



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**KÖPEK MEME KANSERİ ile p27 TÜMÖR SÜPRESÖR GENİ
POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ**

GİZEM ATMACA

**DANIŞMAN
Prof. Dr. İRAZ AKIŞ AKAD**

Biyokimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Eylül, 2022

TEZ KABUL VE ONAYI

Gizem ATMACA tarafından, **Prof. Dr. Iraz AKIŞ AKAD** danışmanlığında hazırlanan "**KÖPEK MEME KANSERİ ile P27 TÜMÖR SÜPRESÖR GENİ POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ**" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **28/09/2022** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi		İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Iraz AKIŞ AKAD		☒ Kabul
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Biyokimya Anabilim Dalı		☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Hasret YARDİBİ		☒ Kabul
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Biyokimya Anabilim Dalı		☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Ahmet GÜLÇUBUK		☒ Kabul
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Patoloji Anabilim Dalı		☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ		☒ Kabul
	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı		☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Duygu UDUM		☒ Kabul
	Bursa Uludağ Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı		☐ Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Gizem ATMACA

(İmza)

Babam Hüseyin ATMACA'ya ve hocam Prof.Dr. Kemal Özdem ÖZTABAK'a
ithaf ediyorum...

BÜTÇE DESTEKLERİ

KÖPEK MEME KANSERİ ile p27 TÜMÖR SÜPRESÖR GENİ POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TDK-2018-30047

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin tüm aşamasında, birlikte çalışabildiğimiz süre zarfında asistanı olmaktan gurur duyduğum, sadece bilgi ve tecrübelerinden değil insanlığından da çok şey öğrendiğim ilk danışman hocam Prof.Dr. Kemal Özdem ÖZTABAK'a,

Tezimin hazırlanmasının her aşamasında tüm bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, akademik hayatımda bana yeni ufuklar açan, tez danışman hocam Prof.Dr. İraz AKIŞ AKAD'a,

Tez çalışmam boyunca büyük desteklerini gördüğüm başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Feraye ESEN GÜRSEL olmak üzere, Prof.Dr. Ayşen ALTINER, Prof.Dr. Nezir Yaşar TOKER, Prof.Dr. Hasret YARDİBİ, Doç.Dr. Atila ATEŞ, Arş.Gör. İsmail Bergutay KALAYCILAR ve Dina BEDİK'e

Çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Ahmet GÜLÇUBUK, Doç.Dr. Funda YILDIRIM, Doç.Dr. Sinem Özlem ENGİNLER, Dr. Ali Can ÇETİN'e,

Tezimin redaksiyon aşamasında fikrini aldığım ve varlığıyla her daim yanımda olan Gökhan KIRMIZIOĞLU'na,

Doktora sürecim boyunca dostluklarıyla hep destek olan Volkan KIRMIZIOĞLU, Umut GENÇ, Dr.Özge AYDIN, Ersan ve Gamze DAĞLI'ya

Eğitim hayatım boyunca yanımda olan annem Nurten ATMACA, abim Naci ATMACA, ablam Kübra ATMACA, biricik yeğenim Kuzey Hüseyin ATMACA, halalarım Kerime ve Saliha ATMACA'ya teşekkür ederim.

Eylül 2022

GİZEM ATMACA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	4
2.1. KANSERİN TARİHÇESİ	4
2.2. KANSER BİYOLOJİSİ ve GENETİĞİ	6
2.3. HÜCRE BÖLÜNMESİ.....	7
2.3.1. Hücrenin Kontrol Noktaları	10
2.3.1.1. G1/S Kontrol Noktası	10
2.3.1.2. G2/M Kontrol Noktası	11
2.3.1.3. M Kontrol Noktası (Metafaz- Anafaz Geçişi)	11
2.3.2. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi.....	11
2.3.2.1. Siklinler, Siklin Bağımlı Kinaz Ve Siklin Bağımlı Kinaz Inhibitörleri	12
2.3.3. Hücre Siklusu Kontrol Noktaları, Büyüme Faktörleri ve D Tip Siklinlerin Kanser ile İlişkisi	14
2.4. KARSİNOGENEZ.....	16
2.4.1. Onkogenler	16
2.4.2. Tümör Süpresör Genler	17
2.5. KÖPEKLERDE MEME BEZİ MORFOLOJİSİ	19
2.6. KÖPEK MEME TÜMÖRÜ PATOLOJİSİ.....	19

2.7. KMT'lerin KLİNİK BELİRTİSİ ve TANISI	22
2.7.1. Sitolojik Muayene	23
2.7.2. Histopatolojik Değerlendirme	24
2.8. KMT'lerde TEDAVİ	24
2.9. KÖPEK MEME TÜMÖRÜNÜN MODEL OLARAK KULLANILMASI	25
2.10. KÖPEKLERDE MEME TÜMÖRÜ ETİYOLOJİSİ	26
2.10.1. Yaş	26
2.10.2. Irk ve Genetik Faktör	27
2.10.3. Beslenme	29
2.10.4. Hormonlar ve Büyüme Faktörleri	29
2.10.5. Meme Tümörüne Yatkınlık Oluşturabilecek Aday Genler	31
2.11. P27 Kip1	31
2.11.1. Tümör Süpresör Gen Olarak p27	33
2.12. P27 ve MEME TÜMÖRÜ	33
3. YÖNTEM	36
3.1. HAYVAN MATERYALİ ve DNA ÖRNEKLERİ	36
3.2. HASTA ve KONTROL GRUBU OLGULARININ SEÇİLMESİ	40
3.3. LABORATUVAR YÖNTEMLERİ	40
3.3.1. DNA İzolasyonu	40
3.3.2. Sitolojik yöntem	41
3.3.3. Histopatolojik Yöntem	41
3.3.4. Mikroskopik değerlendirme yöntemi	41
3.4. KULLANILAN CİHAZLAR	41
3.5. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	42
3.6. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)	42
3.6.1. Primer Tasarımı	43
3.6.2. Primer Solüsyonunun Hazırlanması	44
3.6.3. dNTP Solüsyonunun Hazırlanması	44
3.7. PZR OPTİMİZASYONU	44
3.8. PZR BİLEŞENLERİ ve ŞARTLARI	44
3.9. AGAROS JEL ELEKTROFOREZİ	45
3.10. DNA DİZİLEME İŞLEMLERİ	45
3.11. DNA DİZİ ANALİZİ	46
3.12. İSTATİSTİKİ ANALİZ	46

