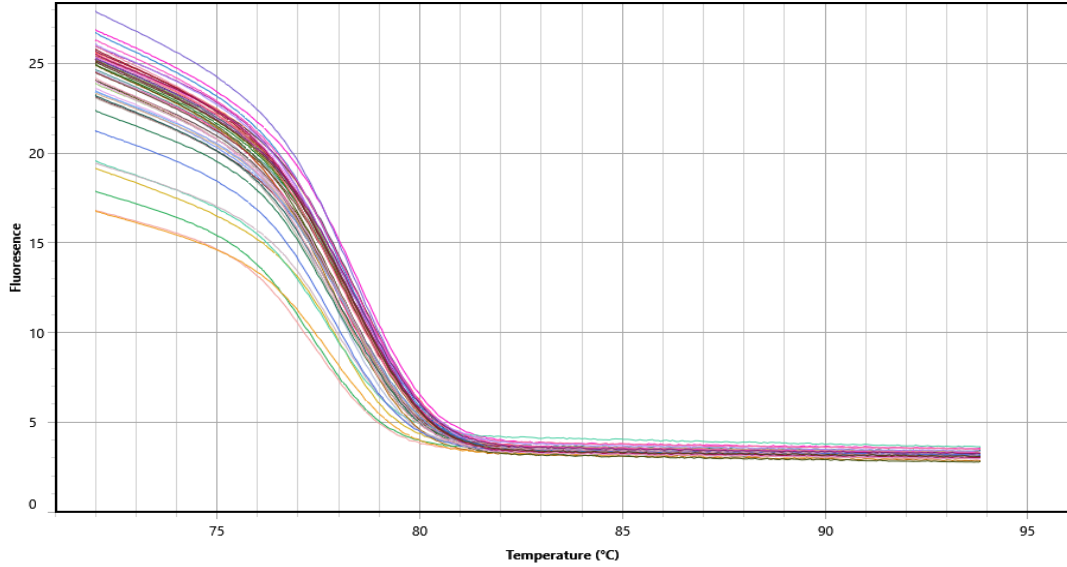
Tablo 3-2: Gerçek-Zamanlı PZR Reaksiyon Koşulları

Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1x	95° C	10 dk
	40° C	5dk
40x	95° C	10 sn
	60° C	30 sn

qPCR ile Çoğaltılan miRNA Moleküllerinin Analizi miR-155, miR-454 ve miR-181b için Mic qPCR'a yüklenen hasta ve kontrol örneklerinin oluşturduğu Real Time PCR eğrileri örneği şekil 3-5 de ve Erime Eğrisi (melting curve) eğrisi örneği şekil 3-6 de verilmiştir. Her bir örneğin ifade seviyeleri CT (Threshold Cycle = Eşik döngüsü) değerindeki farklılıklara göre değerlendirildi.



Şekil 3-5: miR-155 ifadesinin incelendiği örneklerin gerçek zamanlı PCR eğrileri görünümü



Şekil 3-6: miR-155 ifadesinin incelendiği örneklerin erime eğrileri görüntüsü

3.3. Değerlerin Hesaplanması ve İstatistiksel Analizler

3.3.1. Değerlerin Hesaplanması

ΔCT ve $\Delta\Delta CT$ Değerlerinin Hesaplanması ifade seviyeleri CT değerleri üzerinden, ΔCT ve $\Delta\Delta CT$ hesaplamaları yapılarak belirlendi.

$$\Delta CT = CT(\text{hedef gen}) - CT(\text{referans gen})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{hedef gen}) - \sum \Delta CT(\text{referans gen})$$

Bu değerlerin hesaplanmasından sonra $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri bulundu.

$\Delta\Delta CT$ değeri 0'a eşit olduğundan ve $2^0=1$ ifadesinden dolayı referans değeri 1 olarak kabul edildi. Referans değerine göre ifade düzeylerindeki artış veya azalış saptandı.

3.3.2. İstatistiksel Analizler

Hasta ve sağlıklı gruba ait gen ifade düzeylerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi IBM Support SPSS (v21) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Hasta ve kontrol grubu arasındaki gen ifade düzeyleri ve gen ifade düzeyleri ile klinik veriler arasındaki ilişki Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Ayrıca aday biyobelirteç olarak belirlediğimiz miRNA'ların tanısal gücünü göstermek amacı ile ROC (Receiver Operator Characteristics Curve) analizi gerçekleştirildi. Klinik verilerin kendi aralarında ikili karşılaştırmaları χ^2 ile yapıldı. Hastaların sağkalım analizi Kaplan-Meier testi ile incelendi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Bu çalışmada, 2019 yılı, Mart-Ağustos ayları arasında İstanbul Üniversitesi, Göz hastanesinden Onkoloji Enstitüsü, Kanser Genetiği bölümüne başvuran 72 uveal melanomlu hasta ile kontrol grubu olarak hasta grubu ile yaş, cinsiyet ve ırk açısından eşleştirilerek seçilen 72 sağlıklı bireyin periferik kan örneklerinden elde edilen Serumdan (Cell Free RNA) kullanılmıştır. Sonuçlar 72 uveal melanomlu hasta ile 72 sağlıklı kontrol üzerinden değerlendirilmiştir.

Hastaların yaş ortalaması 54,68 ($\pm 13,69$); sağlıklı kontrol grubunun yaş ortalaması ise 54,25 ($\pm 13,24$), hastaların tanı yaşı dağılımı ise ortalama 48,19 ($\pm 12,97$) şeklindedir. Gerek sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubunda gerekse uveal melanomlu hasta grubunda yaş ortalamaları arasında istatistiksel bir fark bulunmamakta, gruplar yaş açısından benzer dağılmaktadır. Hasta ve kontrol grubuna ait demografik ve klinik özellikler Tablo 4-1’de verilmiştir.

Tablo 4-1: Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri

	Özellikler	Hasta Sayısı ve Yüzdesi
Yaş	=<60 >60	26 (%36,11) 46 (%63,89)
Tanı (Histolojik Tip)	İris Melanoma Siliyar Cisimler Melanoma Koroid Melanoma Konjonktival Melanoma İris + Siliyar Cisimler Melanoma Koroid + Siliyar Cisimler Melanoma	7 (%9,72) 1 (%1,39) 56 (%77,78) 3 (%4,17) 1 (%1,39) 4 (%5,55)
Evre Gruplaması	Erken Evre (I,II) İleri Evre (III,IV)	38 (%52,77) 34 (%47,23)
Metastaz	Var Yok	4 (%5,55) 68 (%94,45)
Riskli Meslek	Var Yok	31 (%43,06) 41 (%56,94)
Sekonder Primer Tumor	Var Yok	4 (%5,55) 68 (%94,45)
Siliyar Tutulumu	Var Yok	6 (%8,33) 66 (%91,67)
Sigara Kullanımı	Kullanıyor Kullanmıyor	36 (%50,00) 36 (%50,00)

4-1. RNA Kalite Kontrolü

Serum'dan elde edilen RNA'ların kalitesinin değerlendirilmesi amacı ile agoroz jelde yürütülmesi işlemi yapıldı ardından NanoDrop 2000 Spektrofotometre [THERMO SCIENTIFIC] cihazı ile yapılan ölçüm sonuçlarına ait örnekler Tablo 4.2'de verilmiştir.

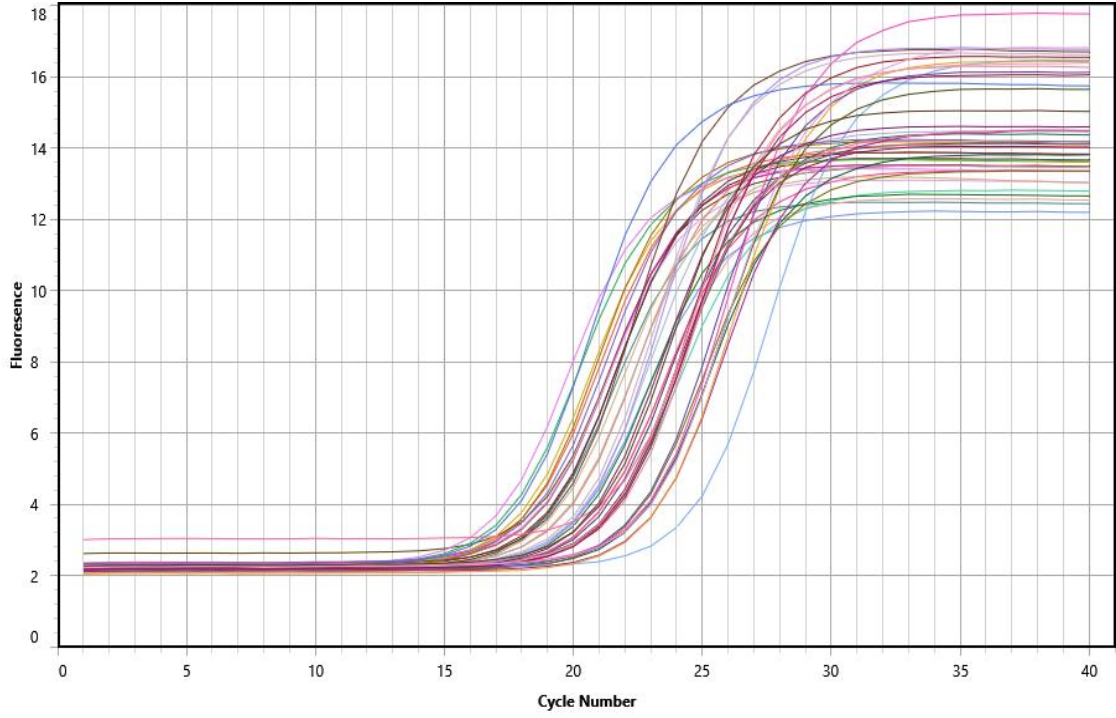
Tablo 4-2: Örneklerle Ait Nanodrop Ölçüm Değerleri

Örnekler	Nükleik Asit Konsantrasyonu	Birim	A260/A280	A260/A230	Numune
1	74,8	ng/ μL	1,87	2,11	RNA
2	80,4	ng/ μL	2,01	1,98	RNA
3	64,8	ng/ μL	1,75	1,82	RNA
4	92,0	ng/ μL	1,99	2,07	RNA

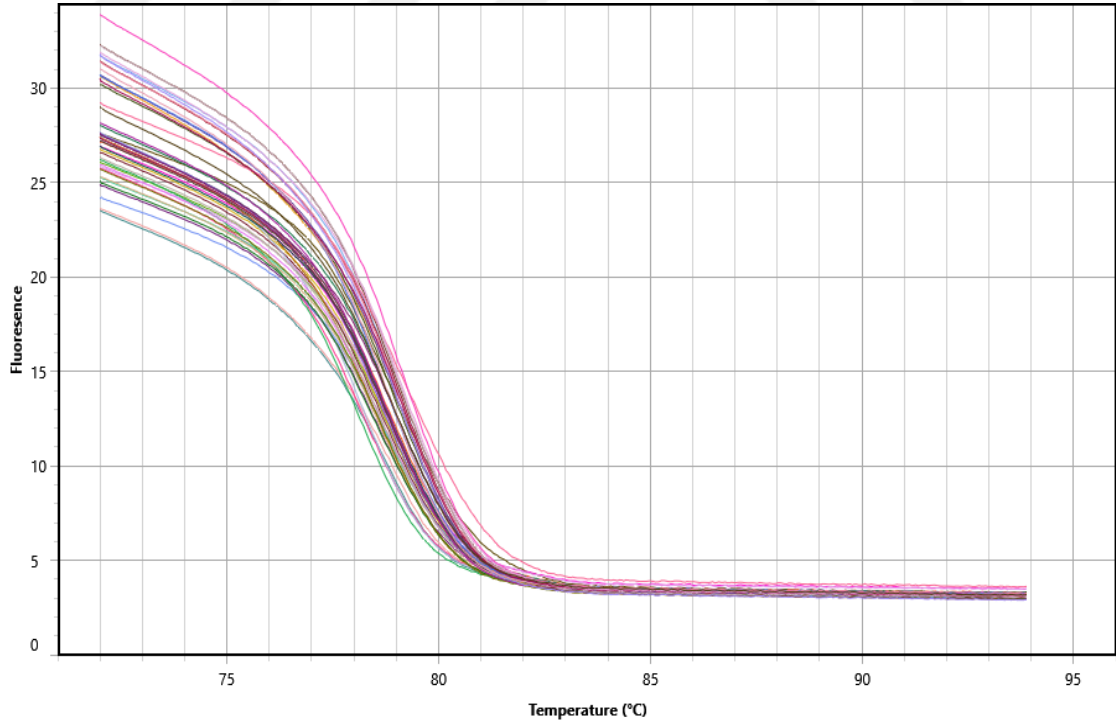
4.2. Gerçek-Zamanlı PZR ve Analiz

Bu çalışmada hasta ve kontrol grubuna ait periferik kan örneklerinden izole edilen cell free RNA'lar, incelediğimiz miRNA'lara özgü cDNA'ya dönüştürüldükten sonra miR-181b, miR-155, miR-454'in ifade düzeylerinin araştırılması amacıyla U6 referans geni eşliğinde, gerçek-zamanlı PZR işlemine tabi tutuldu. Her bir hasta ve kontrol grubuna ait miR-181b, miR-155, miR-454 ve U6 gen ifadelerini gösteren gerçek-zamanlı PZR grafikleri sırasıyla Şekil 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10,4-11 ve 4-12'de gösterilmektedir.

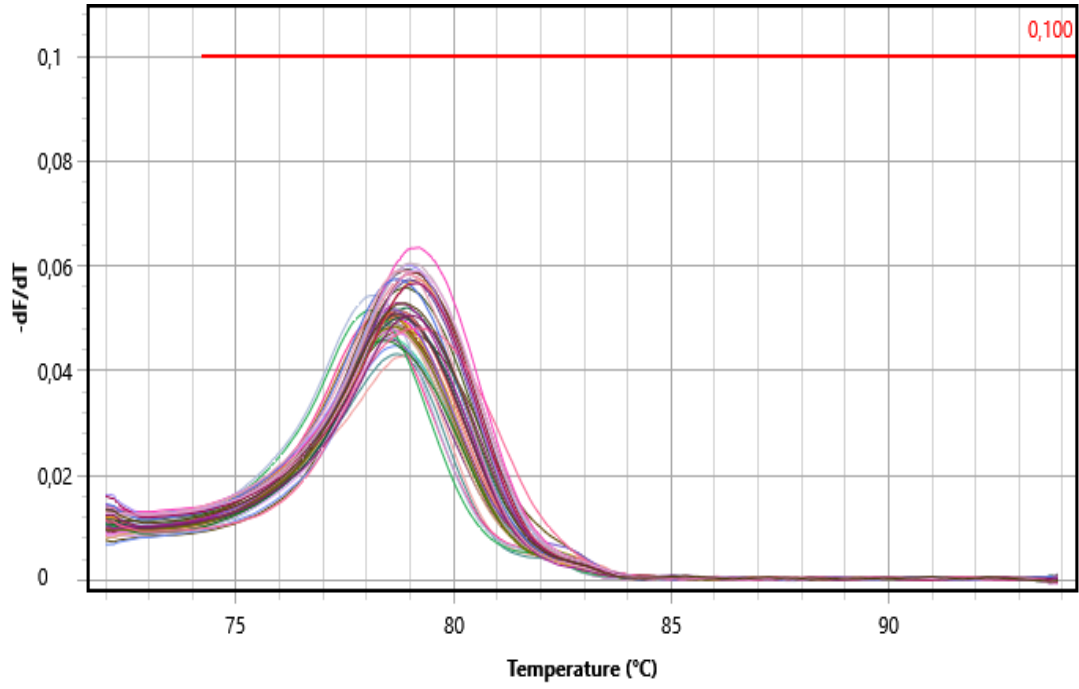
Gerçek zamanlı PZR ile çoğalan RNA'lar çoğaltıldı ve saptanabilmesi için SYBR Green floresan boyası kullanıldı. SYBR Green özelliği yapılan PZR dizisinin doğruluğunun ispatlamasının yanı sıra, hedef ve referans genleri dışı başka gen çoğalmadığını da ispatlamaktır. Bu nedenle erime eğrisi analizi (melting curve analysis) PZR döngüsüne eklendi.



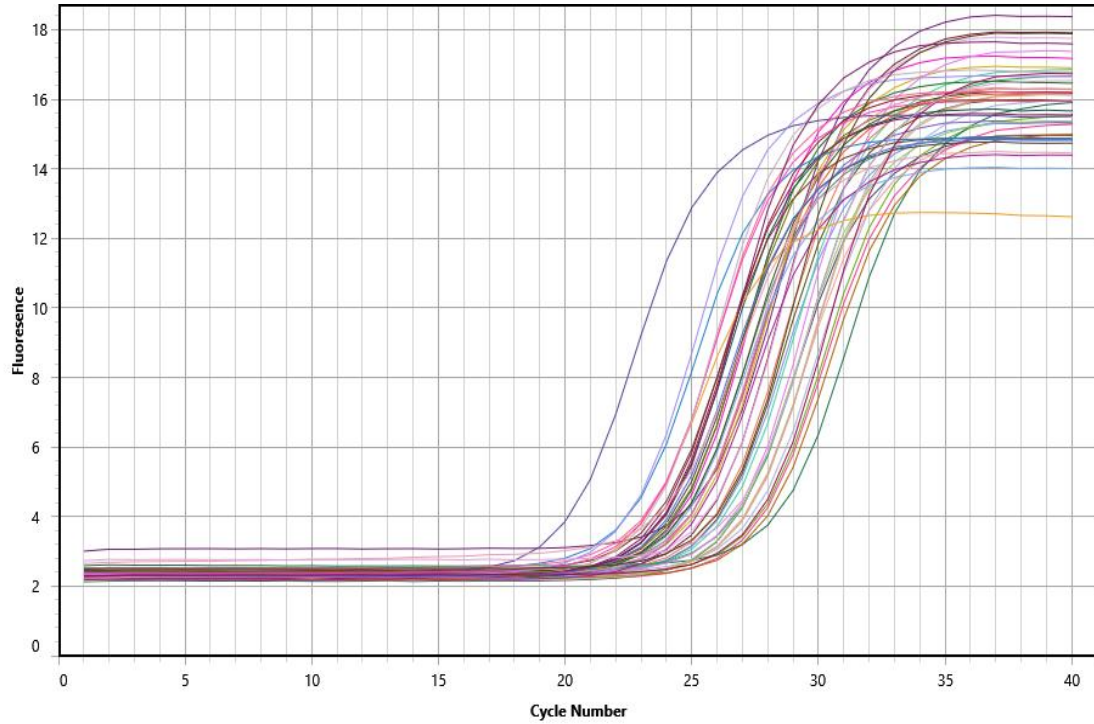
Şekil 4-1: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen U6 referans geninin gerçek-zamanlı PZR eğrileri