4. BULGULAR	48
4.1. <i>p27</i> GENİNDE BELİRLENEN TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİ.....	48
4.2. <i>p27</i> GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE 27:33916135 POZİSYONUNDA BULUNAN A/C POLİMORFİZMİ.....	48
4.3. <i>p27</i> GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE 27:33915991 POZİSYONUNDA BULUNAN A/G POLİMORFİZMİ.....	49
4.4. <i>p27</i> GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE 27:33915866 POZİSYONUNDA BULUNAN A/G POLİMORFİZMİ.....	50
4.5. <i>p27</i> GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE 27:33915855 POZİSYONUNDA BULUNAN A/G POLİMORFİZMİ.....	51
4.6. <i>p27</i> GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE 27:33915802 POZİSYONUNDA BULUNAN A/G POLİMORFİZMİ.....	51
4.7. <i>p27</i> GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE 27:33915723 POZİSYONUNDA BULUNAN A/G POLİMORFİZMİ.....	53
4.8. <i>p27</i> GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE 27:33915693 POZİSYONUNDA BULUNAN A/C POLİMORFİZMİ.....	54
5. TARTIŞMA.....	57
5.1. KÖPEKLERDE KALITSAL MEME KANSERİNDE ETKİLİ GERM HATTI MUTASYONLARI	58
5.2. RİSK FAKTÖRÜ OLARAK HÜCRE SİKLUSUNDA GÖREVLİ <i>CDKN1B</i> GENİ ..	59
5.3. <i>CDKN1B</i> GENİNDEKİ GERM HATTI MUTASYONLARI.....	63
5.4. KORUNMUŞ BİR GEN OLARAK <i>CDKN1B</i>	64
5.5. <i>CDKN1B</i> GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE TESPİT EDİLEN SNP'LER	67
5.6. <i>CDKN1B</i> GEN VARYANTLARININ <i>p27</i> DÜZEYİYLE İLİŞKİSİ	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR.....	73
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	91
ETİK KURUL İZİN YAZISI	92
KURUM İZNİ YAZILARI.....	96
ÖZGEÇMİŞ	97

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Hücre döngüsü aşamaları ve kanser ile ilişkisi	9
Şekil 4.1: <i>p27</i> geni 27: 33916135 pozisyonunda tanımlanan A/C polimorfizmi	46
Şekil 4.2: <i>p27</i> geni 27: 33915991 pozisyonunda tanımlanan A/G polimorfizmi	47
Şekil 4.3: <i>p27</i> geni 27: 33915866 pozisyonunda tanımlanan A/G polimorfizmi	48
Şekil 4.4: <i>p27</i> geni 27: 33915855 pozisyonunda tanımlanan A/G polimorfizmi	49
Şekil 4.5: <i>p27</i> geni 27: 33915802 pozisyonunda tanımlanan A/G polimorfizmi	50
Şekil 4.6: <i>p27</i> geni 27: 33915723 pozisyonunda tanımlanan A/G polimorfizmi	51
Şekil 4.7: <i>p27</i> geni 27: 33915693 pozisyonunda tanımlanan A/C polimorfizmi	52
Şekil 4.8: İnsan ve köpek <i>p27</i> geninin nükleotid dizilerinin karşılaştırması	64

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Meme tümörü sınıflandırması.	18-19
Tablo 2.2: Köpek meme tümörlerinin evrenmesi.	20
Tablo 3.1: Kontrol grubuna dahil edilmiş dişi köpeklerin kontrol numarası, protokol numarası, ırk, yaş, kilo bilgileri.	34
Tablo 3.2: Vaka grubuna dahil edilmiş köpeklerin vaka numarası, protokol numarası, ırk, yaş, kilo, doğum sayısı (DS), tümör lokalizasyonu(TL), ovariohisterektomi durumu (OHE) ve tümör sınıfı bilgileri.	35-37
Tablo 3.3: <i>p27</i> geninin dizilenmesinde kullanılan primerler.	41
Tablo 3.4: PZR bileşenleri.	42
Tablo 4.1: <i>p27</i> genindeki polimorfizmlerin köpeklerde meme tümörü ile ilişkisi.	53
Tablo 4.2: CDKN1B genindeki polimorfizmlerin köpeklerde meme tümörü ile ilişkisi.	54
Tablo 4.3: Omurgalı türlerinde, insana benzerlik sırasıyla <i>p27</i> proteini aminoasit dizisi karşılaştırması.	63

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kisaltmalar	Açıklama
cdk	: Siklin bağımlı kinaz
cdki	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
cyc	: Siklin
KMT	: Köpek meme tumörü
TSG	: Tümör süpresör gen
ATM	: Ataxia telangiectasia mutant kinaz
APC	: Anafaz uyarıcı kompleks (Anaphase promoting complex)
Rb	: Retinoblastoma
MPF	: Maturing Promotor Factor
Cip/Kip	: Cdk inhibitör proteini / Kinaz inhibitör proteini
TGF-α	: Transforme Edici Büyüme Faktörü- α
PTEN	: Fosfataz Ve Tensin Homolog
PI3K	: PTEN fosfoinositol 3-kinaz
PIP3	: Fosfotidil inositol trifosfatı
MSI	: Microsatellit Instability – Genomik Kararsızlık
GH	: Büyüme hormonu (Growth hormone)
VD	: Ventrodorsal
RL	: Sağ lateral
LL	: Sol lateral
İİAS	: İnce iğne aspirasyon sitolojisi
ER	: Östrojen reseptörü
PR	: Progesteron reseptörü
EGF	: Epidermal hücre büyüme faktörü
ESS	: English Springer Spaniel
JAB1	: Jun aktivasyon alanı bağlayıcı protein 1
MEN	: Multiple Endocrine Neoplasia Syndrome
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism – Tek Nükleotid Polimorfizmi
IDP	: Intrinsically disordered protein

UTR	: Untranslated Region – Kodlanmayan Bölge
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PAP	: Papanicolaou boya
H&E	: Hematoksilen & Eozin
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
µM	: Mikromolar
UV	: Ultraviyole
NGS	: Next Generation Sequencing- Yeni Nesil Dizileme
uORF	: Upstream Open Reading Frame – Yukarı Akış Açış Okuma Çevrçevesi



ÖZET

[DOKTORA TEZİ]

[KÖPEK MEME KANSERİ ile *P27* TÜMÖR SÜPRESÖR GENİ POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ]

[Gizem ATMACA]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

[Danışman : Prof. Dr. İraz AKIŞ AKAD]

[Köpeklerde meme kanseri, çok sık görülen ve yüksek ölüm oranına sahip bir kanser türüdür. Bu çalışmada köpek meme tümörünün oluşumuna ve gelişimine yatkınlık oluşturabilecek *p27* genindeki SNP'ler ile köpek meme tümörü (KMT) arasında ilişki analizinin yapılması hedeflenmiştir. Bunun için 27 adet malign meme tümörü tanısı konulmuş ve 10 adet sağlam köpekten alınan kan ile vaka ve kontrol grupları oluşturulmuş, kandan izole edilen DNA örneklerinde *p27* geni sekiz bölge halinde PZR ile çoğaltılmıştır. Sanger sekans yöntemi ile tüm gen dizilenmiştir. DNA dizi analizi sonucunda köpek *p27* geninin 3'UTR bölgesinde yedi adet SNP belirlenmiştir. Bulunan SNP'ler şu şekildedir; 27:33783892 pozisyonunda A/C transversiyonu, 27:33783753 pozisyonunda A/G transisyonu, 27:33783628 pozisyonunda A/G transisyonu, 27:3378615 pozisyonunda A/G transisyonu, 27:33783565 pozisyonunda A/G, 27:33783483 pozisyonunda A/G transisyonu, 27:33783453 pozisyonunda A/C transversiyonu tespit edilmiştir. . Bu 7 adet SNP'nin meme tümörü ile anlamlı bir ilişkisi bulunamamıştır. Ancak ileriki çalışmalarda daha fazla örnek sayısı ile *p27* geninin tümör gelişimi, nodal tutulumu ve sağkalım ile ilişkisi bakılarak kanser gelişimi açısından önemli bulgular elde edilebilir. Ayrıca *p27*'nin ifadelenme süreci, *p27*'nin tümörlü ve sağlıklı dokulardaki ekspresyon düzeyleriyle ilişkisi, *p27* ve miRNA ilişkisinin kanser oluşumundaki etkilerinin incelenmesi kanser çalışmalarının aydınlatılması açısından önemli görülmektedir. Meme kanseri oluşumunu ve gelişimini etkileyen aday gen potansiyellerinin belirlenmesi veteriner hekimlik açısından önemli olduğu kadar, insan meme kanseri vakalarının da aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.]

Eylül 2022 , [113] sayfa.

Anahtar kelimeler: [*p27*, Köpek Meme Tümörü, SNP]

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

**DETERMINING THE RELATIONSHIP BETWEEN CANINE BREAST CANCER
and p27 TUMOR SUPPRESSOR GENE POLYMOPHISMS**

Gizem ATMACA

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Biochemistry

Name of Programme

Supervisor : Prof. Dr. Iraz AKIŞ AKAD

Breast cancer in dogs is a very common type of cancer with a high mortality rate. In this study, it was aimed to analyze the relationship between SNPs in the p27 gene and canine mammary tumor (CMT), which may predispose to the formation and development of canine mammary tumors. For this purpose, case and control groups were formed from 27 dogs diagnosed with malignant mammary tumor and 10 healthy dogs. In DNA samples isolated from blood, the p27 gene was amplified by PCR in eight regions. The entire gene was sequenced using the Sanger sequencing method. As a result of DNA sequencing analysis, seven SNPs were identified in the 3'UTR region of the dog p27 gene. The detected SNPs are as follows; A/C transversion at position 27:33783892, A/G transition at position 27:33783753, A/G transition at position 27:33783628, A/G transition at position 27:3378615, A/G transition at position 27:33783565, A/G transition at position 27:33783483, A/C transversion at position 27:33783453. There was no significant relevancy between these 7 SNPs and breast tumor. In future studies, by examining the relationship of the p27 gene with tumor development, nodal involvement and survival with a larger number of samples, important findings can be obtained in terms of cancer development. In addition, the expression process of p27, the relationship between expression levels of p27 in tumor and healthy tissues, the effects of p27 and miRNA relationship on cancer formation are considered important in terms of illuminating cancer studies. Determination of candidate gene potentials that affect the formation and development of breast cancer will contribute to the enlightenment of human breast cancer cases as well as being important in terms of veterinary medicine.