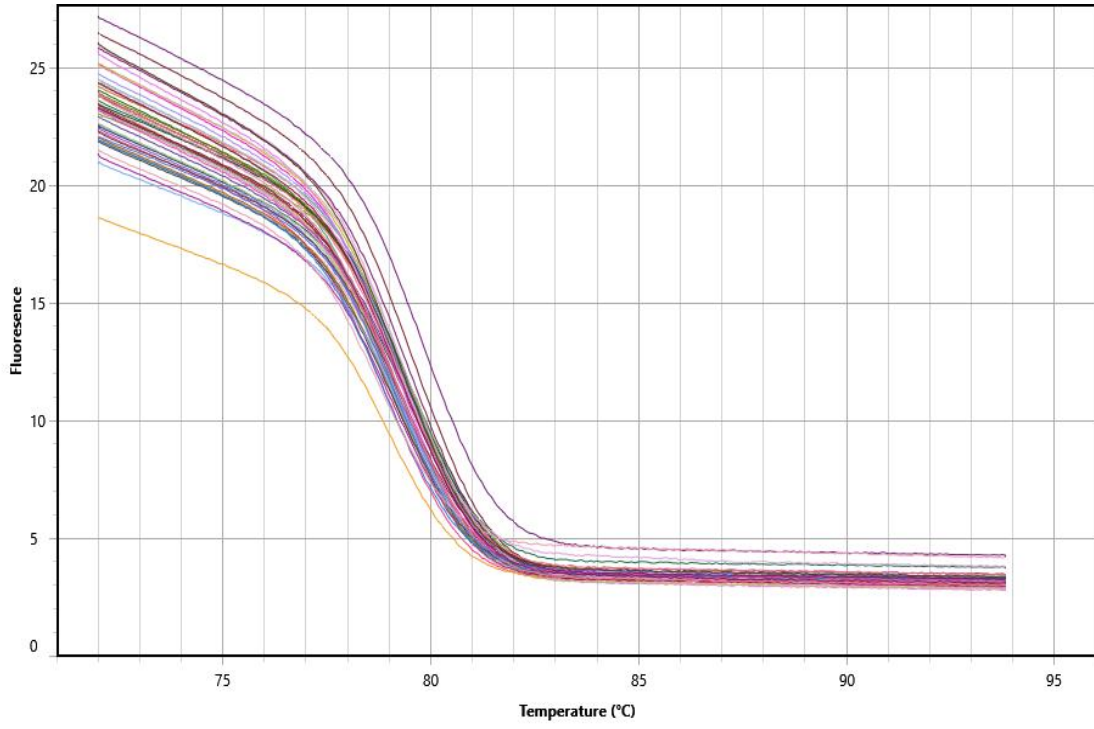
Şekil 4-2: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen U6 referans geninin erime eğrileri



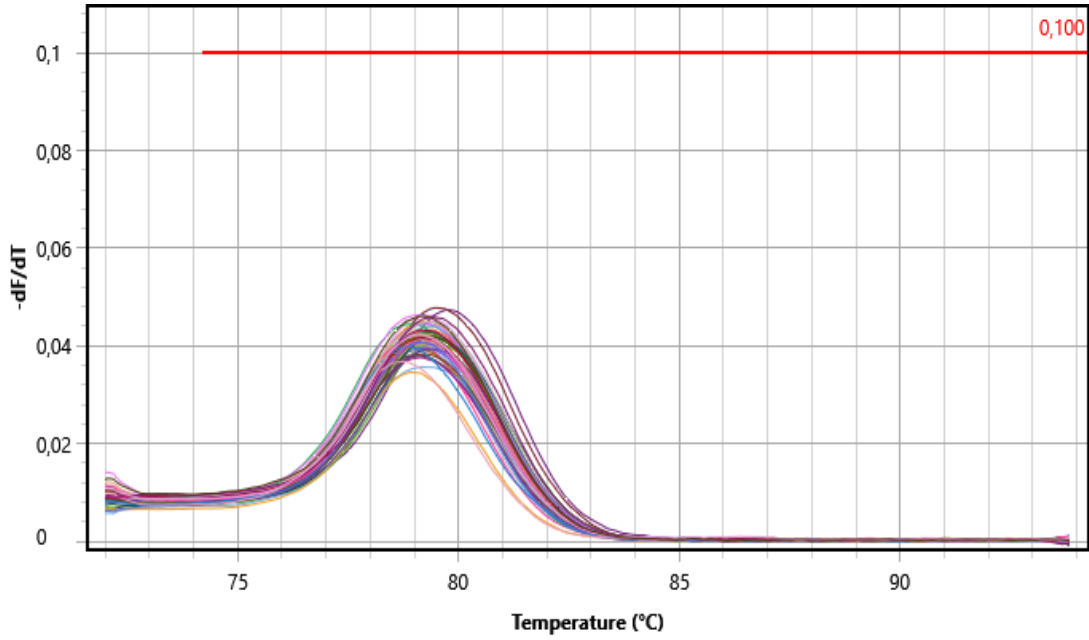
Şekil 4-3: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen U6 referans geninin erime eğrisi analizi



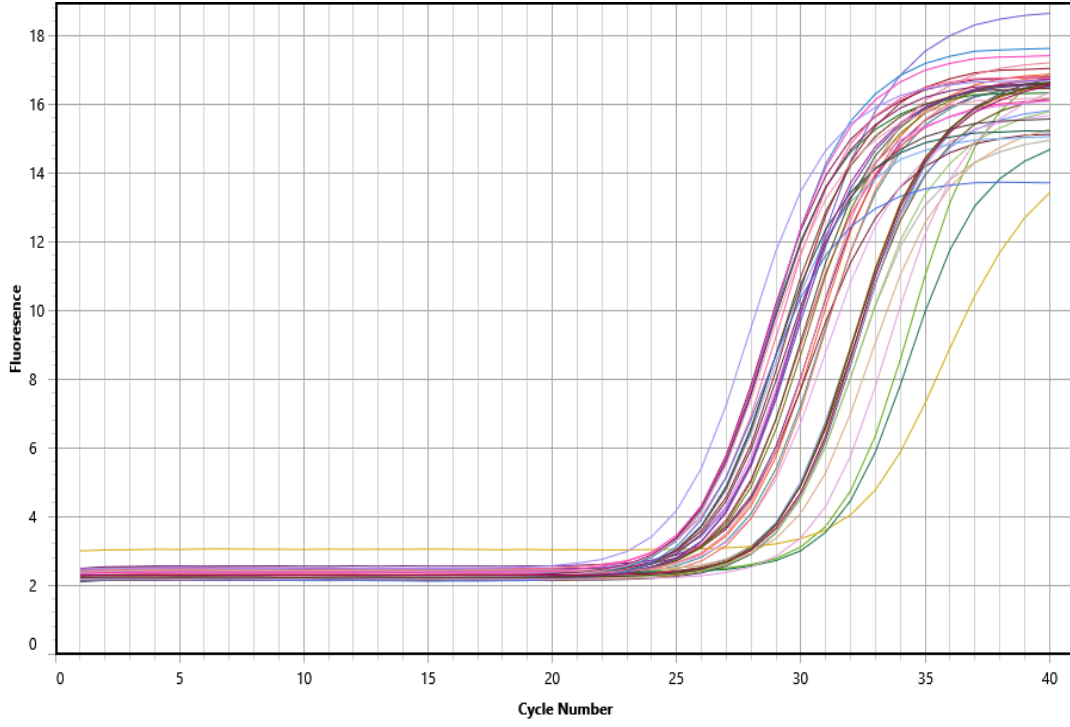
Şekil 4-4: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-181b'nin gerçek-zamanlı PZR eğrileri



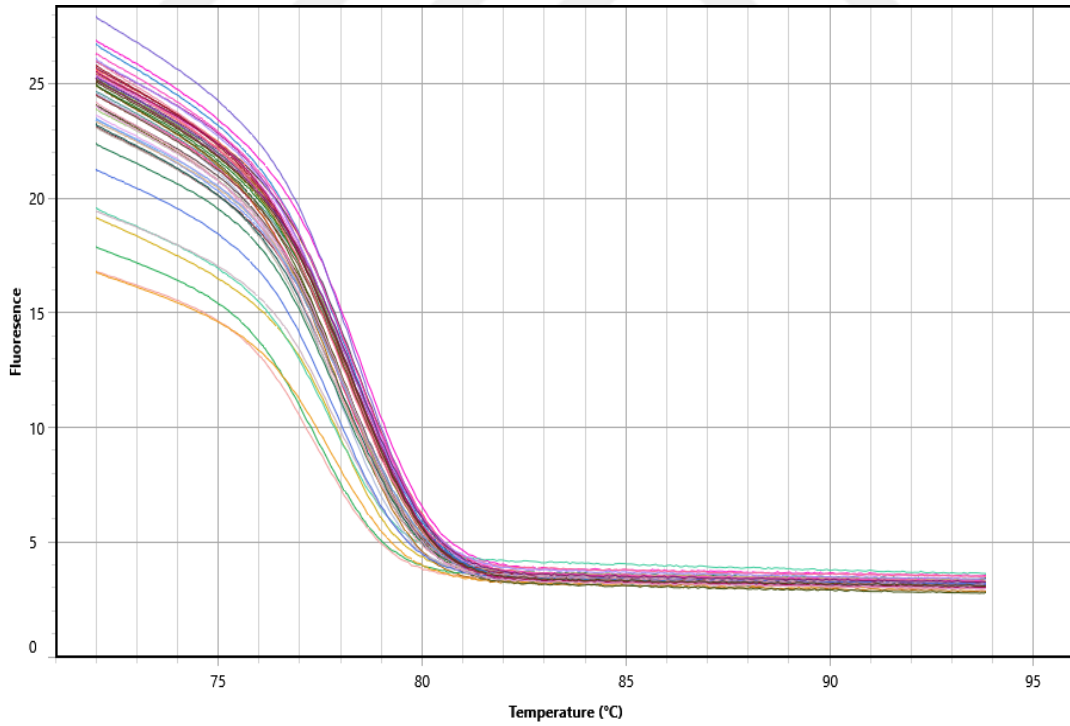
Şekil 4-5: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-181b'nin erime eğrileri



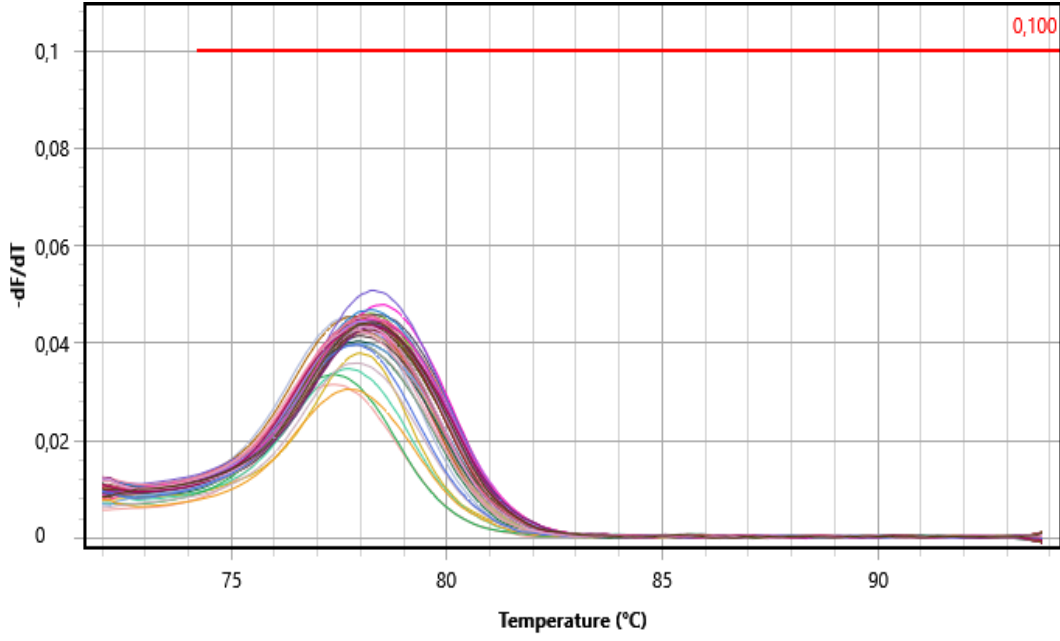
Şekil 4-6: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-181b'nin erime eğrileri



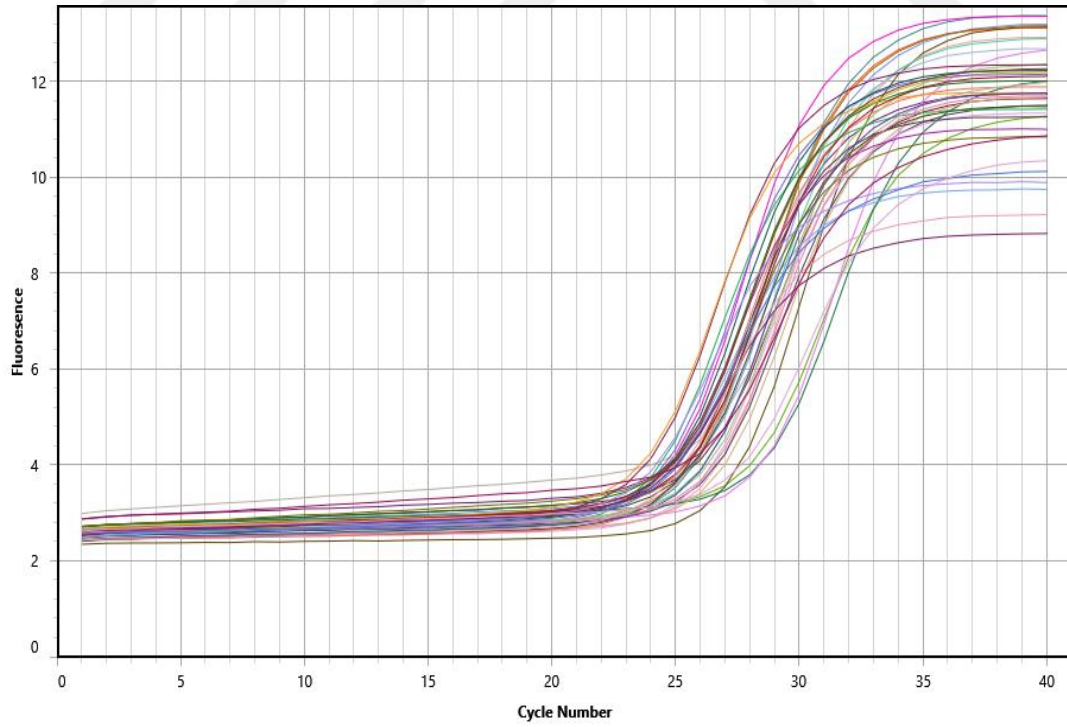
Şekil 4-7: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-155'in gerçek-zamanlı PZR eğrileri



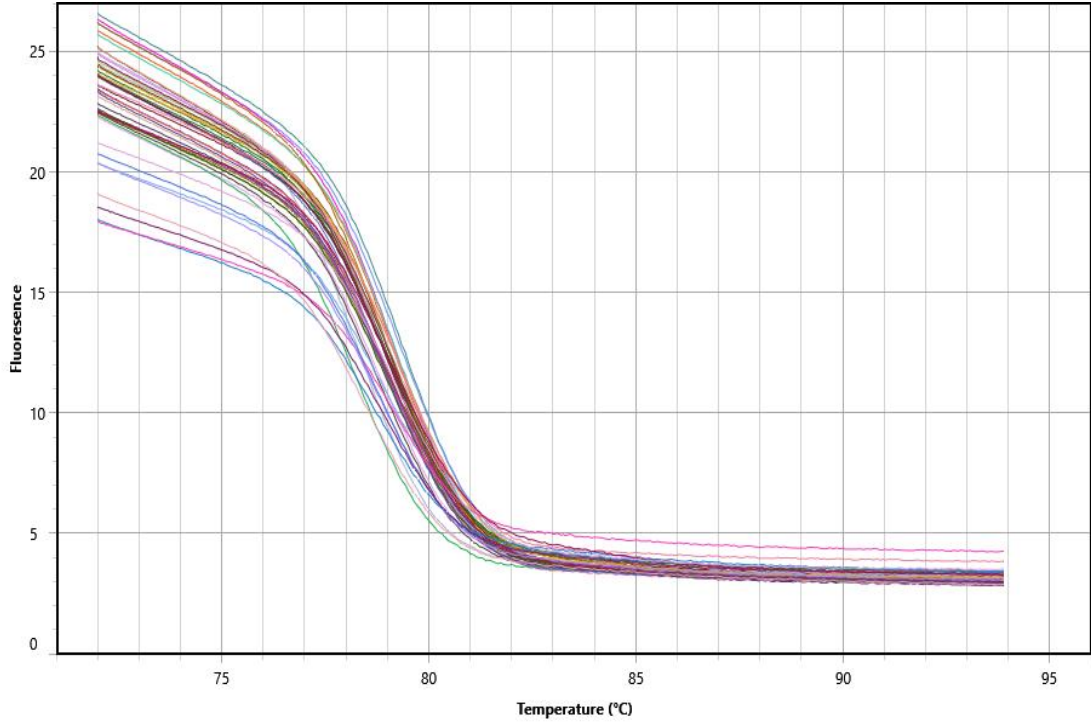
Şekil 4-8: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-155'in erime eğrileri



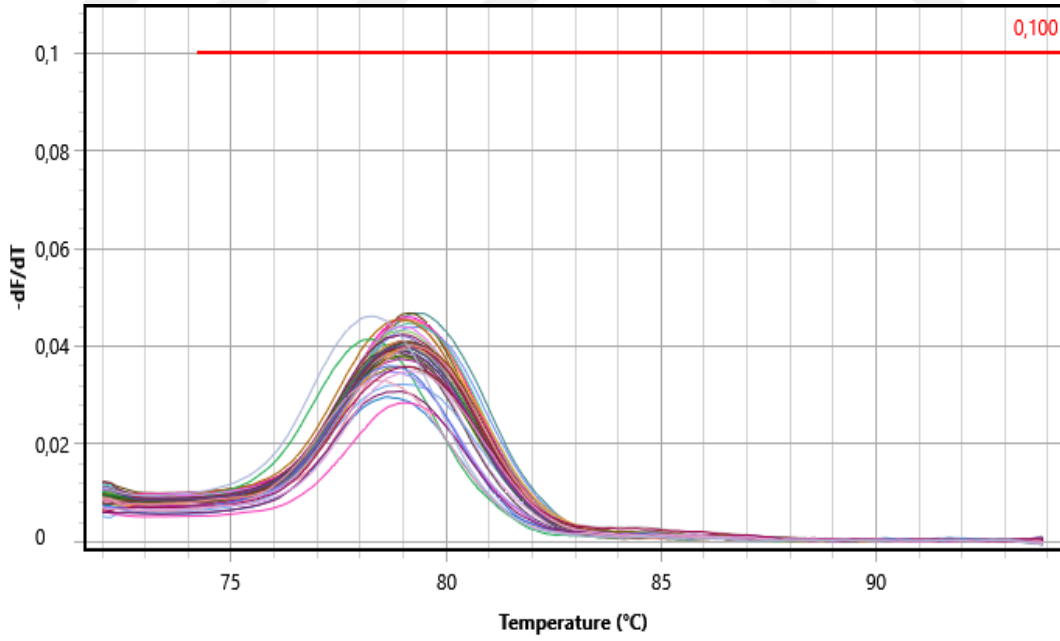
Şekil 4-9: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-155'in erime eğrisi analizi