September 2022, 113 pages.

Keywords: p27, Canine Mammary Tumor, SNP

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalarak daha sonra yakın ve uzak organlara yayılma yeteneği kazanmasıyla meydana gelen yeni bir hücre (neoplazi) formuna evrilmesidir. Hücre bölünmesi, genetik olarak aynı iki hücrenin üretilmesini sağlamak için evrimsel olarak korunan çoklu hücre döngüsü kontrol mekanizmaları tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Hücre döngüsü kontrol noktaları, hücre bölünmesi sırasında genetik hataların birikmesini ve yayılmasını önleyen DNA gözetim mekanizmaları olarak çalışır. Kontrol noktaları hücre döngüsü ilerlemesini geciktirebilir veya onarılamaz DNA hasarına yanıt olarak hücre döngüsü çıkışını veya hücre ölümünü (apoptozis) indükleyebilir. Hücre döngüsü kontrolünü bozan kanserle ilişkili mutasyonlar, esas olarak hücrelerin hücre döngüsünden çıkma yeteneğini tehlikeye atarak sürekli hücre bölünmesine izin verir (Matthews ve diğ., 2022).

DNA'nın mutajenlere ve replikasyon hatalarına maruz kalması, DNA metilasyonu, histon ve gen düzenlenmesinde görevli kodlanmayan RNA modifikasyonu gibi epigenetik mekanizmalar da kanser oluşumunu etkileyen kritik etkenlerdir (Seo ve diğ., 2015). Hücre siklusunun kontrol noktalarını bozan DNA mutasyonları birçok kanser türünün oluşumunda kilit rol oynamıştır. Büyümenin durdurulması, DNA onarımı ve apoptozisin engellenmesi, tümör süpresör genlerin mutasyonu kanser gelişiminde önemli yolaklardır (Kumar ve diğ., 2015).

Hücre döngüsünü kontrolü amacıyla, döngünün G1-S fazı, G2-Mitoz fazı ve Metafaz-Anafaz fazları arasında kontrol noktaları bulunur. Bu kontrol noktalarına ek olarak hücre döngüsündeki aşamalar arasındaki geçişler, sikline bağımlı kinazlar (cdk'lar) tarafından hassas bir şekilde koordine edilir ve bunlar sadece kendi spesifik siklinleri (cyc) ile ilişkili olduklarında aktiftir (Hochegger ve diğ., 2008; Kawauchi, 2014; Łukasik ve diğ., 2021a). Siklinlerin aksine, sikline bağımlı kinaz inhibitörleri (cdki'ler), cdk'ların aktivitelerini inhibe eder. Fosforilasyon ve defosforilasyon olayları da cdk aktivitesini düzenler. Siklinlerin ve cdki'lerin ubiquitin aracılı proteolizinin de hücre döngüsü regülasyonunda yer aldığı bildirilmiştir (Zou ve Lin, 2021; Kumar ve diğ., 2015).

Cdk/cyc komplekslerinin aktivitesi, iki ailede sınıflandırılan cdk'i'leri tarafından inhibe edilebilir: INK4 (p15Ink4b, p16Ink4a, p18Ink4c ve p19Ink4d) ve CIP/KIP (p21Cip1, p27Kip1 ve p57Kip2). INK ailesinin üyeleri, spesifik olarak cdk4/6'ya bağlanır, bunun siklin D ile etkileşimini önler. Buna karşılık, CIP/KIP ailesinin üyeleri, cdk2/cyc E, cdk2/cyc A, cdk1/cyc A ve cdk1/cyc B kompleksleri dahil olmak üzere tüm cyc/cdk komplekslerini inhibe etme kabiliyetine sahiptir (Łukasik ve diğ., 2021b; Denicourt ve Dowdy, 2004).

Köpek meme tümörleri (KMT) doğrudan meme bezinde başlar veya primer tümör odağından metastaz yoluyla meme bezine gelir. Dişi köpeklerde meme bezi tümörleri, gelişim esnasında hücrel farklılaşma sürecinde meydana gelen hasarlardan dolayı oluşabilir (Loar, 1996). Dişi köpeklerde meme tümörleri, bu türü etkileyen tümörlerin yaklaşık yüzde 50'sini temsil eden en yaygın neoplazidir ve köpeklerde meme tümörlerinin yüzde 50'sinin malign olduğu ve en çok etkilenen yaş gruplarının 8 ile 14 yaş olduğu bildirilmiştir (Thejaswini ve diğ., 2022).

KMT'leri, insan meme kanseri ile birçok ortak özelliği taşıyan, yüksek ölüm oranına sahip, dişi köpeklerde en sık görülen malignitelerdir (Bird ve diğ., 2011, Gray ve diğ., 2020). KMT ve insan meme tümörü, çevresel, biyolojik, epidemiyolojik, klinik, genetik ve patolojik unsurlar dahil olmak üzere birçok yönden benzerdir (Bujak ve diğ., 2020; Valdivia ve diğ., 2021; Raposo ve diğ., 2017). Ayrıca KMT ve insan meme tümörü arasında moleküler ve histolojik açıdan da büyük benzerlikler vardır (Valdivia ve diğ., 2021). İnsan ve köpek genom organizasyonları arasındaki benzerlik insan ve fareden daha fazladır, bu da köpeğin insan kanser çalışmaları için daha iyi bir model olabileceğini kanıtlamaktadır (Park ve diğ., 2016).

Evcil hayvanlar arasında köpekler, meme tümörü insidansı en yüksek olan hayvanlardır. Köpeklerde meme tümörünün yaş, ırk, beslenme (obezite), hormonlar, genetik yatkınlık, büyüme faktörleri ile yakından ilgili olduğu görülmüştür (Yıldız, 2004; Sleenckx ve diğ., 2011).

CDKN1B (KIP1) köpekte 27. kromozomda lokalize olan bir gendir. p27KIP1 ise bu gen tarafından kodlanan bir cdk'i'dir. p27; hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü ve apoptozu gibi birçok biyolojik sürece katılır (Polyak, 2006). p27, kanserde bir tümör baskılayıcı gen rolü olması nedeniyle kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bu nedenle bir çok literatürde p27 tümör süpresör geni olarak da geçmektedir (McKay ve White, 2021). Hücre bölünme döngüsünün tüm aşamalarında kritik görevlere sahiptir. Spesifik olarak, nükleer p27 hücre döngüsü ilerlemesini inhibe eder ve hücreyi durgunluk, apoptoz ve/veya yaşlanmaya duyarlı hale getirir. p27, cdk2-cyc E ve cdk4-cyc D komplekslerini baskılayarak G1/S geçişini önler. Ayrıca G2 ve

M fazlarının kontrolüne de katılır. Geç G1 fazındaki p27 proteininin tükenmesi, hücre bölünmesinin ilerlemesine izin vererek S fazına geçişi teşvik eder. p27 protein seviyeleri, ubiquitin aracılı proteoliz yoluyla kontrol edilir (García-Osta ve diğ., 2022).

Sunulan tez çalışması *p27* tümör süpresör genindeki olası polimorfizmlerin köpeklerde meme tümörüne yatkınlığa neden olabileceği düşünülerek oluşturulmuştur. Tümörle ilişkili olabilecek varyantlar tespit edildiği takdirde, veteriner hekimlik açısından son derece önemli olan, kanser için aday gen olabilecek potansiyellerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca tespit edilebilecek varyantlara bağlı olarak köpek ve insan meme tümörü vakalarında p27 proteininde benzer özellikte polimorfizmlerin varlığının araştırılması, bulgular ışığında ise KMT vakalarının insan meme tümörü vakalarına model olarak gösterilebileceği tartışılması hedeflenmiştir.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. KANSERİN TARİHÇESİ

Bir hastalığın tarihi incelendiğinde bakılacak parametrelerin başında; hastalığın oluşumu, ilk ne zaman ve nerede görüldüğü, semptomları, yaygın olup olmadığı, belirli ülke sınırlarında olup olmadığı, semptomların zamanla değişip değişmediğinin incelenmesi gerektiği belirtilmiştir. Ayrıca hastalığın hekimler tarafından farklı zamanlarda nasıl tedavi edildiği, tedavi sonuçlarının etki ve yan etkileri tarih boyunca merak edilip, incelenmiştir. Tarihsel süreçte bu bilgiler ışığında hastalık tarihinde üç farklı evre saptanmıştır. Birincisi; deneysel aşama yani semptomların deneysel olarak giderildiği aşama, ikincisi; hastalığın mekanizması ve nedeni, üçüncüsü ise daha başarılı nasıl müdahale edilebilir sorularının yanıtlanması olmuştur (Sigerist, 1932).

Bu sorular ve yanıtları sayesinde milattan önceki dönemlerde birçok hastalığa çare bulunmuştur. Fakat hala gerçek doğası bilinmeyen ve tatmin edici bir tedavisi olmayan bir çok hastalık grubu vardır. Bunlardan biri de kanserdir.

Tümörler ile ilgili tanımlamalara ilk kez Mısır papirüsleri, Babil çivi yazıları ve eski Hindistan el yazılarında rastlanmıştır. Orta Çağ'dan itibaren yazılmış olan tüm cerrahi ve tıbbi kitaplarda kanserden bahsedilmiştir. Kanserle ilgili tıbbi belgelere ilk olarak M.Ö. (milattan önce) 27. yüzyılda (yy) Mısırlı hekim İmhotep'in yazılarında rastlanmıştır. İmhotep, kanseri memedeki kitle ve ağrılı şişlik olarak betimlemiştir. Daha sonraki belgelerde ise Peru ve Mısır'da yapılan kazı çalışmalarında 1000 yıllık mumyalarda osteosarkom tespit edildiği bildirilmiştir (Sigerist, 1932). M.Ö. 440 yılında Heredot, "Heredot Tarihi" adlı kitabında yine kanser benzeri tümöral oluşumlardan söz etmiştir (Siddhartha, 2012).

Kanser terimi ilk defa M.Ö. 400 yıllarında Hipokrat tarafından kullanılmıştır. Vücut yüzeyinde büyüyerek ülser olan, ağrılı şişliklere "karkinoma" veya "karkinos" tabirini kullandığı belirtilmiştir. Galen ise M.S. (milattan sonra) 2.yy'da şişlikleri yengece benzettiği için "kanser" terimini kullanmıştır. Başka bir yoruma göre ise bu adlandırma; kanser ağrısının yengeç ısırması ile oluşan, orta hattan çevreye doğru yayılan kemirici tarzındaki ağrıya benzerlik göstermesi sebebiyle kullanıldığı öne sürülmüştür (Siddhartha, 2012).