Şekil 4-10: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miR-454'ün gerçek-zamanlı PZR eğrileri



Şekil 4-11: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miRNA-454 'ün erime eğrileri



Şekil 4-12: Uveal Malign Melanomlu hasta ve sağlıklı kontrollere ait periferik kan örneklerinde incelenen miRNA-454 'ün erime eğrisi analizi

4.3. miRNA İfadelerinin Değerlendirilmesi

miRNA ifadelerinin değerlendirilmesi için ($2^{-\Delta\Delta C T}$) formülü kullanıldı. Bu metoda göre PZR sonuçları önemli artışı CT değerlerine göre hesaplandı. Bu yöntem yardımı ile hedef gen ile referans genin arasında olan değişik $\Delta C T$ hasta ve kontrol grubu için ayrı ayrı belirlendi. Ardından her bir hasta örneğine ait $\Delta C T$ değerinden sağlıklı gruba ait ortalama $\Delta C T$ değerinin hesaplanıp ve her bir hasta örneğine ait $\Delta\Delta C T$ değeri bulundu. Bu değer $2^{-\Delta\Delta C T}$ formüle göre U6 gen ifadesi referans alınarak hasta grubuna ait miR-181b, miR-155, miR-454'ün ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre ne kadar oranda arttığı ya da azaldığı belirlendi ve Tablo 4-3 de hasta grubuna ait değerler verilmiştir.

$$\Delta C T = C T (\text{hedef gen}) - C T (\text{referans gen})$$

$$\Delta\Delta C T = \Delta C T (\text{hasta}) - \Delta C T (\text{sağlıklı kontrol})_{\text{ort}}$$

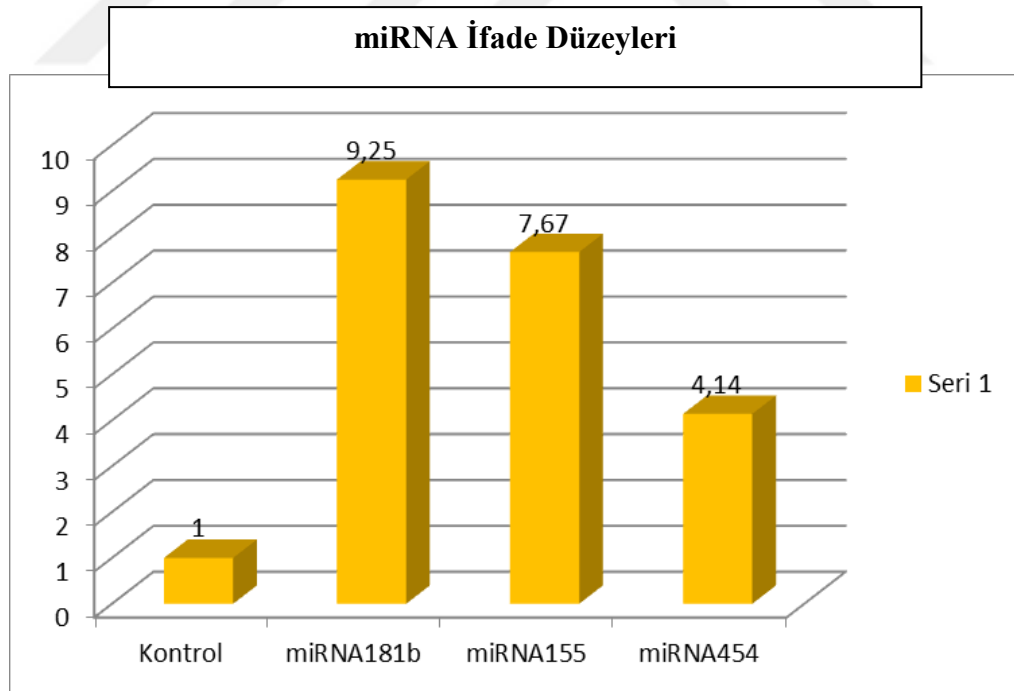
$$2^{-\Delta\Delta C T} = 2^{-[(C t \text{ hedef} - C t \text{ ref})_{\text{hasta}} - (C t \text{ hedef} - C t \text{ ref})_{\text{kontrol}}]}$$

Tablo 4-3: miR-181b, miR-155, miR-454'ün ifade düzeyleri

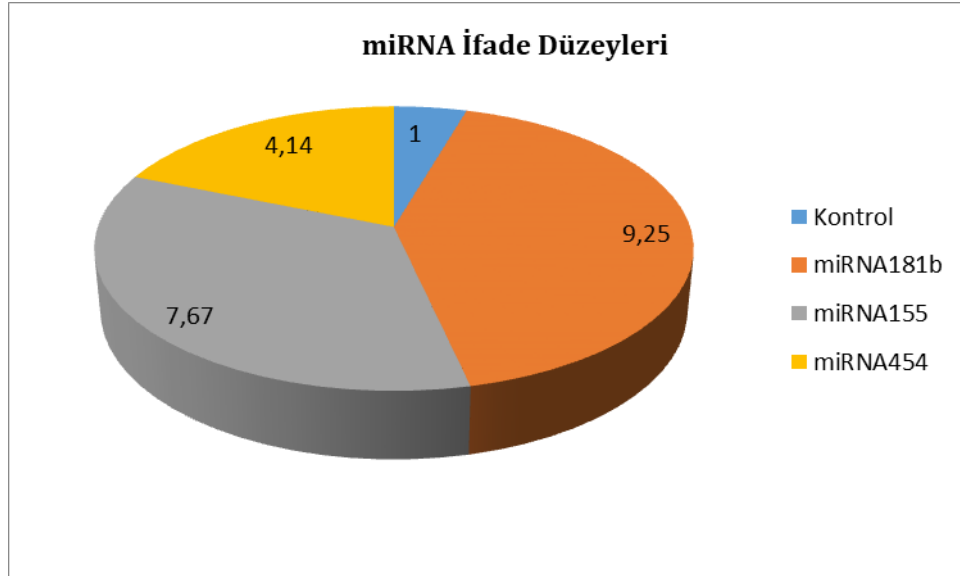
Hasta No.	miR-181b 2 - $\Delta\Delta C T$	miR-155 2 - $\Delta\Delta C T$	miR-454 2 - $\Delta C T$	Hasta No.	miR-181b 2 - $\Delta\Delta C T$	miR-155 2 - $\Delta C T$	miR-454 2 - $\Delta C T$
1	34,53	35,75	22,16	37	0,56	0,39	0,22
2	16,56	19,97	17,15	38	0,82	0,38	0,55
3	11,31	10,55	3,81	39	3,38	1,53	2,73
4	2,21	2,15	1,41	40	19,29	9,32	3,38
5	49,52	14,02	10,48	41	6,96	13,18	6,23
6	77,70	123,63	71,51	42	2,41	2,49	9,85
7	19,29	29,65	23,92	43	22,47	24,93	2,25
8	37,27	58,89	53,82	44	4,00	4,47	0,44
9	21,11	20,39	13,36	45	22,47	17,88	5,03
10	16,44	12,64	5,50	46	5,85	6,50	1,81
11	4,28	3,38	1,78	47	3,07	1,85	0,52
12	0,06	19,83	9,06	48	4,02	3,12	5,31
13	0,01	70,03	28,64	49	40,22	24,08	10,70
14	28,05	20,11	8,57	50	148,05	121,09	66,26
15	54,56	48,50	49,87	51	2,82	3,97	1,26
16	8,81	9,57	4,11	52	0,81	0,81	0,15
17	16,22	14,82	6,50	53	20,67	16,79	8,00
18	9,06	5,09	1,80	54	12,04	12,38	4,76
19	1,02	1,45	0,64	55	20,25	28,44	12,73
20	8,51	12,04	4,86	56	3,41	3,36	0,99
21	9,91	19,56	8,81	57	4,50	4,96	1,83
22	1,22	1,79	2,64	58	25,10	18,00	5,86
23	4,50	1,77	2,89	59	88,03	274,37	122,78
24	2,11	1,28	2,83	60	34,53	36,50	11,79
25	7,94	4,62	1,38	61	7,67	1,70	1,78

26	2,86	2,77	7,73	62	47,17	33,13	14,42
27	67,64	34,53	10,48	63	13,08	10,93	3,94
28	28,24	4,75	9,58	64	4,82	5,86	1,35
29	6,77	2,63	1,81	65	6,77	6,27	1,73
30	0,90	0,30	0,38	66	1,38	1,67	0,31
31	0,37	0,44	0,12	67	52,34	68,59	60,13
32	0,75	0,67	0,85	68	13,54	8,94	3,25
33	2,75	2,80	2,77	69	20,39	24,76	13,55
34	4,65	1,84	0,97	70	14,92	23,92	12,38
35	9,18	10,70	8,00	71	26,90	17,51	18,76
36	3,27	0,70	0,76	72	10,19	7,57	3,48

Microsoft excel programı kullanılarak yapılan hesaplamalar uveal melanomlu hastaların, sağlıklı gruba göre ifade düzeylerindeki ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) artış veya azalışı belirten grafikler Şekil 4-13 ve 4-14’de gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre hastalar, gen ifade düzeyi bir olan sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında miR-181b $2^{-\Delta\Delta C_t} = 9,25$; miR155’in $2^{-\Delta\Delta C_t} = 7,67$; miR-454’ün $2^{-\Delta\Delta C_t} = 4,14$ kat arttığı saptanmıştır. Hastaların Fold & Change ($|FC| \geq 2$) değeri göz önüne alındığında, gen ifade düzeylerinin 2 kattan fazla arttığı görülmüştür.



Şekil 4-13: Uveal Malign Melanomlu Hastaların Sağlıklı Kontrol Gruba göre miRNA İfade Düzeyleri



Şekil 4-14: Uveal Malign Melanomlu Hastaların Sağlıklı Kontrol Gruba göre miRNA İfade Düzeyleri

SPSS v21.0 programı ile yapılan istatistiksel analizlere göre; gruplar arasındaki dağılımın normallik varsayımı Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilk testleri ile değerlendirildi. Normallik varsayımı sonuçlarına göre $p < 0,05$ olduğu için Tablo 4-4, grupların normal dağılım göstermediğine ve verilerin incelenmesinde parametrik olmayan Mann-Whitney U testinin kullanılmasının uygun olduğuna karar verildi.

Tablo 4-4: Tablo 4-4: Normallik Dağılımı Testi

miRNA ifade düzeyler	Grup	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
		Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
miR-181b 2 - $\Delta\Delta$ CT	Hasta ve kontrol	,440	144	,000	,579	144	,000
miR-155 2 - $\Delta\Delta$ CT	Hasta ve kontrol	,444	144	,000	,575	144	,000
miR-454 2 - $\Delta\Delta$ CT	Hasta ve kontrol	,419	144	,000	,602	144	,000

Mann-Whitney U testi ile yapılan değerlendirmeye göre hasta ve kontrol grupları arasındaki 2- $\Delta\Delta$ Ct değerleri baz alınarak yapılan hesaplamalarda araştırdığımız miRNA'ların ifade düzeylerinin hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0,05$) olduğu görüldü. Her bir miRNA için elde edilen p değerleri

sırasıyla miR-181b, $p < 0,001$; miR-155, $p < 0,001$ miR-454, $p=0,005$ olduğu belirlendi (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Hasta ve kontrol grupları arasında miRNA gen ifade düzeylerinin Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmesi.

	miR-181b ifadesi	miR-155 ifadesi	miR-454 ifadesi
Mann-Whitney U	1584,000	1548,000	1728,000
Wilcoxon W	4212,000	4176,000	4356,000
Z	-5,048	-5,262	-4,186
p Değeri<	,000	,000	,000

Yüksek ifade düzeyi istatistiksel olarak anlamlı çıkan miR-181b, miR-155, ve miR-454 moleküllerinin hedeflediği mRNA'ları baskıladığı özelliğe sahip ve bu miRNA lar hedef genlerin aktivitesini baskılayarak onkogen rolü gösterdiler.

Uveal melanomalı hastalarda miRNA-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyleri ile hastaların cinsiyeti, tanı yaşları, klinik evreleri, tümör boyutu, metastaz durumu, cerrahi, radyasyon ya da kemoterapi gibi tedavi seçenekleri, herhangi bir riskli meslek grubunda çalışıp çalışmadığı, sigara ve alkol kullanımı gibi değişkenler arasındaki ilişki ayrıca Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir ve sonuçlar Tablo 4-6, 4-7, 4-8, 4-9, 4-10, 4-11, 4-12, 4-13, 4-14, 4-15, 4-16, 4-17, 4-18 ve 4-19'de verilmiştir.

Tablo 4-6: miR-181b ifade düzeyi ile tümör lokasyonu ilişkisi.

Tümör Lokasyonu	miR-181b İfadesi		Total	p value
	Azalış n(%) of total	Artış n(%)of total	Total n (%)	
İris melanoma	1 (%1,4)	6 (%8,3)	7 (%9,7)	p=0,917
Siliyar cisimler melanoma	0 (%0,00)	1 (%1,4)	1 (%1,4)	
Koroid melanoma	6 (%8,3)	50(%69,4)	56(%77,8)	
Siliyar cisimler+iris melanoma	0 (%0,00)	1 (%1,4)	1 (%1,4)	
Siliyar cisimler+koroid melanoma	1 (%1,4)	3 (%4,2)	4 (%5,6)	
Konjonktivanın melanositik tümörleri	0 (%0,00)	3 (%4,2)	3 (%4,2)	
Total n (%)	7 (%11,1)	65 (%88,9)	72 (%100)	

Tablo 4-7: miR-155 ifade düzeyi ile tümör lokasyonu ilişkisi.

Tümör Lokasyonu	miR-155 İfadesi		Total	p value
	Azalış n(%)	Artış n(%)	Total n (%)	
İris melanoma	0 (%0,00)	7 (%9,7)	7 (%9,7)	p=0,794
Siliyar cisimler melanoma	0 (%0,00)	1 (%1,4)	1 (%1,4)	
Koroid melanoma	6 (%8,3)	50 (%69,4)	56 (%77,8)	
Siliyar cisimler+iris melanoma	0 (%0,00)	1 (%1,4)	1 (%1,4)	
Siliyar cisimler+koroid melanoma	1 (%1,4)	3 (%4,2)	4 (%5,6)	
Konjonktivanın melanositik tümörleri	0 (%0,00)	3 (%4,2)	3 (%4,2)	
Total n (%)	7 (%9,7)	65 (%90,3)	72(%100)	

Tablo 4-8: miR-454 ifade düzeyi ile tümör lokasyonu ilişkisi.

Tümör Lokasyonu	miR-454 İfadesi		Total	p value
	Azalış n(%)	Artış n(%)	Total n (%)	
İris melanoma	0 (%0,00)	7 (%9,7)	7 (%9,7)	p=0,675
Siliyar cisimler melanoma	0 (%0,00)	1 (%1,4)	1 (%1,4)	
Koroid melanoma	12 (%16,7)	44 (%61,1)	56 (%77,8)	
Siliyar cisimler+iris melanoma	0 (%0,00)	1 (%1,4)	1 (%1,4)	
Siliyar cisimler+koroid melanoma	1 (%1,4)	3 (%4,2)	4 (%5,6)	
Konjonktivanın melanositik tümörleri	0 (%0,00)	3 (%4,2)	3 (%5,6)	
Total n (%)	13 (%18,1)	59 (%81,9)	72 (%100)	

Tablo 4-9: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi tanı yaşı ile ilgisi

miR-181b İfade Düzeyi				
İfade Düzeyi	Azalış n (%)	Artış n (%)	Total n(%)	
Tanı Yaş Ortalama 48 ± 12 (11-73)				
<60	7 (%9,7)	52 (%72,2)	59 (%81,9)	
≥60	1 (%1,4)	12 (%16,7)	13 (%18,1)	
Total n (%)	8 (%11,1)	64 (%88,9)	72(%100)	p=0,667
miR-155 İfade Düzeyi				
<60	6 (%8,3)	53 (%73,6)	59 (%81,9)	
≥60	1 (%1,4)	12 (%16,7)	13 (%18,1)	
Total n (%)	7 (%9,7)	65 (%90,3)	72(%100)	p=0,786
miR-454 İfade Düzeyi				
<60	11 (%15,3)	48 (%66,7)	59 (%81,9)	
≥60	2 (%2,8)	11(%15,3)	13 (%18,1)	
Total n (%)	13 (%18,1)	59 (%81,9)	72(%100)	p=0,784

Tablo 4-10: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi cinsiyet ile ilgisi

miR-181b İfade Düzeyi				
İfade Düzeyi	Azalış n (%)	Artış n (%)	Total n(%)	
Cinsiyet				
Kadın	22 (%15,3)	54 (%42,4)	76 (%52,8)	
Erkek	22 (%15,3)	46 (%22,9)	68 (%47,2)	
Total n (%)	44 (%34,7)	83 (%65,3)	144(%100)	p=0,659
miR-155 İfade Düzeyi				
Kadın	23 (%16,0)	53 (%36,8)	76 (%52,8)	
Erkek	20 (%13,9)	48 (%33,3)	68 (%47,2)	
Total n (%)	43 (%29,9)	101 (%70,1)	144(%100)	p=0,912
miR-454 İfade Düzeyi				
Kadın	26 (%18,1)	50 (%34,7)	76 (%52,8)	
Erkek	24 (%16,7)	44 (%30,6)	68 (%47,2)	
Total n (%)	50 (%34,8)	94 (%65,3)	144(%100)	p=0,892

Tablo 4-11: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi klinik evre ile ilgisi

miR-181b İfade Düzeyi				
İfade Düzeyi	Azalış n (%)	Artış n (%)	Total n(%)	
Evre				
Stage 1-2	5 (%6,9)	33 (%45,8)	38 (%52,8)	
Stage 3-4	3 (%4,2)	31 (%43,1)	34 (%47,2)	
Total n (%)	8 (%11,1)	64 (%88,9)	72 (%100)	p=0,562
miR-155 İfade Düzeyi				
Stage 1-2	5 (%6,9)	33 (%45,8)	38 (%52,8)	
Stage 3-4	2 (%2,8)	32 (%44,4)	34 (%47,2)	
Total n (%)	7 (%9,7)	65 (%90,2)	72(%100)	p=0,302
miR-454 İfade Düzeyi				
Stage 1-2	8 (%11,1)	30 (%41,7)	38 (%52,8)	
Stage 3-4	5 (%6,9)	29 (%40,3)	34 (%47,2)	
Total n (%)	13 (%18,1)	59 (%81,9)	72(%100)	p=0,488

Tablo 4-12: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi tümör çapı ile ilgisi

miR-181b İfade Düzeyi				
İfade Düzeyi	Azalış n (%)	Artış n (%)	Total n(%)	
Tümör çapı				
<12cm	5 (%6,9)	38 (%52,8)	43 (%59,7)	
≥12cm	3 (%4,2)	26 (%36,1)	29 (%40,3)	
Total n(%)	8 (%11,1)	44 (%88,9)	72(%100)	p=0,866
miR-155 İfade Düzeyi				
<12cm	4 (%5,6)	39 (%54,2)	43 (%59,7)	
≥12cm	3 (%4,2)	26 (%36,1)	29 (%40,3)	
Total n(%)	7 (%9,7)	65 (%90,3)	72 (%100)	p=0,884
miR-454 İfade Düzeyi				
<12cm	6 (%8,4)	37 (%51,3)	43 (%59,7)	
≥12cm	7 (%9,7)	22 (%30,6)	29 (%40,3)	
Total n(%)	13 (%18,1)	59 (%81,9)	72 (%100)	p=0,274