M.S. 160 yıllarında Galen tümöral oluşumların içerisinde siyah safra olduğunu ve ameliyat yapıldığı takdirde, bu safranın tüm vücuda yayılacağı fikrini savunmuştur. Bu savını dönemin hekimlerinin büyük bir kısmına kabul ettirmiştir. O yıllarda anestezi ve antiseptik maddeler henüz keşfedilmediği için Galen'in bu fikri birçok insanın hayatının kurtulmasına olanak sağlamıştır. 18.yy'a kadar bu anlayış benimsenmiş ve devam etmiştir. 16.yy'da cerrah Ambroise Pare'nin çalışmalarında kömürle kızdırılmış havya ya da sülfürik asit ile tümörü dağladığına dair bilgiler yer almıştır. Fakat bu yöntem fazla acı verici olduğundan dolayı kullanımı yaygınlaşmamıştır. 17.yy'da ise lenfatik damarlar keşfedilmiştir. Kanseri etkenlerini lenflerin taşıdığı ve tümör oluşumundan lenflerin sorumlu olduğu düşünülmüştür. Yine 17. yy'da İskoç cerrah John Hunter kanserin çevre dokudaki damarlar tarafından beslendiğini ve bu damarlar ligatüre edildiğinde kanserin izole edilebileceğini ileri sürmüştür. 18.yy'a gelindiğinde Andreas Vesalius ve Matthew Baillie yaptıkları çalışmalar sonucunda Galen'in "siyah safra" teorisini çürütmüştür. Bunun üzerine kanserli bölgeyi ameliyat etme fikri cerrahlar arasında hızla yayılmaya başlamıştır. Fakat insanların ameliyat acısına dayanamadıkları, dayanabilenlerin ise enfeksiyon nedeni ile öldüğü belirtilmiştir. 1846-1867 yılları arasında ilk önce anestezi daha sonra antiseptik maddeler keşfedilmiştir. Anestezi ve antiseptik maddelerin keşfinden sonra 1850-1950 yılları arasında cerrahlar kanserli doku ve organları ameliyat ederek vücuttan uzaklaştırmaya başlamışlardır. Bu şekilde 20.yy'ın başlarına kadar metastaz yapmayan tümörler ameliyat ile alınabilir hale gelmiştir. Cerrahlar metastaz ihtimalini engellemek adına, kanserli bölgenin çevresindeki dokuları da alarak nükleus etmesini önlemeye çalışmışlardır. Örneğin; meme kanseri olan bir hastanın memesini almanın yanı sıra aksiller lenf nodlarından, omuz hareketlerini sağlayan pektoralis major kasına kadar tüm dokuları çıkarmanın metastazı önleyeceğini düşünmüşlerdir. Bunun sonucunda ise hastalar kollarını oynatamaz hale gelip, lenf nodlarının olmaması sebebiyle fil ayağı hastalığına maruz kalmışlardır (Siddhartha, 2012).

1895 yılında ise kanser tedavisinde çığır açan keşiflerin ilki gerçekleşmiş ve Wilhelm Röntgen, X ışınını keşfetmiştir. 1898 yılında Pierre Curie ve Marie Curie daha güçlü X ışını yayan radyum elementini bulmuştur (Siddhartha, 2012). Kendilerine Nobel Fizik ödülü getiren bu çalışmaların sonucunda, maalesef günümüze kadar iki defa Nobel ödülü kazanan tek kadın bilim insanı olan Marie Curie radyum çalışmalarının sebep olduğu kanser hastalığından hayatını kaybetmiştir. 1900'lü yılların başında ise artık kanser hastalarında radyasyon tedavisi kullanılmaya başlanmıştır. 1896 yılından 1940'lı yılların ortalarına kadar çeşitli kemoterapik ajanlar kullanılmıştır. Günümüzde kullanılan, çeşitli insan kanseri türlerinde önemli etkileri

olan 50'den fazla kemoterapötik ilaç bulunmaktadır. Bu kanser önleyici ilaçlar önce tek başına daha sonra ise kombinasyonlar halinde ve son olarak da radyasyon tedavisi ve cerrahi yöntemler ile desteklenerek kanser kontrolünde önemli gelişmeler kaydedilmiştir (Wright, 1984).

Günümüzde her yıl milyonlarca insanın ölümüne neden olan kanser tarihi aslında insanlık ile birlikte başlayan bir hastalıktır. Eski çağlarda daha az rastlandığı düşünülen bu hastalık, gerçekte insan ömrünün uzaması ile kendini göstermiştir.

2.2. KANSER BİYOLOJİSİ ve GENETİĞİ

Kanser gelişim sürecinde normal fenotipteki hücreler, saldırgan bir şekilde çoğalan ve istila etme yeteneğine sahip yeni bir hücre fenotipine evrilirler. Hücrenin bu süreç içerisinde sahip olduğu özelliklerden bazıları şu şekilde tanımlanmıştır; hücrenin çoğalıp farklılaşmasını sağlayan sinyal iletiminin azalması ve duyarsızlaşması, çoğalmanın engellenememesi, apoptoz mekanizmasının devre dışı kalması, komşu dokulara yayılım ve metastaz. Oluşan bu fenotipteki hücreler proto-onkogen ve tümör süpresör genlerin (TSG) işlevselliğini etkileyen mutasyonlarla meydana gelmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2000).

Canlılık devam ettiği sürece hücrelerdeki DNA, mutajenlere ve replikasyon hatalarına maruz kalır, bu da her hücrenin DNA dizisinde hemen etkisi farkedilmeyen fakat önemli değişikliklere neden olabilir. Normal şartlarda herhangi bir DNA hasarı, DNA hasar tamir genleri ile ya da apoptozis gibi çeşitli yöntemlerle onarılmaya çalışılır. Fakat bazen bu somatik mutasyonlardan biri, kritik bir genin işlevini değiştirerek, oluşturduğu hücreye çoğalma yeteneği kazandırır. Zamanla büyümesi durdurulamayan bu hücreler çevre dokuları da istila ederek metastazlara sebep olur (Futreal ve diğ., 2001). Bu mutasyona maruz kalıp kanser oluşumuna sebep olan genler; proto-onkogenler ve TSG'lerdir. Proto-onkogenler; sağlıklı bir bireyde hasarlı dokuların onarımı, hücre büyümesi ve farklılaşmasını sağlayan proteinleri kodlar (Cabadak, 2008). Bu genler meydana gelen mutasyonlar veya artmış gen ekspresyonu nedeniyle onkogenlere dönüşür. Onkogenler ise hücreye kontrolsüz bir şekilde bölünme yeteneği kazandırır veya hücre bölünmesinin önündeki tüm engelleri ortadan kaldırarak kanserin başlangıç aşamasına zemin oluşturur (Kanwal ve Gupta, 2012). TSG ise başlıca görevi hücre siklusunu düzenleyip hücrenin kontrollü çoğalmasını sağlamaktır. TSG'de oluşan bir mutasyon ise hücrenin çoğalmasını engellenemez hale getirir (Cabadak, 2008). Özetle; proto-onkogenlerin ve TSG'lerin fonksiyonunu yitirmesi sonucu kontrol edilemeyen hücre büyümesi

ve metastaz yapabilme özelliğine sahip kanser hücrelerinin gelişimine sebep olur (Kanwal ve Gupta, 2012).

Bunun yanı sıra DNA metilasyonu, histon ve gen düzenlenmesinde görevli kodlanmayan RNA modifikasyonu gibi epigenetik mekanizmalar da kanser oluşumunu etkileyen önemli süreçlerdir (Öztabak, 2017; Seo ve diğ., 2015).

Hücrenin çoğalması, büyümesi ve apoptozisi hücre dengesini (homeostasis) sağlayan mekanizmalardır. Bu dengenin bozulması durumunda hiperplazi veya neoplazi meydana gelir. Sonuç olarak ise bu genetik defekte yatkın olan hücrelerde malign çoğalma görülebilir. Malign çoğalmanın önlenmesi için en etkili yöntem nekrozdur. Nekroz, bir veya daha fazla sayıda hücrenin, dokunun ya da organın irreversibl şekilde hasar görmesi sonucu oluşan patolojik ölümdür. Nekroz ve apoptozis arasındaki fark, apoptozis belirli bir moleküler işlemler serisinin sonunda hücrenin ölümünü sağlar ve aynı zamanda organizmanın yaşam döngüsü için gerekli ve yararlıdır (Kumar ve diğ., 2015).

Hücre siklusunun kontrol noktalarını bozan DNA mutasyonları birçok kanser türünün oluşumunda kritik rol oynamıştır. Büyümenin durdurulması, DNA onarımı ve apoptozisin engellenmesi, TSG'lerin mutasyonu kanser gelişiminde önemli yollardır (Pazarbaşı ve Kasap, 2003).

Bu nedenle, kanserin genetiğini ve biyolojisini anlamak için öncelikle normal hücre siklusunu ve regülasyonunu anlamak daha faydalı olacaktır.

2.3. HÜCRE BÖLÜNMESİ

Hücre bölünmesi ve çoğalması, canlılığın devam edebilmesi, organ doku ve sistemlerin kendini yenileyip onarabilmesi için, yaşlanan doku ve hücrelerin yok edilip yerine yenilerinin yapılabilmesi için gerekli olan hücre yaşam çemberidir (Pelengaris ve Khan, 2006a).

Hücre bölünmesi mitoz ve mayoz olmak üzere ikiye ayrılır. Bu bölümler ise;

1. Karyokinez: Çekirdek bölünmesi
2. Sitokinez: Sitoplazma bölünmesidir.

Bu aşamalar detaylı incelendiğinde, karyokinez de kendi arasında interfaz ve mitotik faz olmak üzere ikiye ayrılır.

İnterfaz:

İnterfaz hücrenin mitotik hazırlanma evresidir. Hücre yaşamının büyük çoğunluğunu interfaz evresinde geçirir. Bu evre 3 faza ayrılır; G1 fazı, S fazı, G2 fazından oluşur. Ek olarak bir de G0 fazı vardır. Hücre bölünmezse bu fazda kalır. Kendini kopyalayamayan hücrelerde bulunur. Büyümesi ve gelişmesi duran tüm hücreler bu fazda bekler. Örneğin; kas hücreleri, merkezi sinir sistemi hücreleri gibi. Bunlara zıt olarak ise kanser hücreleri örnek verilebilir. Kanser hücreleri kontrolsüz bir şekilde çoğaldığı için asla G0 fazına girmezler.

DNA interfaz evresinde kromatin formundadır. Bunun dışında bu fazda hücre çekirdek zarı, sitoplazma, sentrozom ve hücre zarından meydana gelir.

G1 Fazı: İnterfaz evresindeki hücre çevresini kontrol eder ve sinyalleri alarak büyümeyi indükler. DNA sentezi için hazırlık yapılır, RNA ve protein sentezi gerçekleşir. Hücrenin büyüdüğü bu evreye G1 evresi denir. Hücre döngüsünün başladığı evredir.

S Fazı: Bu evrede kromatidler kendisini kopyalar ve kardeş kromatidler meydana gelir. Her kromozoma bir tane olmak üzere sentrozom sayısı artar.

G2 Fazı: Hücreyi mitotik faza hazırlayan evredir. Hücre çevresinden biraz daha beslenerek büyür. Bu aşamadan sonra mitotik faza hazır hale gelir.

Mitoz: Hücrenin 24 saatlik yaşam döngüsünde yaklaşık 1 saati kaplar. Bir hücre çekirdeğinin aynı genetik bilgiye sahip olduğu iki çekirdeğe dönüştüğü süreçtir. Profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere 4 fazdan meydana gelir.