Tablo 4-13: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi metastaz varlığı ile ilgisi

miR-181b İfade Düzeyi				
İfade Düzeyi	Azalış n (%)	Artış n (%)	Total n(%)	
Metastaz				
No	8 (%11,1)	60 (%83,3)	68 (%94,4)	
Yes	0 (%0,00)	4 (%5,6)	4 (%5,6)	
Total n(%)	8 (%11,1)	64 (%88,9)	72 (%100)	p=0,470
miR-155 İfade Düzeyi				
No	7 (%9,7)	61 (%84,7)	68 (%94,4)	
Yes	0 (%0,00)	4 (%5,6)	4 (%5,6)	
Total n(%)	7 (%9,7)	65 (%90,3)	72 (%100)	p=0,802
miR-454 İfade Düzeyi				
No	13 (%18,1)	55 (%76,4)	68 (%94,4)	
Yes	0 (%0,00)	4 (%5,6)	4 (%5,6)	
Total n(%)	13(%18,1)	59 (%81,9)	72 (%100)	p=0,337

Tablo 4-14: miR-181b ifade düzeyi tedavi seçenekleri ile ilgisi

miR-181b İfade Düzeyi				
İfade Düzeyi	Azalış n (%)	Artış n (%)	Total n(%)	
Tedavi				
Cerrahi				
No	3 (%4,2)	23 (%31,9)	26 (%36,1)	
Yes	5 (%6,9)	41 (%56,9)	46 (%63,9)	
Total n(%)	8 (%11,1)	64 (%88,9)	72 (%100)	p=0,931
Radyasyon				
No	2 (%2,8)	35(%48,6)	37 (%51,4)	
Yes	6 (%8,3)	29 (%40,3)	35 (%48,6)	
Total n(%)	8 (%11,1)	64 (%88,9)	72 (%100)	p=0,116
Kemoterapi				
No	8 (%11,1)	62 (%86,1)	70 (%97,2)	
Yes	0 (%0,00)	2 (%2,8)	2 (%2,8)	
Total n(%)	8 (%11,1)	64 (%88,9)	72 (%100)	p=0,801

Tablo 4-15: miR-155 ifade düzeyi tedavi seçenekleri ile ilgisi

miR-155 İfade Düzeyi				
İfade Düzeyi	Azalış n (%)	Artış n (%)	Total n(%)	
Tedavi				
Cerrahi				
No	3 (%4,2)	23 (%31,9)	26 (%36,1)	
Yes	4 (%5,6)	42 (%58,3)	46 (%63,9)	
Total n(%)	7 (%9,8)	65 (%90,2)	72(%100)	p=0,648
Radyasyon				
No	1 (%1,4)	36 (%50,0)	37 (%51,4)	
Yes	6 (%8,3)	29 (%40,3)	35 (%48,6)	
Total n(%)	7 (%9,7)	65 (%90,3)	72 (%100)	p=0,040
Kemoterapi				
No	7 (%9,7)	63 (%87,5)	70 (%97,2)	
Yes	0 (%0,00)	2 (%2,8)	2 (%2,8)	
Total n(%)	7 (%9,7)	65 (%90,3)	72 (%100)	p=0,826

Tablo 4-16: miR-454 ifade düzeyi tedavi seçenekleri ile ilgisi

miR-454 İfade Düzeyi				
İfade Düzeyi	Azalış n (%)	Artış n (%)	Total n(%)	
Tedavi				
Cerrahi				
No	4 (%5,6)	22 (%30,6)	26 (%36,2)	
Yes	9 (%12,5)	37 (%51,3)	46 (%63,8)	
Total n(%)	13 (%18,1)	59 (%81,9)	72 (%100)	p=0,660
Radyasyon				
No	5 (%6,9)	32 (%44,4)	37 (%51,4)	
Yes	8 (%11,1)	27(%37,5)	35 (%48,6)	
Total n(%)	13 (%18,1)	44 (%81,9)	72 (%100)	p=0,306
Kemoterapi				
No	13 (%18,1)	57 (%79,1)	70 (%97,2)	
Yes	0 (%0,00)	2 (%2,8)	2 (%2,8)	
Toplam n(%)	13 (%18,1)	59 (%81,9)	72 (%100)	p=0,681

Tablo 4-17: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi riskli meslek ile ilgisi

miR-181b İfade Düzeyi				
İfade Düzeyi	Azalış n (%)	Artış n (%)	Total n(%)	
Riskli meslek grubu				
No	3 (%4,2)	38 (%52,7)	41 (%58,9)	
Yes	5 (%6,9)	26 (%36,1)	31 (%43,1)	
Total n(%)	8 (%11,1)	64 (%88,9)	72 (%100)	p=0,242
miR-155 İfade Düzeyi				
Riskli meslek grubu				
No	4 (%5,6)	37 (%51,4)	41 (%56,9)	
Yes	3 (%4,2)	28 (%38,9)	31 (%43,1)	
Total n(%)	7 (%9,7)	65 (%90,3)	72 (%100)	p=0,991
miR-454 İfade Düzeyi				
Riskli meslek grubu				
No	6 (%8,3)	35 (%48,6)	41 (%57,0)	
Yes	7 (%9,7)	24 (%33,4)	31 (%43,0)	
Total n(%)	13 (%18,0)	59 (%82,0)	72 (%100)	p=0,389

Tablo 4-18: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi sigara kullanımı ile ilgisi

miR-181b İfade Düzeyi				
İfade Düzeyi	Azalış n (%)	Artış n (%)	Total n(%)	
Sigara				
No	2 (%2,8)	33 (%45,8)	35 (%48,6)	
Yes	6 (%8,3)	31 (%43,1)	37 (%51,4)	
Total n(%)	8 (%11,1)	64 (%88,9)	72 (%100)	p=0,159
miR-155 İfade Düzeyi				
Sigara				
No	2 (%2,8)	33 (%45,8)	35 (%48,6)	
Yes	5 (%6,9)	32 (%44,5)	37 (%51,4)	
Total n(%)	7 (%9,7)	65 (%90,3)	72 (%100)	p=0,268
miR-454 İfade Düzeyi				
Sigara				
No	2 (%2,8)	33 (%45,8)	35 (%48,6)	
Yes	11 (%15,3)	26 (%36,1)	37 (%51,4)	
Total n(%)	13 (%18,1)	59 (%81,9)	72 (%100)	p=0,009

Tablo 4-19: miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeyi alkol kullanımı ile ilgisi

miR-181b İfade Düzeyi				
İfade Düzeyi	Azalış n (%)	Artış n (%)	Total n(%)	
Alkol				
No	7 (%9,7)	62 (%86,1)	69 (%95,8)	
Yes	1 (%1,4)	2 (%2,8)	3 (%4,2)	
Total n(%)	8 (%11,1)	64 (%88,9)	72 (%100)	p=0,214
miR-155 İfade Düzeyi				
Alkol				
No	6 (%8,3)	63 (%87,5)	69 (%95,8)	
Yes	1 (%1,4)	2 (%2,8)	3 (%4,2)	
Total n(%)	7 (%9,7)	65 (%90,3)	72 (%100)	p=0,161
miR-454 İfade Düzeyi				
Alkol				
No	11 (%15,3)	58 (%80,6)	69 (%95,8)	
Yes	2 (%2,8)	1 (%1,4)	3 (%4,2)	
Total n(%)	13 (%18,1)	59 (%81,9)	72 (%100)	p=0,026

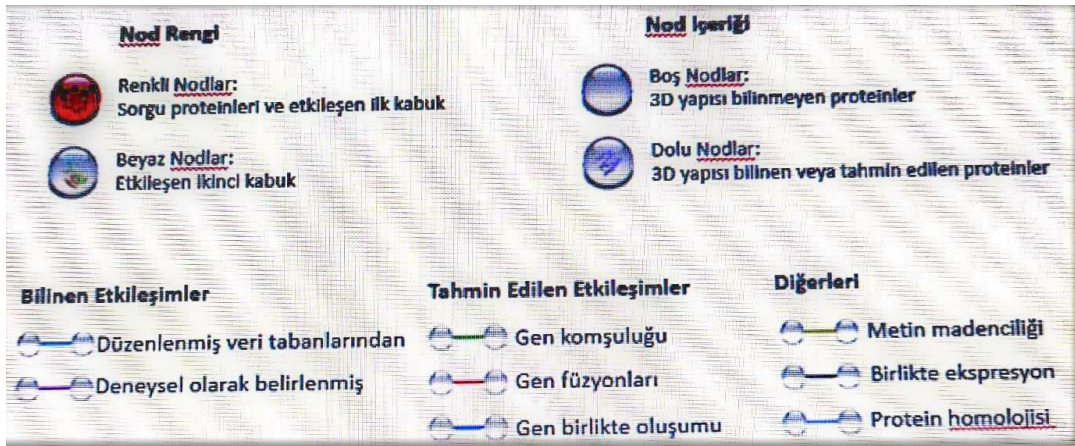
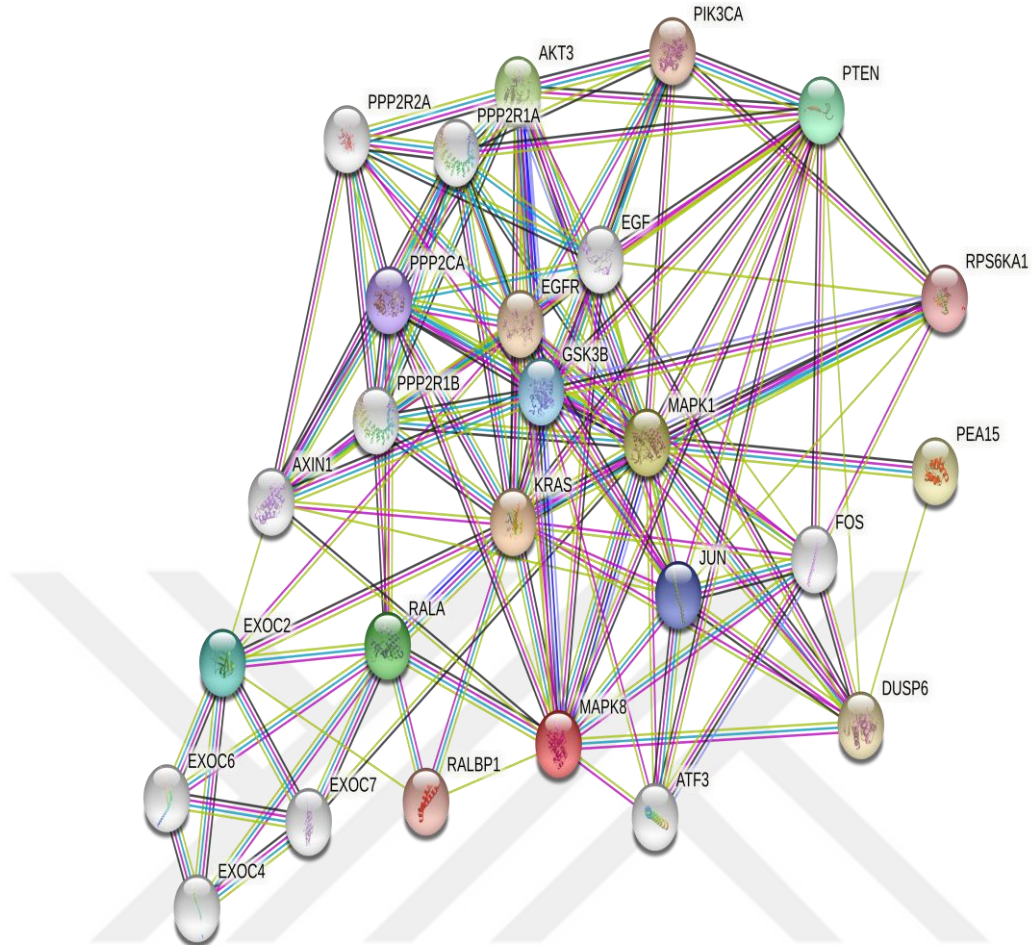
Statistiksel analizlere göre miR-155 radyasyon tedavi seçeneği ile P değeri 0,040 ($<0,05$) olarak, anlamlı ilişki göstermiş ve ayrıca miR-454 sigara ve alkol kullanımı ile P değerleri sırasıyla 0,009 ve 0,026 ($<0,05$) olarak, anlamlı ilişki göstermiştir. MiR-181b, miR-155 ve miR-454 diğer değişkenler ile anlamlı ilişki göstermemektedir.

4.4. String Analiz

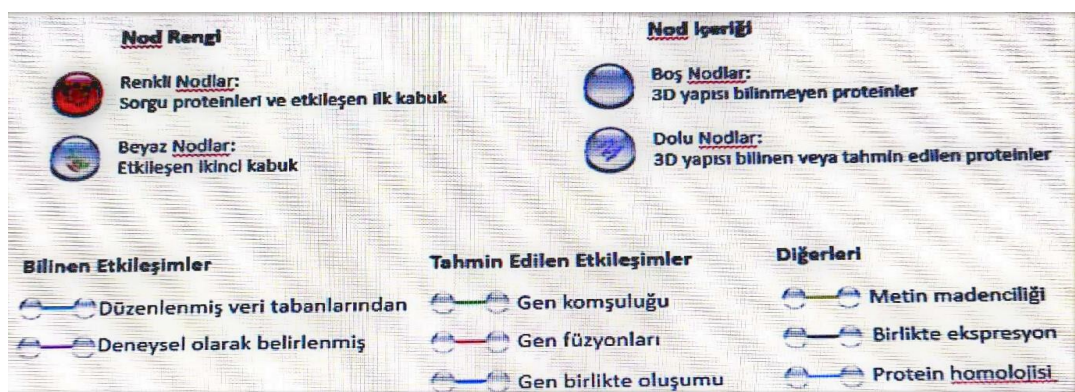
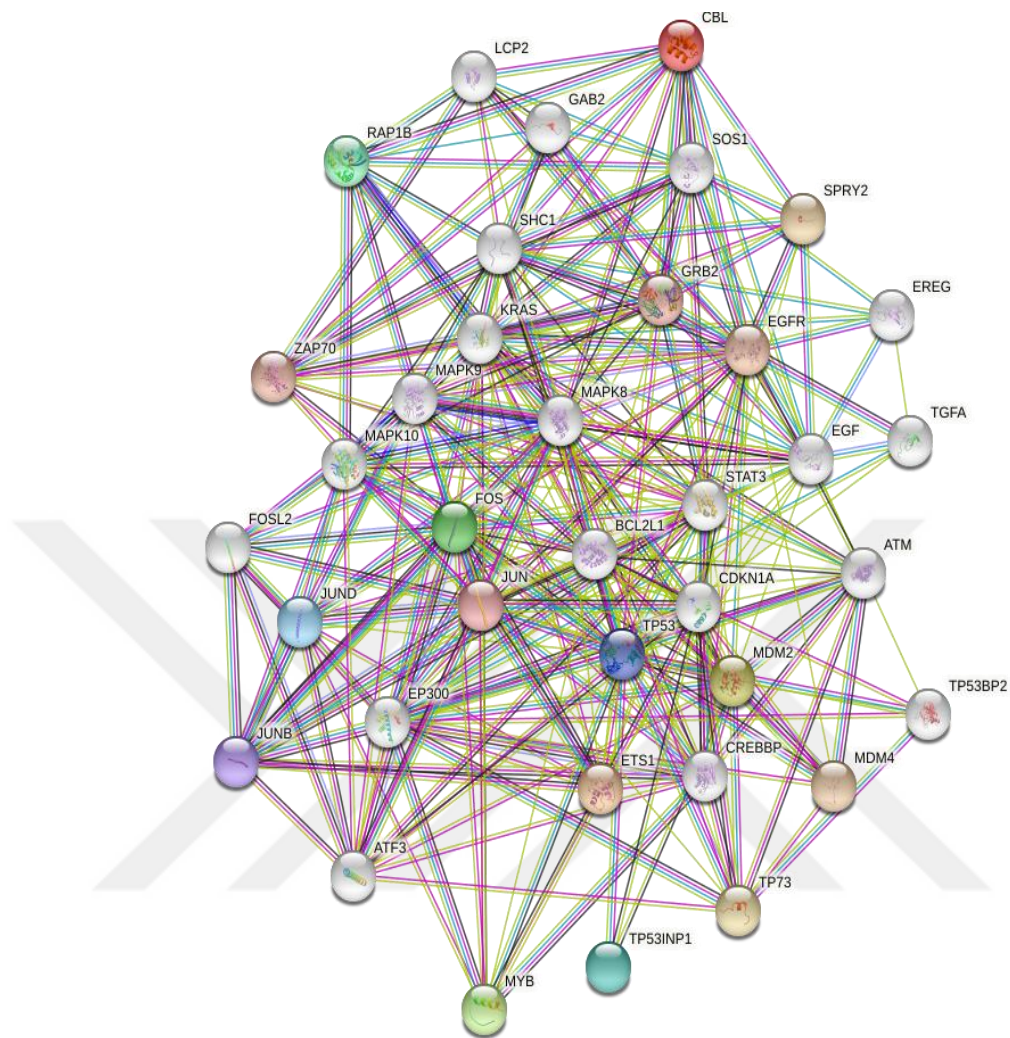
miRNA'ların hedef genleri “mirTarBase” ve “TargetScan” veri tabanları kullanılarak belirlendi ve ardından hedef genlerin en çok ilişkili olan genler “STRING Analizi (Protein-protein interaksiyon analizi)” ile gerçekleştirildi. MiR-181b, miR-155 ve miR-454 hedef genleri (Tablo 4-20), arasında olası anlamlı etkileşim için string analizi yapıldı. String analizi sonuçlarına göre miR-181b'nin hedeflediği genler ve buna bağlı proteinler arasında KRAS ve MAPK1 protein etkileşimlerinin güçlü olduğu tespit edildi ($p < 0,05$) (Şekil 4-15). Bu iki protein RAF/MAPK yolağında işlev yapmaktadır. Ayrıca MAPK1 ve MAPK8 güçlü etkileşimi ve KRAS ve RALA proteinlerinin güçlü bağlantısında gözden kaçmamalıdır. MiR-155 için yapılan string analiz sonucu ise en fazla etkileşim içerisinde olan moleküller FOS ve ETS1 ve aynı zamanda CBL ile RAP1B etkileşimi olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$) (Şekil 4-16). String analizi miR-454 hedef proteinleri için en fazla etkileşimi MET ve HGF molekülleri ve PTEN ve MDM4 molekülleri arasında olduğunu gösterdi. PTEN ve MDM4 signal iletişim yolunda MDM2, FOXO ve TP53 proteinleri ile ilişkili oldukları belirlenmektedir. Ayrıca bu analizde en yakın sekans benzerliği olan WNT1 ve WNT2B moleküllerinin de yakın etkileşimde oldukları gösterildi ($p < 0,05$) (Şekil 4-17).

Tablo 4-20: İfade düzeyi artan miRNA'ların olası hedef molekülleri

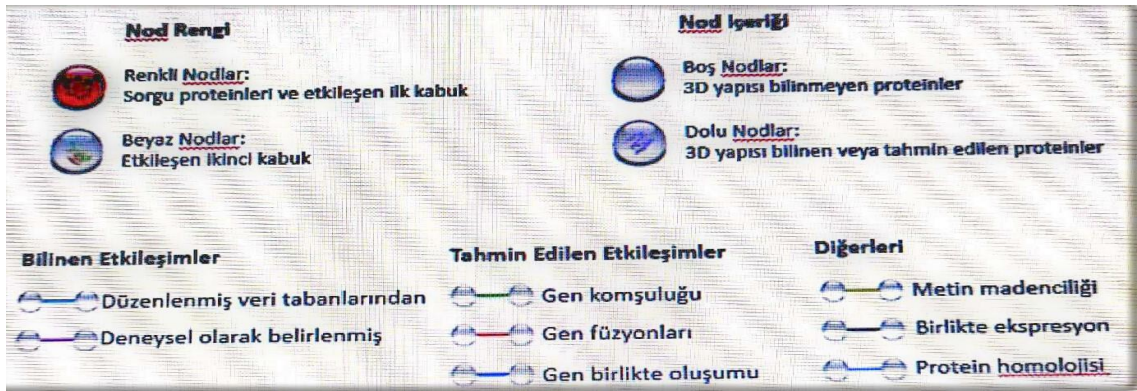
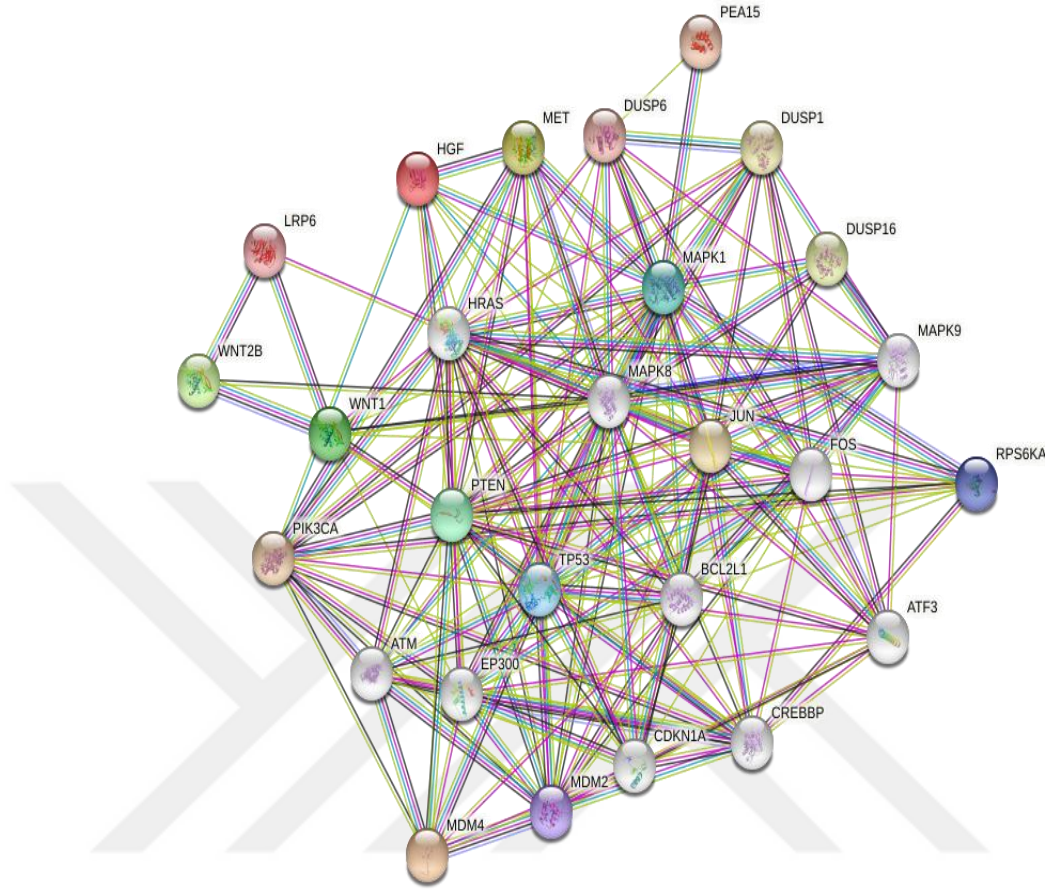
miRNA	Dizi	Hedef Moleküller
miR-181b-5p	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	RALA, PTEN, KRAS, MAPK1, MAPK8, AKT3
miR-155-5p	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGUU	FOS, ETS1, TP53INP1, MDM2, MYB, RAP1B, CBL
miR-454-3p	UAGUGCAAUAUUGC UUAUAGGGU	MDM4, PTEN, WNT1, WNT2B, MAPK1, MET, HGF



Şekil 4-15: miR-181b'nin hedef genleri için yapılan string analizi (p-value: 0,000118).



Şekil 4-16: miR-155'in hedef genleri için yapılan string analizi (P-value: 0,000399).



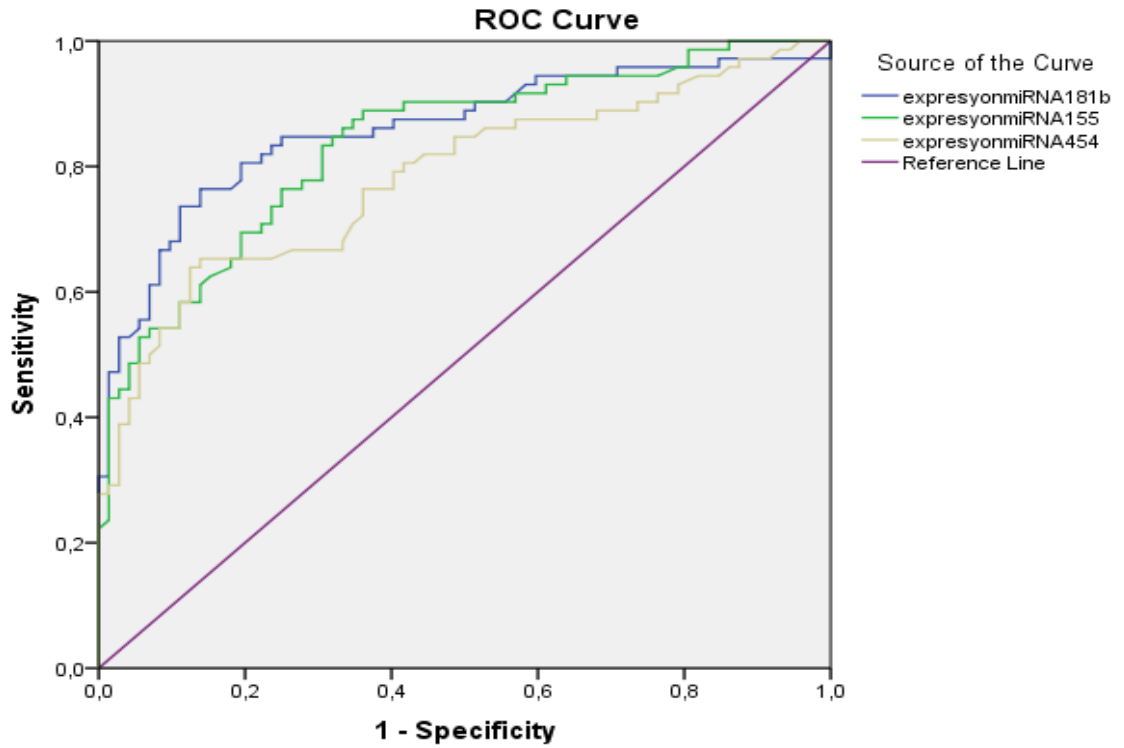
Şekil 4-17: miR-454'ün hedef genleri için yapılan string analizi (P-value: 0,000129).

4.5. ROC Analizi

İncelediğimiz miR-181b, miR-155 ve miR-454 moleküllerinin aday biyobelirteç olarak tanısal performansını diğer bir değişle uveal melanoma tanılı hasta ve sağlıklı kontrol grubunu ayırt edebilme gücünü gösterebilmek amacı ile Receiver Operator Characteristics (ROC) analizi gerçekleştirildi. Şekil 4-15 ve Tablo 4-13'te verilen her bir miRNA için belirlenen ROC-AUC değerleri ve %95 CI (Güven Aralığı) sonuçları yer almaktadır ve bu sonuçlara göre uveal melanomalı hastaların tanısında miRNA181b, miRNA155 ve miRNA454 moleküllerinin tanısal gücünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p=0,000$). (Table 4-21)

Table 4-21: Uveal Melanomlu hasta ve sağlıklı grubun ayrılmasında miRNA'ların ROC-AUC değerleri.

miRNAs	ROC-AUC	95% CI	p value
miR-181b	0,859	0,796 - 0,922	,000
miR-155	0,836	0,771 - 0,901	,000
miR-454	0,783	0,707 - 0,858	,000



Diagonal segments are produced by ties.

Şekil 4-18: Uveal melanomlu ve sağlıklı kontrol grupları arasındaki miR-181b, miR-155 ve miR-454 ROC eğrileri.

TARTIŞMA

Uveal melanoma erişkinlerde en sık görülen primer intraoküler malignitedir ve tüm melanomların % 3-5'ini temsil eder [1,2]. Uvea yolu, kürenin irisi, siliyer cismi ve koroidi kapsayan pigmentli tabakasıdır. Uveal primerlerden ziyade kutanöz gibi davranan ve yönetilen konjunktival ve adneksiyal melanomlar da bazen bunlara dahil edilmektedir. Uveal melanoma en yaygın olarak koroid melanositlerinden (%85 - % 90) ortaya çıkar, ancak aynı zamanda iris (% 3 - % 5) ve siliyer cisimden de (% 5 - % 8) oluşabilir [1,2]. Ultraviyole radyasyona maruz kalmanın neoplazi riskini artırdığı teorisi bazıları tarafından kabul görmekle beraber, kesin olarak kanıtlanmamıştır. Uveal melanomada önemli histopatolojik faktörler olan, hücre tipi, mitotik aktivite, tümör infiltre eden lenfositler (TIL'ler), ekstrasvasküler matris modeli, pigmentasyon derecesi ve ekstreskleral uzantı prognoz için belirleyici kriterler olarak sayılmaktadır [19]. Uveal melanoma, klinik muayenede neredeyse % 100 doğrulukla potansiyel olarak teşhis edilebilmesine rağmen [21], birçok hastada tümör gözden kaçır veya yanlış teşhis edilir [6]. Erken teşhisi engelleyen anatomik bir konumun yanı sıra siliyer cismin yüksek hareket kabiliyetine sahip olduğu varsayılmaktadır. Siliyer kasın kasılmaları nedeniyle, çok sayıda damar ve bu alanda kötü prognozlu ekstrasvasküler matriks paternlerinin oluşması, uveal melanoma'nın daha yüksek metastatik potansiyeli ile ilişkili olabilir [23, 24]. İris kaynaklı uveal melanoma, daha iyi prognozla ilişkilidir, bu da iris tümörlerin daha kolay tespit edilebilmesinden ve sonuç olarak tedavinin çok daha erken uygulanmasından kaynaklanabilir. Uveal melanoma'nın birincil tedavisine bakılmaksızın hastaların yaklaşık yarısında metastaz gelişir [131], aynı zamanda yüksek oranda metastaz yapma eğilimi olan bu kanser türü, hematojen olduğu için % 90-95 oranında metastaz karaciğerde görülmektedir. Primer tümörün kontrolünden yıllar sonra yeni uzak metastaz gelişiminin bir açıklaması, dolaşımdaki ilk tanı anındaki tümör hücrelerinin varlığıdır [132]. Başka bir deyişle, hastalık genellikle hastaların % 50'sinde tümör teşhisi sırasında zaten yayılmış haldedir [74]. Bu nedenle hastalardan invaziv olmayan veya minimal invaziv yöntemlerle elde edilebilecek yüksek hassasiyette biyobelirteçlerin keşfi hem t-erken tanı hem de tedavi takibinde yararlı olacaktır. MikroRNAlar, 19-22 nukleotid uzunluğunda, transkripsiyon sonrası hedef mRNA'lara etki eden küçük moleküllerdir. MiRNA genlerinin yarısından fazlasının kanserle ilişkili genomik bölgelerde veya hassas bölgelerde bulunduğunu gösteren çeşitli çalışmalar

bulunmaktadır. Kanser dokularından elde edilen ve çok sayıda uveal malign melanoma hücre soyunda yapılan mikrodizni ifade verileri, anormal miRNA ifadesinin kanser oluşumu ve ilerlemesinde önemli olduğunu göstermiştir. MiRNA'ların lösemi, lenfoma, glioblastoma, meme, kolon, mide, akciğer, prostat, tiroid, karaciğer ve yumurtalık kanseri dahil olmak üzere farklı birçok kanser türünde etkili olduğu ve kanser oluşumundan ve ilerleyişinden sorumlu olduğu bildirilmiştir [180-198]. Bundan başka birçok çalışmada miRNA ifade profilleri ile miRNA'ların kanserlerde tanı koymak için, özellikle mRNA'lara göre potansiyel olarak üstün oldukları gösterilmiştir [193] ve miRNAların kanser sınıflandırılması için önemli biyobelirteçler olduğu öne sürülmektedir [249, 250]. Birçok çalışmada uveal melanoma da gösterilen anormal ifade düzeyi, proliferasyon, invazyon ve metastaz ile yakından ilişkili olduğu vurgulanmaktadır [19-21, 283-292]. Uveal malign melanomda bugüne kadar yapılan çalışma sonuçlarına göre farklı miRNA'ların söz konusu hastalıkta yükseldiği veya azaldığı ve duruma göre tümör supresor veya onkogen olarak rol aldığı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, uveal melanomda miR-181b'nin teşvik edici etkisi gösterilmiştir [240]. Biyoinformatik analizler, miR-181b'nin, karboksi terminal bölgesi küçük fosfataz benzeri protein molekülünü (CTDSPL) hedeflenerek hücre döngüsünün ilerleyişini artırdığı ve buna bağlı olarak onkogenik etki gösterdiği saptanmıştır. Benzer şekilde miR-155'in, uveal melanom hücre proliferasyonunu teşvik ederek onkogenik bir özellik gösterdiği anlaşılmıştır [243]. miR-454, *PTEN* tümör baskılayıcı geni üzerinde onkogenik etki yaparak, kanser hücre döngüsünün düzenlenmesinde etkili olmakta ve uveal melanoma hücrelerinin proliferasyonu ile G₁/S geçişi yoluyla hücre ilerlemesine sebep olduğu ileri sürülmüştür [244]. miR-181 ailesine ait moleküllerin hücre döngüsünde rol oynayarak, hücre döngüsünü negatif kontrol ettiği bilinmektedir. Bu nedenle ilaç hedefi olabilecek bir molekül olduğu bildirilmiştir [19]. Uveal malign melanom hücre hatlarında yapılan, miR-155'in incelendiği çalışmalarda ise tümör dokusunda aşırı eksprese olduğu gösterilmiş ve buna bağlı olarak proliferasyon, invazyon ve metastaz da rol oynayabileceği ve terapötik bir hedef olabileceği ileri sürülmüştür [20]. Aynı zamanda, miR-454'ün araştırıldığı çalışmada ise söz konusu miRNA molekülünün direkt hedefinin *PTEN* geni olduğu gösterilmiş ve tümör dokusunda ifadesi incelenmiş ve miR-454'ün tümör dokusunda aşırı anlatım yaptığı ve bu durumun hücre proliferasyonu ve invazyonunda etkili olduğu bildirilmiştir [21].

Yukarıda bahsi geçen 3 çalışmadan yola çıkarak, bu tez çalışması, İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü'nde, uveal melanomlu hasta ile kontrol grubu olarak hasta grubu ile yaş, cinsiyet ve ırk açısından eşleştirilerek, kendisinde ve üç nesil geriye dönük kanser hastalığı bulunmayan kontrol grubu bireylerin periferik kan örneğinden ayrılan serumlarından ayrıştırılan RNA (Cell Free RNA)'lar kullanılarak miR-181b, miR-155, miR-454 ifade düzeyi incelenmiştir.

Hastaların yaş ortalaması 54,68 ($\pm 13,69$); sağlıklı kontrol grubunun yaş ortalaması ise 54,25 ($\pm 13,24$), hastaların tanı yaşı dağılımı ise ortalama 48,19 ($\pm 12,97$) şeklindedir. Gerek sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubunda gerekse uveal melanomlu hasta grubunda yaş ortalamaları arasında istatistiksel bir fark bulunmamakta, ve gruplar yaş açısından benzer dağılım göstermektedir.

miRNA ifadelerinin değerlendirilmesi ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) formülü kullanarak, hastaların, gen ifade düzeyi bir olan sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında miR-181b $2^{-\Delta\Delta C_T} = 9,25$; miR155'in $2^{-\Delta\Delta C_T} = 7,67$; miR-454'ün $2^{-\Delta\Delta C_T} = 4,14$ kat arttığı saptanmıştır. Hastaların Fold & Change ($|FC| \geq 2$) değeri göz önüne alındığında, gen ifade düzeylerinin 2 kattan fazla arttığı görülmüştür. Bu bulgular, miR-181b, miR-155 ve miR-454'ün tanısal ve prognostik öneme sahip olabileceğini düşündürmektedir.

SPSS v21.0 programında yapılan analiz sonucu, Mann-Whitney U testi değerlendirmesine göre hasta ve kontrol grupları arasındaki $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri baz alınarak yapılan hesaplamalarda, araştırdığımız miRNA'ların ifade düzeylerinin hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0,05$) olduğu görülmüştür. Her bir miRNA için elde edilen p değerleri sırasıyla miR-181b, $p < 0,001$; miR-155, $p < 0,001$ miR-454, $p = 0,005$ olarak saptanmıştır. Yüksek ifade gösteren ve istatistiksel olarak anlamlı olan miR-181b, miR-155 ve miR-454 moleküllerinin hedeflediği mRNA'ları baskıladığı ve bu miRNA'ların hedef genlerin aktivitesini baskılayarak onkogen rolü gösterdiğini sonucuna varılmıştır. İstatistiksel analizlere göre miR-155'ün radyasyon tedavisi almış olanlarda daha yüksek olduğu görülmüştür ($p = 0,040$ ($< 0,05$)). miR-454 ifade düzeyi ile sigara ve alkol kullanımı arasında ise

sırasıyla $p=0,009$ ve $P=0,026$ ($<0,05$) olmak üzere anlamlı ilişkiler saptanmıştır. miR-181b, miR-155 ve miR-454 ile diğer demografik ve klinik parametreler arasında ise anlamlı bir ilişki gösterilememiştir. Ek olarak miRNA'ların tanısal gücünü belirlemek amacı ile miR-181b, miR-155 ve miR-454 moleküllerinin aday biyobelirteç olarak tanısal performansını diğer bir deyişle uveal melanoma tanılı hasta ve sağlıklı kontrol grubunu ayırt edebilme gücünü gösterebilmek amacı ile Receiver Operator Characteristics (ROC) analizi kullanılarak yapılan hesaplamalarda miRNA-181b, miRNA-155 ve miRNA-454 moleküllerinin tanısal gücünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0,000$).

Literatürde, uveal malign melanomalı hastaların serumunda miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeylerini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak söz konusu miRNA'ların uveal melanoma hücre kültüründe ve miR-454 tümör dokusundaki ifade düzeyi artışı ve yüksek anlatıma sahip olduğu bildirilmiştir [19-21]. Bu bağlamda çalışma sonuçlarımız literatür bulguları ile uyumlu olmakla beraber çalışmamız uveal melanomlu hastaların serumunda miR-181b, miR-155 ve miR-454 ifade düzeylerinin araştırıldığı ilk çalışma olarak sunulmaktadır. Bundan başka çalışmada sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmanın yapılmış olması ve bu ilişkinin istatistiksel anlamlılık göstermesi, ilgili moleküllerin ROC analizinde biyobelirteç olma potansiyellerinin yüksek olarak saptanması sebebi ile bahsi geçen miRNA'ların gerek uveal malign melanoma tanı ve tedavi takibinde birer aday biyobelirteç gerekse aday ilaç olarak değerlendirilebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarda, hasta grubu içerisinde, yeni tanı almış hastaların söz konusu üç miRNA için aşırı derece yüksek ifade göstermiş olmaları dikkat çekicidir. Bu durum aktif primer tümörün varlığı ile ilişkili olabilir. Uveal malign melanoma oldukça nadir bir hastalık olduğundan çalışma grubunda tanı anında hiç tedavi almamış hasta sayısı düşük olduğu için daha fazla sayıda yeni tanı alıp hiçbir tedavi uygulanmamış hasta grubunda tekrar edilmesi uygun olacaktır. Bununla beraber her ne kadar ROC analizinde üç miRNA'nın üçünün de anlamlı olması bu miRNA'ların göz içi yerleşimli diğer tümörlerde de ekspresyonlarının araştırılması gerektiğini göstermektedir. Ancak bu çalışmaları tamamladığında söz konusu miRNA'ların uveal malign melanomaya özgün olduğu ve erken tanıda kullanılabileceği kanıtlanmayacaktır. Bundan başka söz konusu miRNA'ların tedavi takibinde etkinliğinin

anlaşılması ve için uveal malign melanomalı hastaların serumlarında tedavi öncesi, tedavi süresi boyunca ve tedavi sonunda da ilgili miRNA'ların ölçülmesi ve sonuçların karşılaştırıldığı ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Yukarıdaki sonuçlara ilave olarak sunulan tez çalışmasında, miRNA'ların hedef genleri “mirTarBase” ve “TargetScan” veri tabanları kullanılarak araştırıldı. miRNA'ların hedefeledikleri genlerle ilişkili olan diğer genler ve gen yolakları “STRING Analizi (Protein-protein interaksiyon analizi)” ile belirlendi. miR-181b, miR-155 ve miR-454 hedef genleri arasında olası anlamlı etkileşim için yapılan String analizi sonuçlarına göre miR-181b'nin hedeflediği genler ve buna bağlı proteinler arasında KRAS ve MAPK1 protein etkileşimlerinin güçlü olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). RAF/MAPK yolağında işlev yapan bu iki proteinin öncelikle *RAS* geninin, *RAF* genine ve ardından *RAF*'ın MEK ve ERK genlerine etki ederek MAPK molekülünü aktif etmek suretiyle hücre proliferasyonu ve invazyonunu arttırdığı ve sonuç olarak kanser oluşumu ve ilerlemesine yol açmaktadır. Ayrıca bu inceleme sırasında MAPK1 ve MAPK8 güçlü etkileşimi ile KRAS ve RALA proteinlerinin güçlü bağlantısının olduğu da dikkat çekmiştir.

miR-155 için yapılan String analizinde ise en fazla etkileşimin FOS ve ETS1 molekülleri ile CBL ve RAP1B molekül çiftlerinin arasında olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Normal hücre proliferasyonu için genellikle MAPK ve PI3K yolaklarının birlikte çalışması gerekmektedir. Bu yolaklar birlikte artan metabolizma, protein sentezi, hücre iskeletinin düzenlenmesi, pro-apoptotik sinyalin inhibe edilmesi, hücre döngüsünün ilerlemesi, G_1/G_0 'dan S fazına geçişinin uyarılması ve buna benzer birçok olayı kontrol etmekte ve sinerjik olarak çalışmaktadır. MAPK aktivasyonunun ardından nukleusa transloke olmakta, aktif ERK protein kinazlar, hücre döngüsü ilerlemesine dahil olan çeşitli transkripsiyonal aktivatörleri fosforile ederek işlevlerini yerine getirmektedirler. En önemli hedefler arasında bulunan SRF, ETS1, ELK1 ve MYC faktörlerinin tümü bu tip fosforilasyon ile uyarılırlar. Aynı zamanda, AP1 komponenti olan FOS ve JUN transkripsiyonunada etki ederek, hücre döngüsünün, MAPK ve PI3K yolaklarının koordine çalışması ve aşırı aktif olmasına neden olurlar [293]. Anlaşılacağı üzere miR-155'in aşırı ifadesinin söz konusu moleküller ile olan etkileşimi uveal malign melanom gelişiminde etkili olduğunu düşündürmektedir.

miR-454 için yapılan String analizinde miR-454 hedef proteinleri arasında en fazla etkileşimi MET ve HGF moleküllerinin gösterdiği saptanmıştır. MET - Hepatosit büyüme faktörü reseptörü; Hepatosit büyüme faktörü / HGF ligandına bağlanarak hücre dışı matristen sinyalleri sitoplazmaya aktaran reseptör tirozin kinaz, çoğalma, morfogenez ve hayatta kalma dahil birçok fizyolojik süreci düzenleyen bir moleküldür. Hücre yüzeyindeki ligand bağlanması, aşağı akış sinyal molekülleri için yerleştirme yerleri sağlayan hücre içi alanında MET'in otofosforilasyonunu indüklemektedir. Ligand ile aktivasyonu takiben, PI3-kinaz alt birimi PIK3R1, PLCG1, SRC, GRB2, STAT3 veya adaptör GAB1 ile etkileşime girmekte hem MAPK yolu üzerinden hücre proliferasyonu, kanser oluşumu ve hücre döngüsünün ilerlemesine yardımcı olurken, hem de PI3K- AKT- mTOR sinyal yolu aktivasyonuna dahil olarak hücrelerin hayatta kalmasına sebep olur. PTEN ve MDM4 signal iletişim yolunda MDM2, FOXO ve TP53 proteinleri ile ilişkili moleküllerdir [294]. Ayrıca bu analizde en yakın sekans benzerliği olan WNT1 ve WNT2B molekülleri'nin de miR-454 ile ilişkili genlerle yakın etkileşimleri olduğu gözlemlenmiş ve bu etkileşimlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

Özetle, çalışmamızda miR-454 ifade düzeyinin artışının dış etkenlerden sigara ve alkol kullanımı ile ilişki gösterdiği istatistiksel olarak kanıtlanmıştır ancak araştırılan üç miRNA'nın hiçbirinin riskli meslek gurubu, tümör boyutu, klinik evre, tümör lokasyonu ve metastaz varlığı arasında istatistiksel bir anlamlılık olmadığı belirlenmiştir. Bu durumda söz konusu miRNA'ların uveal malign melanomlu hastalar için hastalığın iris, siliyar cisimler, koroid ve konjonktiva yerleşimli, tüm evrelerinde tanısal bir biyolojik belirteç olarak görev yapabileceğini düşündürmektedir. Üstelik metastazın olup olmadığı, miRNA'ların ifade düzeyinde anlamlı rolü olmadığı, hem primer ve hem metastatik uveal melanomada söz konusu olan miRNA'ların artışı görülmektedir. Bu çalışma sonucu ve bugüne kadar farklı kanserlerde yapılmış olan çalışmalarda miR-181b, miR-155 ve miR-454 artan ifade düzeyi ve buna bağlı hücre sinyal iletimi ve aktivitelerindeki artış, söz konusu üç miRNA'nın onkogenik aktivitesini birçok kanser türünde olduğu gibi, uveal melanomada da ispatlamıştır. Çalışmamız, miRNA'ların çoğu kanserde olduğu gibi uveal melanoma hastalığında da gerek diyagnostik ve prognostik gerekse tedavi için hedef moleküller olarak

değerlendirilebileceğini ancak yine de bu konuda ileri araştırmaların gerektiğini ortaya koymaktadır.



KAYNAKLAR

1. Krantz, B.A., et al., *Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease*. Clin Ophthalmol, 2017. **11**: p. 279-289.
2. Shields, C.L., et al., *American Joint Committee on Cancer classification of posterior uveal melanoma (tumor size category) predicts prognosis in 7731 patients*. Ophthalmology, 2013. **120**(10): p. 2066-71.
3. Shields, J.A. and C.L. Shields, *Management of posterior uveal melanoma: past, present, and future: the 2014 Charles L. Schepens lecture*. Ophthalmology, 2015. **122**(2): p. 414-28.
4. Eskelin, S., et al., *Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: tumor progression before and after treatment*. Ophthalmology, 2000. **107**(8): p. 1443-9.
5. Materin, M.A., M. Faries, and H.M. Kluger, *Molecular alternations in uveal melanoma*. Curr Probl Cancer, 2011. **35**(4): p. 211-24.
6. McLaughlin, C.C., et al., *Incidence of noncutaneous melanomas in the U.S.* Cancer, 2005. **103**(5): p. 1000-7.
7. Dithmar, S., C.E. Diaz, and H.E. Grossniklaus, *Intraocular melanoma spread to regional lymph nodes: report of two cases*. Retina, 2000. **20**(1): p. 76-9.
8. Kujala, E., T. Makitie, and T. Kivela, *Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(11): p. 4651-9.
9. Chen, X., et al., *Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases*. Cell Res, 2008. **18**(10): p. 997-1006.
10. Gilad, S., et al., *Serum microRNAs are promising novel biomarkers*. PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3148.
11. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
12. Bignotti, E., et al., *Identification of stably expressed reference small non-coding RNAs for microRNA quantification in high-grade serous ovarian carcinoma tissues*. J Cell Mol Med, 2016. **20**(12): p. 2341-2348.
13. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
14. Shenouda, S.K. and S.K. Alahari, *MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?* Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(3-4): p. 369-78.
15. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-66.
16. Turchinovich, A., L. Weiz, and B. Burwinkel, *Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function*. Trends Biochem Sci, 2012. **37**(11): p. 460-5.
17. Simons, M. and G. Raposo, *Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(4): p. 575-81.
18. Li, Z., et al., *MicroRNA dysregulation in uveal melanoma: a new player enters the game*. Oncotarget, 2015. **6**(7): p. 4562-8.
19. Zhang, L., et al., *The miR-181 family promotes cell cycle by targeting CTDSPL, a phosphatase-like tumor suppressor in uveal melanoma*. J Exp Clin Cancer Res, 2018. **37**(1): p. 15.

20. Peng, J., H. Liu, and C. Liu, *MiR-155 Promotes Uveal Melanoma Cell Proliferation and Invasion by Regulating NDFIP1 Expression*. *Technol Cancer Res Treat*, 2017. **16**(6): p. 1160-1167.
21. Sun, L., et al., *MicroRNA-454 functions as an oncogene by regulating PTEN in uveal melanoma*. *FEBS Lett*, 2015. **589**(19 Pt B): p. 2791-6.
22. Berus, T., et al., *Clinical, Histopathological and Cytogenetic Prognosticators in Uveal Melanoma - A Comprehensive Review*. *Anticancer Res*, 2017. **37**(12): p. 6541-6549.
23. Chang, A.E., L.H. Karnell, and H.R. Menck, *The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society*. *Cancer*, 1998. **83**(8): p. 1664-78.
24. Johansson, C.C., et al., *Expression and prognostic significance of iNOS in uveal melanoma*. *Int J Cancer*, 2010. **126**(11): p. 2682-9.
25. Singh, A.D., M.E. Turell, and A.K. Topham, *Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival*. *Ophthalmology*, 2011. **118**(9): p. 1881-5.
26. Shields, C.L., et al., *Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes*. *Arch Ophthalmol*, 2009. **127**(8): p. 989-98.
27. Toktas, Z.O., et al., *Gamma knife stereotactic radiosurgery yields good long-term outcomes for low-volume uveal melanomas without intraocular complications*. *J Clin Neurosci*, 2010. **17**(4): p. 441-5.
28. Koc, I. and H. Kiratli, *Current Management of Conjunctival Melanoma Part 2: Treatment and Future Directions*. *Turk J Ophthalmol*, 2020. **50**(6): p. 362-370.
29. Wong, J.R., et al., *Management of conjunctival malignant melanoma: a review and update*. *Expert Rev Ophthalmol*, 2014. **9**(3): p. 185-204.
30. Margo, C.E., *The Collaborative Ocular Melanoma Study: an overview*. *Cancer Control*, 2004. **11**(5): p. 304-9.
31. Singh, P. and A. Singh, *Choroidal melanoma*. *Oman J Ophthalmol*, 2012. **5**(1): p. 3-9.
32. Isager, P., N. Ehlers, and J. Overgaard, *Prognostic factors for survival after enucleation for choroidal and ciliary body melanomas*. *Acta Ophthalmol Scand*, 2004. **82**(5): p. 517-25.
33. Jang, J., et al., *Multicavitary ciliary body melanoma presenting as a cyst*. *Oman J Ophthalmol*, 2013. **6**(1): p. 48-50.
34. Scott, C.T., G.N. Holland, and B.J. Glasgow, *Cavitation in ciliary body melanoma*. *Am J Ophthalmol*, 1997. **123**(2): p. 269-71.
35. Girkin, C.A., et al., *Management of iris melanoma with secondary glaucoma*. *J Glaucoma*, 2002. **11**(1): p. 71-4.
36. Zembowicz, A., R.V. Mandal, and P. Choopong, *Melanocytic lesions of the conjunctiva*. *Arch Pathol Lab Med*, 2010. **134**(12): p. 1785-92.
37. Seregard, S., *Conjunctival melanoma*. *Surv Ophthalmol*, 1998. **42**(4): p. 321-50.
38. Brownstein, S., *Malignant melanoma of the conjunctiva*. *Cancer Control*, 2004. **11**(5): p. 310-6.
39. Damato, B. and S.E. Coupland, *A reappraisal of the significance of largest basal diameter of posterior uveal melanoma*. *Eye (Lond)*, 2009. **23**(12): p. 2152-60; quiz 2161-2.
40. Augsburger, J.J. and J.W. Gamel, *Clinical prognostic factors in patients with posterior uveal malignant melanoma*. *Cancer*, 1990. **66**(7): p. 1596-600.

41. McLean, I.W., W.D. Foster, and L.E. Zimmerman, *Uveal melanoma: location, size, cell type, and enucleation as risk factors in metastasis*. Hum Pathol, 1982. **13**(2): p. 123-32.
42. Shields, C.L., et al., *Iris melanoma: features and prognosis in 317 children and adults*. J AAPOS, 2012. **16**(1): p. 10-6.
43. Prescher, G., et al., *Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma*. Lancet, 1996. **347**(9010): p. 1222-5.
44. Seddon, J.M., et al., *A prognostic factor study of disease-free interval and survival following enucleation for uveal melanoma*. Arch Ophthalmol, 1983. **101**(12): p. 1894-9.
45. Damato, B., et al., *Cytogenetics of uveal melanoma: a 7-year clinical experience*. Ophthalmology, 2007. **114**(10): p. 1925-31.
46. Kivela, T., *Iris melanomas in children*. Arch Ophthalmol, 2001. **119**(6): p. 925-6.
47. Gunduz, K., et al., *Plaque radiotherapy of uveal melanoma with predominant ciliary body involvement*. Arch Ophthalmol, 1999. **117**(2): p. 170-7.
48. Li, W., E.S. Gragoudas, and K.M. Egan, *Metastatic melanoma death rates by anatomic site after proton beam irradiation for uveal melanoma*. Arch Ophthalmol, 2000. **118**(8): p. 1066-70.
49. Rummelt, V., et al., *Relation between the microcirculation architecture and the aggressive behavior of ciliary body melanomas*. Ophthalmology, 1995. **102**(5): p. 844-51.
50. Diener-West, M., et al., *Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma: Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report No. 26*. Arch Ophthalmol, 2005. **123**(12): p. 1639-43.
51. Eskelin, S. and T. Kivela, *Mode of presentation and time to treatment of uveal melanoma in Finland*. Br J Ophthalmol, 2002. **86**(3): p. 333-8.
52. Eagle, R.C., Jr., et al., *Inadvertent evisceration of eyes containing uveal melanoma*. Arch Ophthalmol, 2009. **127**(2): p. 141-5.
53. *Factors predictive of growth and treatment of small choroidal melanoma: COMS Report No. 5. The Collaborative Ocular Melanoma Study Group*. Arch Ophthalmol, 1997. **115**(12): p. 1537-44.
54. Bedi, D.G., et al., *Sonography of the eye*. AJR Am J Roentgenol, 2006. **187**(4): p. 1061-72.
55. Chattopadhyay, C., et al., *Uveal melanoma: From diagnosis to treatment and the science in between*. Cancer, 2016. **122**(15): p. 2299-312.
56. Char, D.H. and T. Miller, *Accuracy of presumed uveal melanoma diagnosis before alternative therapy*. Br J Ophthalmol, 1995. **79**(7): p. 692-6.
57. Augsburger, J.J., Z.M. Correa, and A.H. Shaikh, *Effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma*. Am J Ophthalmol, 2009. **148**(1): p. 119-27.
58. Mariani, P., et al., *Surgical management of liver metastases from uveal melanoma: 16 years' experience at the Institut Curie*. Eur J Surg Oncol, 2009. **35**(11): p. 1192-7.
59. Shields, C.L., et al., *Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8,033 cases*. Retina, 2012. **32**(7): p. 1363-72.
60. Singh, A.D. and A. Topham, *Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973-1997*. Ophthalmology, 2003. **110**(5): p. 956-61.
61. Damato, B., *Progress in the management of patients with uveal melanoma. The 2012 Ashton Lecture*. Eye (Lond), 2012. **26**(9): p. 1157-72.

62. Damato, E.M. and B.E. Damato, *Detection and time to treatment of uveal melanoma in the United Kingdom: an evaluation of 2,384 patients*. Ophthalmology, 2012. **119**(8): p. 1582-9.
63. Andreoli, M.T., W.F. Mieler, and Y.I. Leiderman, *Epidemiological trends in uveal melanoma*. Br J Ophthalmol, 2015. **99**(11): p. 1550-3.
64. Hu, D.N., et al., *Population-based incidence of uveal melanoma in various races and ethnic groups*. Am J Ophthalmol, 2005. **140**(4): p. 612-7.
65. Hammer, H., J. Olah, and E. Toth-Molnar, *Dysplastic nevi are a risk factor for uveal melanoma*. Eur J Ophthalmol, 1996. **6**(4): p. 472-4.
66. Carbone, M., et al., *BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MBAITs*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 179.
67. van Gils, W., et al., *Gene expression profiling in uveal melanoma: two regions on 3p related to prognosis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(10): p. 4254-62.
68. Sisley, K., et al., *Abnormalities of chromosomes 3 and 8 in posterior uveal melanoma correlate with prognosis*. Genes Chromosomes Cancer, 1997. **19**(1): p. 22-8.
69. White, J.S., et al., *Molecular cytogenetic evaluation of 10 uveal melanoma cell lines*. Cancer Genet Cytogenet, 2006. **168**(1): p. 11-21.
70. Kilic, E., et al., *Concurrent loss of chromosome arm 1p and chromosome 3 predicts a decreased disease-free survival in uveal melanoma patients*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(7): p. 2253-7.
71. Mensink, H.W., et al., *Chromosome 3 intratumor heterogeneity in uveal melanoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(2): p. 500-4.
72. Abdel-Rahman, M.H., et al., *Frequency, molecular pathology and potential clinical significance of partial chromosome 3 aberrations in uveal melanoma*. Mod Pathol, 2011. **24**(7): p. 954-62.
73. Landreville, S., O.A. Agapova, and J.W. Harbour, *Emerging insights into the molecular pathogenesis of uveal melanoma*. Future Oncol, 2008. **4**(5): p. 629-36.
74. Singh, A.D., C.L. Shields, and J.A. Shields, *Prognostic factors in uveal melanoma*. Melanoma Res, 2001. **11**(3): p. 255-63.
75. McLean, M.J., W.D. Foster, and L.E. Zimmerman, *Prognostic factors in small malignant melanomas of choroid and ciliary body*. Arch Ophthalmol, 1977. **95**(1): p. 48-58.
76. Bronkhorst, I.H. and M.J. Jager, *Inflammation in uveal melanoma*. Eye (Lond), 2013. **27**(2): p. 217-23.
77. Lang, J.R., F.H. Davidorf, and N. Baba, *The prognostic significance of lymphocytic infiltration in malignant melanoma of the choroid*. Cancer, 1977. **40**(5): p. 2388-94.
78. Foss, A.J., et al., *Reassessment of the PAS patterns in uveal melanoma*. Br J Ophthalmol, 1997. **81**(3): p. 240-6; discussion 247-8.
79. Schmittl, A., et al., *Independent prognostic factors for distant metastases and survival in patients with primary uveal melanoma*. Eur J Cancer, 2004. **40**(16): p. 2389-95.
80. Sisley, K., et al., *Cytogenetic findings in six posterior uveal melanomas: involvement of chromosomes 3, 6, and 8*. Genes Chromosomes Cancer, 1990. **2**(3): p. 205-9.
81. Sisley, K., et al., *Non-random abnormalities of chromosomes 3, 6, and 8 associated with posterior uveal melanoma*. Genes Chromosomes Cancer, 1992. **5**(3): p. 197-200.

82. Rey, J.A., et al., *Cytogenetic findings in a human malignant melanoma metastatic to the brain*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1985. **16**(2): p. 179-83.
83. Scholes, A.G., et al., *Monosomy 3 in uveal melanoma: correlation with clinical and histologic predictors of survival*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003. **44**(3): p. 1008-11.
84. Hammond, D.W., et al., *High-Resolution Array CGH Analysis Identifies Regional Deletions and Amplifications of Chromosome 8 in Uveal Melanoma*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015. **56**(6): p. 3460-6.
85. Sisley, K., et al., *Multiplex fluorescence in situ hybridization identifies novel rearrangements of chromosomes 6, 15, and 18 in primary uveal melanoma*. *Exp Eye Res*, 2006. **83**(3): p. 554-9.
86. Prescher, G., et al., *Cytogenetics of twelve cases of uveal melanoma and patterns of nonrandom anomalies and isochromosome formation*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1995. **80**(1): p. 40-6.
87. Prescher, G., N. Bornfeld, and R. Becher, *Nonrandom chromosomal abnormalities in primary uveal melanoma*. *J Natl Cancer Inst*, 1990. **82**(22): p. 1765-9.
88. Horsman, D.E. and V.A. White, *Cytogenetic analysis of uveal melanoma. Consistent occurrence of monosomy 3 and trisomy 8q*. *Cancer*, 1993. **71**(3): p. 811-9.
89. Singh, A.D., et al., *Cytogenetic findings in primary uveal melanoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1994. **72**(2): p. 109-15.
90. Gordon, K.B., et al., *Comparative genomic hybridization in the detection of DNA copy number abnormalities in uveal melanoma*. *Cancer Res*, 1994. **54**(17): p. 4764-8.
91. Speicher, M.R., et al., *Chromosomal gains and losses in uveal melanomas detected by comparative genomic hybridization*. *Cancer Res*, 1994. **54**(14): p. 3817-23.
92. Naus, N.C., et al., *Characterization of complex chromosomal abnormalities in uveal melanoma by fluorescence in situ hybridization, spectral karyotyping, and comparative genomic hybridization*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001. **30**(3): p. 267-73.
93. Kilic, E., et al., *Clinical and cytogenetic analyses in uveal melanoma*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006. **47**(9): p. 3703-7.
94. Griffin, C.A., P.P. Long, and A.P. Schachar, *Trisomy 6p in an ocular melanoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1988. **32**(1): p. 129-32.
95. Horsman, D.E., et al., *Monosomy 3 and isochromosome 8q in a uveal melanoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1990. **45**(2): p. 249-53.
96. Wiltshire, R.N., et al., *Cytogenetic analysis of posterior uveal melanoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1993. **66**(1): p. 47-53.
97. McNamara, M., et al., *Assessment of chromosome 3 copy number in ocular melanoma using fluorescence in situ hybridization*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1997. **98**(1): p. 4-8.
98. Patel, K.A., et al., *Prediction of prognosis in patients with uveal melanoma using fluorescence in situ hybridisation*. *Br J Ophthalmol*, 2001. **85**(12): p. 1440-4.
99. Ghazvini, S., et al., *Comparative genomic hybridization analysis of archival formalin-fixed paraffin-embedded uveal melanomas*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1996. **90**(2): p. 95-101.
100. Aalto, Y., et al., *Concomitant loss of chromosome 3 and whole arm losses and gains of chromosome 1, 6, or 8 in metastasizing primary uveal melanoma*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001. **42**(2): p. 313-7.

101. Hughes, S., et al., *Microarray comparative genomic hybridisation analysis of intraocular uveal melanomas identifies distinctive imbalances associated with loss of chromosome 3*. Br J Cancer, 2005. **93**(10): p. 1191-6.
102. Ehlers, J.P., et al., *Integrative genomic analysis of aneuploidy in uveal melanoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(1): p. 115-22.
103. Tschentscher, F., et al., *Identification of chromosomes 3, 6, and 8 aberrations in uveal melanoma by microsatellite analysis in comparison to comparative genomic hybridization*. Cancer Genet Cytogenet, 2000. **122**(1): p. 13-7.
104. Damato, B., J.A. Dopierala, and S.E. Coupland, *Genotypic profiling of 452 choroidal melanomas with multiplex ligation-dependent probe amplification*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(24): p. 6083-92.
105. Onken, M.D., et al., *Loss of heterozygosity of chromosome 3 detected with single nucleotide polymorphisms is superior to monosomy 3 for predicting metastasis in uveal melanoma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(10): p. 2923-7.
106. Harbour, J.W., *A prognostic test to predict the risk of metastasis in uveal melanoma based on a 15-gene expression profile*. Methods Mol Biol, 2014. **1102**: p. 427-40.
107. Shoushtari, A.N. and R.D. Carvajal, *GNAQ and GNA11 mutations in uveal melanoma*. Melanoma Res, 2014. **24**(6): p. 525-34.
108. Cerami, E., et al., *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data*. Cancer Discov, 2012. **2**(5): p. 401-4.
109. Gao, J., et al., *Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal*. Sci Signal, 2013. **6**(269): p. p11.
110. Cancer Genome Atlas, N., *Genomic Classification of Cutaneous Melanoma*. Cell, 2015. **161**(7): p. 1681-96.
111. Onken, M.D., et al., *Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(12): p. 5230-4.
112. Van Raamsdonk, C.D., et al., *Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi*. Nature, 2009. **457**(7229): p. 599-602.
113. Van Raamsdonk, C.D., et al., *Mutations in GNA11 in uveal melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(23): p. 2191-9.
114. Sisley, K., R. Doherty, and N.A. Cross, *What hope for the future? GNAQ and uveal melanoma*. Br J Ophthalmol, 2011. **95**(5): p. 620-3.
115. Bakhoun, M.F. and B. Esmaeli, *Molecular Characteristics of Uveal Melanoma: Insights from the Cancer Genome Atlas (TCGA) Project*. Cancers (Basel), 2019. **11**(8).
116. Vader, M.J.C., et al., *GNAQ and GNA11 mutations and downstream YAP activation in choroidal nevi*. Br J Cancer, 2017. **117**(6): p. 884-887.
117. Moller, I., et al., *Activating cysteinyl leukotriene receptor 2 (CYSLTR2) mutations in blue nevi*. Mod Pathol, 2017. **30**(3): p. 350-356.
118. Doherty, R.E., et al., *Genetics of Uveal Melanoma*, in *Noncutaneous Melanoma*, J.F. Scott and M.R. Gerstenblith, Editors. 2018: Brisbane (AU).
119. Bauer, J., et al., *Oncogenic GNAQ mutations are not correlated with disease-free survival in uveal melanoma*. Br J Cancer, 2009. **101**(5): p. 813-5.
120. Abdel-Rahman, M.H., et al., *Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers*. J Med Genet, 2011. **48**(12): p. 856-9.
121. Testa, J.R., et al., *Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma*. Nat Genet, 2011. **43**(10): p. 1022-5.

122. Popova, T., et al., *Germline BAP1 mutations predispose to renal cell carcinomas*. Am J Hum Genet, 2013. **92**(6): p. 974-80.
123. Furney, S.J., et al., *SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma*. Cancer Discov, 2013. **3**(10): p. 1122-1129.
124. Martin, M., et al., *Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3*. Nat Genet, 2013. **45**(8): p. 933-6.
125. Harbour, J.W., et al., *Recurrent mutations at codon 625 of the splicing factor SF3B1 in uveal melanoma*. Nat Genet, 2013. **45**(2): p. 133-5.
126. Alsafadi, S., et al., *Cancer-associated SF3B1 mutations affect alternative splicing by promoting alternative branchpoint usage*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10615.
127. Lopez-Serra, P. and M. Esteller, *DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer*. Oncogene, 2012. **31**(13): p. 1609-22.
128. Fabbri, M., et al., *Epigenetic regulation of miRNAs in cancer*. Adv Exp Med Biol, 2013. **754**: p. 137-48.
129. Fu, L.L., et al., *Identification of microRNA-regulated autophagic pathways in plant lectin-induced cancer cell death*. Cell Prolif, 2012. **45**(5): p. 477-85.
130. Wang, Z., et al., *MicroRNA-210 promotes proliferation and invasion of peripheral nerve sheath tumor cells targeting EFNA3*. Oncol Res, 2013. **21**(3): p. 145-54.
131. Yan, D., et al., *MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(4): p. 1559-65.
132. Chen, X., et al., *Epigenetics, microRNAs, and carcinogenesis: functional role of microRNA-137 in uveal melanoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(3): p. 1193-9.
133. Venkatesan, N., et al., *Clinico-Pathological Association of Delineated miRNAs in Uveal Melanoma with Monosomy 3/Disomy 3 Chromosomal Aberrations*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0146128.
134. Madhunapantula, S.V., et al., *Identification of glycogen synthase kinase 3alpha as a therapeutic target in melanoma*. Pigment Cell Melanoma Res, 2013. **26**(6): p. 886-99.
135. Liu, C.J., et al., *miR-134 induces oncogenicity and metastasis in head and neck carcinoma through targeting WWOX gene*. Int J Cancer, 2014. **134**(4): p. 811-21.
136. Yang, H., et al., *MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN*. Cancer Res, 2008. **68**(2): p. 425-33.
137. Xu, C.X., et al., *MicroRNA MiR-214 regulates ovarian cancer cell stemness by targeting p53/Nanog*. J Biol Chem, 2016. **291**(43): p. 22851.
138. Dror, R., et al., *Characterizing the involvement of the nuclear factor-kappa B (NF kappa B) transcription factor in uveal melanoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(4): p. 1811-6.
139. Mi, S., et al., *MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(50): p. 19971-6.
140. Danda, R., et al., *Targeted expression of suicide gene by tissue-specific promoter and microRNA regulation for cancer gene therapy*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83398.
141. Venza, M., et al., *Identification of microRNA expression patterns in cutaneous and uveal melanoma cell lines*. Tumori, 2014. **100**(1): p. e4-7.

142. Zhou, Y., et al., *Let-7b overexpression leads to increased radiosensitivity of uveal melanoma cells*. *Melanoma Res*, 2015. **25**(2): p. 119-26.
143. Dong, F. and D. Lou, *MicroRNA-34b/c suppresses uveal melanoma cell proliferation and migration through multiple targets*. *Mol Vis*, 2012. **18**: p. 537-46.
144. Yan, D., et al., *Role of microRNA-182 in posterior uveal melanoma: regulation of tumor development through MITF, BCL2 and cyclin D2*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e40967.
145. Botti, G., et al., *LncRNA HOTAIR as Prognostic Circulating Marker and Potential Therapeutic Target in Patients with Tumor Diseases*. *Curr Drug Targets*, 2017. **18**(1): p. 27-34.
146. Liu, Q., et al., *LncRNA loc285194 is a p53-regulated tumor suppressor*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(9): p. 4976-87.
147. Im, J.H. and R.J. Muschel, *New evidence of lncRNA role in tumor progression and metastasis*. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2012. **1**(1): p. 55-6.
148. Zhang, H., et al., *Long noncoding RNA-mediated intrachromosomal interactions promote imprinting at the Kcnq1 locus*. *J Cell Biol*, 2014. **204**(1): p. 61-75.
149. Lessard, L., et al., *The CASC15 Long Intergenic Noncoding RNA Locus Is Involved in Melanoma Progression and Phenotype Switching*. *J Invest Dermatol*, 2015. **135**(10): p. 2464-2474.
150. Weisenberger, D.J., et al., *CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer*. *Nat Genet*, 2006. **38**(7): p. 787-93.
151. Straume, O., et al., *Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase*. *Am J Pathol*, 2002. **161**(1): p. 229-37.
152. Straume, O., L. Sviland, and L.A. Akslen, *Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(5): p. 1845-53.
153. Draetta, G.F., *Mammalian G1 cyclins*. *Curr Opin Cell Biol*, 1994. **6**(6): p. 842-6.
154. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. *Nature*, 1993. **366**(6456): p. 704-7.
155. Sharpless, N.E. and R.A. DePinho, *The INK4A/ARF locus and its two gene products*. *Curr Opin Genet Dev*, 1999. **9**(1): p. 22-30.
156. Harland, M., et al., *Germline mutations of the CDKN2 gene in UK melanoma families*. *Hum Mol Genet*, 1997. **6**(12): p. 2061-7.
157. Hughes-Davies, T.H., *CDKN2A mutations in multiple primary melanomas*. *N Engl J Med*, 1998. **339**(5): p. 347-8.
158. Baylin, S.B. and J.G. Herman, *DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics*. *Trends Genet*, 2000. **16**(4): p. 168-74.
159. Pfeifer, G.P., et al., *Methylation of the RASSF1A gene in human cancers*. *Biol Chem*, 2002. **383**(6): p. 907-14.
160. Agathangelou, A., W.N. Cooper, and F. Latif, *Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers*. *Cancer Res*, 2005. **65**(9): p. 3497-508.
161. Spugnardi, M., et al., *Epigenetic inactivation of RAS association domain family protein 1 (RASSF1A) in malignant cutaneous melanoma*. *Cancer Res*, 2003. **63**(7): p. 1639-43.

162. Maat, W., et al., *Epigenetic inactivation of RASSF1a in uveal melanoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(2): p. 486-90.
163. Dratviman-Storobinsky, O., et al., *The role of RASSF1A in uveal melanoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(6): p. 2611-9.
164. Shivakumar, L., et al., *The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(12): p. 4309-18.
165. Vos, M.D., et al., *A role for the RASSF1A tumor suppressor in the regulation of tubulin polymerization and genomic stability*. Cancer Res, 2004. **64**(12): p. 4244-50.
166. Calipel, A., et al., *Status of RASSF1A in uveal melanocytes and melanoma cells*. Mol Cancer Res, 2011. **9**(9): p. 1187-98.
167. Voelter, V., et al., *Infrequent promoter methylation of the MGMT gene in liver metastases from uveal melanoma*. Int J Cancer, 2008. **123**(5): p. 1215-8.
168. Venza, M., et al., *Impact of DNA methyltransferases on the epigenetic regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in malignant melanoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **441**(4): p. 743-50.
169. Venza, M., et al., *Role of Genetics and Epigenetics in Mucosal, Uveal, and Cutaneous Melanomagenesis*. Anticancer Agents Med Chem, 2016. **16**(5): p. 528-38.
170. van der Velden, P.A., et al., *Promoter hypermethylation: a common cause of reduced p16(INK4a) expression in uveal melanoma*. Cancer Res, 2001. **61**(13): p. 5303-6.
171. van den Bosch, T., et al., *Chemokine receptor CCR7 expression predicts poor outcome in uveal melanoma and relates to liver metastasis whereas expression of CXCR4 is not of clinical relevance*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(12): p. 7354-61.
172. Sweetser, D.A., et al., *Delineation of the minimal commonly deleted segment and identification of candidate tumor-suppressor genes in del(9q) acute myeloid leukemia*. Genes Chromosomes Cancer, 2005. **44**(3): p. 279-91.
173. Shintani, M., et al., *Characterization of Rab45/RASEF containing EF-hand domain and a coiled-coil motif as a self-associating GTPase*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **357**(3): p. 661-7.
174. Maat, W., et al., *Epigenetic regulation identifies RASEF as a tumor-suppressor gene in uveal melanoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(4): p. 1291-8.
175. Field, M.G., et al., *PRAME as an Independent Biomarker for Metastasis in Uveal Melanoma*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(5): p. 1234-42.
176. Field, M.G., et al., *Epigenetic reprogramming and aberrant expression of PRAME are associated with increased metastatic risk in Class 1 and Class 2 uveal melanomas*. Oncotarget, 2016. **7**(37): p. 59209-59219.
177. Li, B., M. Carey, and J.L. Workman, *The role of chromatin during transcription*. Cell, 2007. **128**(4): p. 707-19.
178. Rosenfeld, J.A., et al., *Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 143.
179. Li, Y., R. Jia, and S. Ge, *Role of Epigenetics in Uveal Melanoma*. Int J Biol Sci, 2017. **13**(4): p. 426-433.
180. Gilissen, C., et al., *Unlocking Mendelian disease using exome sequencing*. Genome Biol, 2011. **12**(9): p. 228.

181. Manschot, W.A., W.R. Lee, and R. van Strik, *Uveal melanoma: updated considerations on current management modalities*. Int Ophthalmol, 1995. **19**(4): p. 203-9.
182. Bakalian, S., et al., *Molecular pathways mediating liver metastasis in patients with uveal melanoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(4): p. 951-6.
183. Eskelin, S., et al., *A prognostic model and staging for metastatic uveal melanoma*. Cancer, 2003. **97**(2): p. 465-75.
184. Donoso, L.A., et al., *Metastatic uveal melanoma: diffuse hepatic metastasis in a patient with concurrent normal serum liver enzyme levels and liver scan*. Arch Ophthalmol, 1985. **103**(6): p. 758.
185. Eskelin, S., et al., *Screening for metastatic malignant melanoma of the uvea revisited*. Cancer, 1999. **85**(5): p. 1151-9.
186. Mouriaux, F., et al., *Liver function testing is not helpful for early diagnosis of metastatic uveal melanoma*. Ophthalmology, 2012. **119**(8): p. 1590-5.
187. Zhang, B., et al., *microRNAs as oncogenes and tumor suppressors*. Dev Biol, 2007. **302**(1): p. 1-12.
188. Aughton, K., H. Kalirai, and S.E. Coupland, *MicroRNAs and Uveal Melanoma: Understanding the Diverse Role of These Small Molecular Regulators*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(16).
189. Catalanotto, C., C. Cogoni, and G. Zardo, *MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(10).
190. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(7): p. 522-31.
191. Kim, V.N., *Small RNAs: classification, biogenesis, and function*. Mol Cells, 2005. **19**(1): p. 1-15.
192. Pillai, R.S., *MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?* RNA, 2005. **11**(12): p. 1753-61.
193. Erson, A.E. and E.M. Petty, *miRNAs and cancer: New research developments and potential clinical applications*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(24): p. 2317-22.
194. Melamed, Z., et al., *Alternative splicing regulates biogenesis of miRNAs located across exon-intron junctions*. Mol Cell, 2013. **50**(6): p. 869-81.
195. Ul Hussain, M., *Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action*. Cell Tissue Res, 2012. **349**(2): p. 405-13.
196. Tsuchiya, S., Y. Okuno, and G. Tsujimoto, *MicroRNA: biogenetic and functional mechanisms and involvements in cell differentiation and cancer*. J Pharmacol Sci, 2006. **101**(4): p. 267-70.
197. Ahmed, F.E., *Role of miRNA in carcinogenesis and biomarker selection: a methodological view*. Expert Rev Mol Diagn, 2007. **7**(5): p. 569-603.
198. Iwakawa, H.O. and Y. Tomari, *The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(11): p. 651-665.
199. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
200. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
201. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 86-9.
202. Ambros, V., et al., *A uniform system for microRNA annotation*. RNA, 2003. **9**(3): p. 277-9.

203. Kim, V.N., *MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(5): p. 376-85.
204. Lagos-Quintana, M., et al., *New microRNAs from mouse and human*. RNA, 2003. **9**(2): p. 175-9.
205. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome Res, 2004. **14**(10A): p. 1902-10.
206. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
207. Winter, J., et al., *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(3): p. 228-34.
208. Macfarlane, L.A. and P.R. Murphy, *MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer*. Curr Genomics, 2010. **11**(7): p. 537-61.
209. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-5.
210. Du, T. and P.D. Zamore, *microPrimer: the biogenesis and function of microRNA*. Development, 2005. **132**(21): p. 4645-52.
211. Gregory, R.I., et al., *The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 235-40.
212. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
213. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. Science, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
214. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
215. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4663-70.
216. Peng, Y. and C.M. Croce, *The role of MicroRNAs in human cancer*. Signal Transduct Target Ther, 2016. **1**: p. 15004.
217. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
218. Liu, X., K. Fortin, and Z. Mourelatos, *MicroRNAs: biogenesis and molecular functions*. Brain Pathol, 2008. **18**(1): p. 113-21.
219. Han, J. and H. Isoda, *Capsaicin induced the upregulation of transcriptional and translational expression of glycolytic enzymes related to energy metabolism in human intestinal epithelial cells*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(23): p. 11148-53.
220. Kawamata, T. and Y. Tomari, *Making RISC*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(7): p. 368-76.
221. Matranga, C., et al., *Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes*. Cell, 2005. **123**(4): p. 607-20.
222. Rand, T.A., et al., *Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation*. Cell, 2005. **123**(4): p. 621-9.
223. Curtale, G. and F. Citarella, *Dynamic nature of noncoding RNA regulation of adaptive immune response*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(9): p. 17347-77.
224. Lin, S.L., H. Kim, and S.Y. Ying, *Intron-mediated RNA interference and microRNA (miRNA)*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 2216-30.
225. Grimson, A., et al., *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 91-105.
226. Sun, W., et al., *microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems*. Annu Rev Biomed Eng, 2010. **12**: p. 1-27.

227. He, H., et al., *The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(52): p. 19075-80.
228. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7065-70.
229. Michael, M.Z., et al., *Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(12): p. 882-91.
230. Takamizawa, J., et al., *Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3753-6.
231. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
232. Calin, G.A., et al., *MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(32): p. 11755-60.
233. Metzler, M., et al., *High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2004. **39**(2): p. 167-9.
234. Ota, A., et al., *Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma*. Cancer Res, 2004. **64**(9): p. 3087-95.
235. Eis, P.S., et al., *Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(10): p. 3627-32.
236. Tagawa, H. and M. Seto, *A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma*. Leukemia, 2005. **19**(11): p. 2013-6.
237. Jiang, J., E.J. Lee, and T.D. Schmittgen, *Increased expression of microRNA-155 in Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid cell lines*. Genes Chromosomes Cancer, 2006. **45**(1): p. 103-6.
238. Costinean, S., et al., *Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 7024-9.
239. Chan, J.A., A.M. Krichevsky, and K.S. Kosik, *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6029-33.
240. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
241. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2257-61.
242. Bandres, E., et al., *Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 29.
243. Murakami, Y., et al., *Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues*. Oncogene, 2006. **25**(17): p. 2537-45.
244. Pallante, P., et al., *MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(2): p. 497-508.
245. Mattie, M.D., et al., *Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 24.
246. Liu, C.G., et al., *An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9740-4.

247. Hammond, S.M., *microRNA detection comes of age*. Nat Methods, 2006. **3**(1): p. 12-3.
248. Volinia, S., et al., *Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(8): p. 3024-9.
249. Lagana, A., et al., *Variability in the incidence of miRNAs and genes in fragile sites and the role of repeats and CpG islands in the distribution of genetic material*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11166.
250. Lamy, P., et al., *Are microRNAs located in genomic regions associated with cancer?* Br J Cancer, 2006. **95**(10): p. 1415-8.
251. Wynendaele, J., et al., *An illegitimate microRNA target site within the 3' UTR of MDM4 affects ovarian cancer progression and chemosensitivity*. Cancer Res, 2010. **70**(23): p. 9641-9.
252. Mishra, P.J., et al., *MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics*. Cell Cycle, 2008. **7**(7): p. 853-8.
253. Brueckner, B., et al., *The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function*. Cancer Res, 2007. **67**(4): p. 1419-23.
254. Lehmann, U., et al., *Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer*. J Pathol, 2008. **214**(1): p. 17-24.
255. Nadal, E., et al., *Epigenetic inactivation of microRNA-34b/c predicts poor disease-free survival in early-stage lung adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(24): p. 6842-52.
256. Saito, Y., et al., *Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells*. Cancer Cell, 2006. **9**(6): p. 435-43.
257. Lujambio, A., et al., *A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13556-61.
258. Oszlak, F., et al., *Chromatin structure analyses identify miRNA promoters*. Genes Dev, 2008. **22**(22): p. 3172-83.
259. Ruegger, S. and H. Grosshans, *MicroRNA turnover: when, how, and why*. Trends Biochem Sci, 2012. **37**(10): p. 436-46.
260. Cowland, J.B., C. Hother, and K. Gronbaek, *MicroRNAs and cancer*. APMIS, 2007. **115**(10): p. 1090-106.
261. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
262. Sevli, S., et al., *The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2010. **13**(3): p. 208-17.
263. Hayashita, Y., et al., *A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation*. Cancer Res, 2005. **65**(21): p. 9628-32.
264. Johnson, S.M., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. Cell, 2005. **120**(5): p. 635-47.
265. Lee, Y.S. and A. Dutta, *The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene*. Genes Dev, 2007. **21**(9): p. 1025-30.
266. Sampson, V.B., et al., *MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells*. Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 9762-70.

267. Calin, G.A., et al., *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2005. **353**(17): p. 1793-801.
268. Lin, P.Y., S.L. Yu, and P.C. Yang, *MicroRNA in lung cancer*. Br J Cancer, 2010. **103**(8): p. 1144-8.
269. Garzon, R., et al., *MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia*. Blood, 2008. **111**(6): p. 3183-9.
270. Mott, J.L., et al., *mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis*. Oncogene, 2007. **26**(42): p. 6133-40.
271. Bruchova, H., M. Merkerova, and J.T. Prchal, *Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera*. Haematologica, 2008. **93**(7): p. 1009-16.
272. Lui, W.O., et al., *Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(13): p. 6031-43.
273. Slaby, O., et al., *Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer*. Oncology, 2007. **72**(5-6): p. 397-402.
274. Lin, T., et al., *MicroRNA-143 as a tumor suppressor for bladder cancer*. J Urol, 2009. **181**(3): p. 1372-80.
275. Amaral, F.C., et al., *MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(1): p. 320-3.
276. Tam, W., D. Ben-Yehuda, and W.S. Hayward, *bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(3): p. 1490-502.
277. Kluiver, J., et al., *BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas*. J Pathol, 2005. **207**(2): p. 243-9.
278. Gironella, M., et al., *Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(41): p. 16170-5.
279. Ciafre, S.A., et al., *Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **334**(4): p. 1351-8.
280. Meng, F., et al., *MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer*. Gastroenterology, 2007. **133**(2): p. 647-58.
281. He, L., et al., *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 828-33.
282. Mendell, J.T., *miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease*. Cell, 2008. **133**(2): p. 217-22.
283. Eedunuri, V.K., et al., *miR-137 Targets p160 Steroid Receptor Coactivators SRC1, SRC2, and SRC3 and Inhibits Cell Proliferation*. Mol Endocrinol, 2015. **29**(8): p. 1170-83.
284. Li, Y., et al., *MicroRNA 145 may play an important role in uveal melanoma cell growth by potentially targeting insulin receptor substrate-1*. Chin Med J (Engl), 2014. **127**(8): p. 1410-6.
285. Sun, L., et al., *MiR-144 Inhibits Uveal Melanoma Cell Proliferation and Invasion by Regulating c-Met Expression*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0124428.
286. Venza, M., et al., *miR-92a-3p and MYCBP2 are involved in MS-275-induced and c-myc-mediated TRAIL-sensitivity in melanoma cells*. Int Immunopharmacol, 2016. **40**: p. 235-243.

287. Wang, X., et al., *Coordinated targeting of MMP-2/MMP-9 by miR-296-3p/FOXCUT exerts tumor-suppressing effects in choroidal malignant melanoma*. Mol Cell Biochem, 2018. **445**(1-2): p. 25-33.
288. Zhou, J., et al., *Oncogenic role of microRNA20a in human uveal melanoma*. Mol Med Rep, 2016. **14**(2): p. 1560-6.
289. Ling, J.W., et al., *miR-367 promotes uveal melanoma cell proliferation and migration by regulating PTEN*. Genet Mol Res, 2017. **16**(3).
290. Li, J., et al., *miR-224-5p inhibits proliferation, migration, and invasion by targeting PIK3R3/AKT3 in uveal melanoma*. J Cell Biochem, 2019. **120**(8): p. 12412-12421.
291. Wang, Y.C., et al., *Role of microRNA-21 in uveal melanoma cell invasion and metastasis by regulating p53 and its downstream protein*. Int J Ophthalmol, 2018. **11**(8): p. 1258-1268.
292. Wang, Y., et al., *Role of miR-23a/Zeb1 negative feedback loop in regulating epithelial-mesenchymal transition and tumorigenicity of intraocular tumors*. Oncol Lett, 2018. **16**(2): p. 2462-2470.
293. Mehmet Küçüköner, Abdurrahman Işıkdoğan. *Kanser tedavisinde mTOR sinyal yolağı ve mTOR inhibitörleri*. Diclemedj. 2013. 40 (1): 156-160.
294. A. Lale Doğan, Dicle Güç. *Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser*. Hacettepe Tıp Dergisi, 2004. 35:34-42.

HAM VERİLER



FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU:

Bu bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu İ.Ü. Onkoloji Enstitüsüne başvuran Uveal Malign Melanom tanısına sahip hasta bireyler ile kontrol grubu sağlıklı bireylerde **“UVEAL MALİGN MELANOMLU HASTALARIN PERİFERİK DOLAŞIMINDA MİRNA’LARIN ARAŞTIRILMASI”** isimli doktora tez çalışmasına davet etmek üzere hazırlanmıştır.

Çalışmanın Adı: UVEAL MALİGN MELANOMLU HASTALARIN PERİFERİK DOLAŞIMINDA MİRNA’LARIN ARAŞTIRILMASI”

Tez Öğrencisi: Msc. Bio. Masoumeh Hassani

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Hülya YAZICI

Araştırmayı Yürütecek Kuruluşun Adı: İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji ABD

Destekleyici Kuruluş: İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi I

ARAŞTIRMA HAKKINDA BİLGİ:

Giriş:

“UVEAL MALİGN MELANOMLU HASTALARIN PERİFERİK DOLAŞIMINDA MİRNA’LARIN ARAŞTIRILMASI” adını verdiğimiz çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla ve nasıl yapılacağını anlamanız ve katılıp katılmama doğrultusundaki kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Araştırma hakkında sözlü olarak size aktaracağım bilgiler yazılı olarak da size bir sonraki bölümde sunulacaktır. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz. Bu belgedeki son bölüm onay işlemleri ile ilgilidir. Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz lütfen bu bölümü imzalayınız. Okuma ve yazma konusunda engelleriniz olduğu takdirde bir tanığın gözetiminde bu belgeyi onaylamanız istenecek ve gerektiğinde parmak iziniz alınacaktır.

Çalışmanın Amacı: Planlanan tez çalışmasında, bölümümüzde daha önce incelenmiş ve Uveal Malign Melanom hastalarda, literatürde incelenmiş ve tanı ve tedavi izlemi için önemli olduğunu düşündüğümüz miRNA’lardan miR-181b, miR-155, miR-454’ün ifade düzeylerini 72 kanserli hasta ve 72 sağlıklı kontrol grubunun periferik kan dolaşımında inceleyerek validasyonlarının yapılması amaçlanmaktadır. Çalışmanın sonunda elde edilen bulgulara göre söz konusu 3 miRNA’nın uveal malign melanom kanserli hastaların tanısında, hastalığın gidişatı konusunda ve akıllı ilaç hedefi

olabileceği incelenecek ve bir biyobelirteci olarak kullanılıp kullanılamayacağı ortaya koyulacaktır.

Çalışmanın İçeriği: Çalışma grubumuz 72 uveal malign melanomlu hasta ve hasta popülasyonu ile yaş ve cinsiyet olarak eşleştirilmiş 72 sağlıklı kişiden oluşturulacaktır. miR-181b, miR-155, miR454'ün gen ifade düzeyleri hasta ve sağlıklı kişilerin periferik kan dolaşımında araştırılacaktır. Alınan örneklerden RNA izole edilecektir. Elde edilen RNA'lerden özel primerler aracılığı ile cDNA sentezi gerçekleştirilecektir. Sentezlenen özel cDNA'ların, istediğimiz gene özgü primerle ve bir kontrol gen varlığında gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile gen ifade düzeyleri değerlendirilecektir.

Çalışmanın Başlama Tarihi ve Süresi: Çalışmanın 12 kasım 2019 başlaması ve 18 ay sürmesi öngörülmektedir. Gönüllünün Haklarıyla İlgili Bilgi Bu çalışmaya gönüllü olmaya karar vererseniz bu gönüllü bilgilendirilmiş onay formunu imzalamanız gerekecektir. Sadece kendi rızanız ile hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, tedaviniz esnasında doktor kontrolünde alınacak 10 cc.'lik kan örneğiniz ile bu bilimsel çalışmaya katılmış olacaksınız. Kan alma sırasında kan alınan bölgede acı, morarma, kanama ya da diğer rahatsızlıklar meydana gelebilir, fakat bu güçlüklerin en aza indirilmesi için önlemler alınacaktır. Sizden ayrıca araştırmaya yardımcı olacak bazı kişisel bilgileriniz (yaş, meslek, sigara kullanımı vs.) istenebilir. Etik kurullar inceleme amacıyla medikal kayıtlardaki medikal kişisel bilgilerinize ve bu çalışmadan elde edilen bilgilere erişebilirler. Medikal bilgilerinize erişim çalışma için toplanan bilgilerle sınırlı olacaktır. Bu çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılarda veya yayınlarda sunulabilir, ancak bu sunumlarda kimliğiniz açıklanmayacaktır. Ayrıca sizden araştırmayla ilgili olarak herhangi bir maddi talepte bulunulmayacak ve size de herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Ayrıca bu araştırmaya karar verdiğiniz takdirde ileriye dönük olarak hastalığınız hakkında elde edilecek bilgilerle bilim dünyasına konuyla ilgili olarak önemli derecede katkı sağlayacağınız kesindir.

Bu çalışmanın 144 gönüllü ile gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. Gönüllü olmaya karar verdiğiniz ve bu bilgilendirilmiş gönüllü onay ve rıza formunu imzaladığınız takdirde yukarıda yazılanları okuyup kabul ettiğinizi ve hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın ailenizin bilgisi dahilinde sadece kendi rızanız ile karar verdiğinizi onaylamış olacaksınız. Herhangi bir soru ya da sorunuz olduğu takdirde ilgili **Masoumeh Hassani** 0212 414 24 34 / 34186 no'lu telefondan ulaşabilirsiniz.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU:

İmza ve ulaşım bilgileri Gönüllüye (hastaya) araştırmadan önce verilmesi gereken bilgiler tarafıma sözlü ve yazılı olarak aktarıldı. Bu koşullarda söz konusu çalışmaya kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Çalışma için alınan materyalimin ilerideki çalışmalarda da kullanılmasını

EVET ☐ kabul ediyorum.

HAYIR ☐ kabul etmiyorum.

Hastanın/Katılımcının:

Adı Soyadı:

Telefonu:

Adresi:

İmza:

Açıklamaları Yapan Doktorun:

Adı Soyadı:

Telefonu:

Adresi:

İmza:

Tanıklık Eden Görevlinin:

Adı Soyadı:

Telefonu:

Adresi:

İmza:

ETİK KURUL KARARI





PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

UVEAL MALİGN MELANOMLU HASTALARIN PERİFERİK DOLAŞIMINDA MİRNA'LARIN ARAŞTIRILMASI-2

ORJİNALLİK RAPORU

% 14	% 11	% 5	% 6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 3
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 2
3	tkb.dergisi.org İnternet Kaynağı	% 2
4	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	ijbs.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.uskudar.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	Yi Fan Li, Li Dong, Yang Li, Wen Bin Wei. "	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