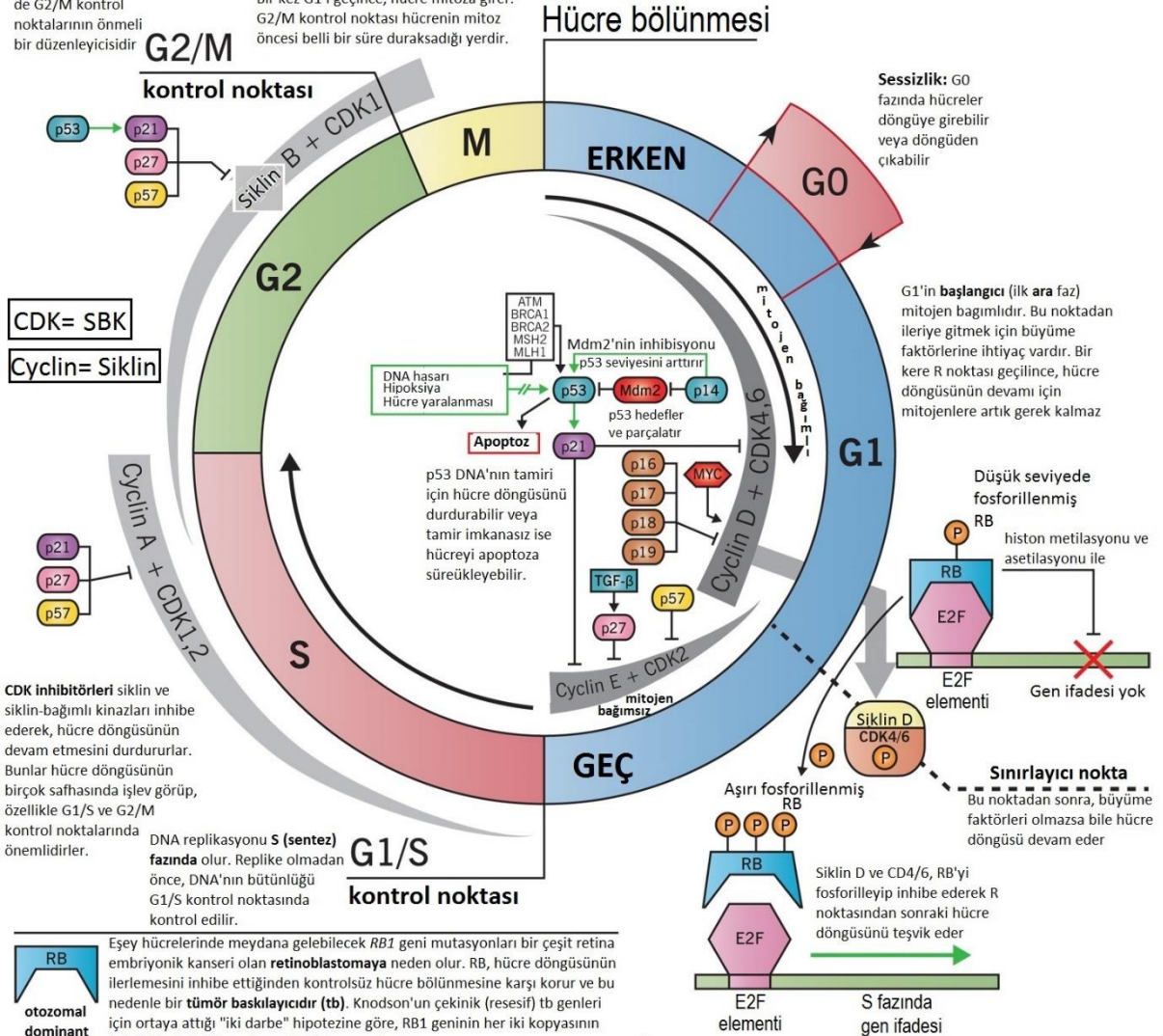
Sitokinez: Bu aşama iki hücrenin tamamen 2 ayrı hücreye ayrılmaya aşamasıdır. Sitoplazma bölünerek, genetik olarak birbirinin aynısı 2 kardeş hücre meydana getirir. Her iki hücrenin de kromozom sayısı $2n$ dir. Canlı gelişimini tamamlayana kadar yani organ, doku ve bezlerin gelişimi tamamlandığında hücre bölünmesi sona erer. Hücre G0 fazına girer.

Hücre döngüsü ve kanserle ilişkisi

Siklinler ve SBKlar ► hücre döngüsünü teşvik ederler. **SBK inhibitörleri**  döngüyü durdururlar. Bu iki molekül grubu arasındaki denge, hücrenin çoğalmasını veya susukun kalmasını belirler.

p53 hem G1/S hem de G2/M kontrol noktalarının önmeli bir düzenleyicisidir

Bir kez G1'i geçince, hücre mitoz girer. G2/M kontrol noktası hücrenin mitoz öncesi belli bir süre duraksadığı yerdir.



Eşey hücrelerinde meydana gelebilecek **RB1** geni mutasyonları bir çeşit retina embriyonik kanseri olan **retinoblastomaya** neden olur. RB, hücre döngüsünün ilerlemesini inhibe ettiğinden kontrolsüz hücre bölünmesini karşı korur ve bu nedenle bir **tümör baskılayıcıdır (tb)**. Knodson'un çekinik (resesif) tb genleri için ortaya attığı "iki darbe" hipotezine göre, RB1 geninin her iki kopyasının (allel) işlevini yitirmesi gerekir ki kanser oluşsun. **Kalıtısal formunda** RB1 geninin allerinden biri cinsiyet hücrelerinde (sperm ve yumurta) mutasyona uğrar veya eksiktir. Diğer allel ise daha sonra somatik bir mutasyonla bozulur. Buna bağlı görme kaybı 1 yaşından öncekindini gösterir. **Sporadik retinoblastoma** ise daha yaygın olup, 1. ve 2. yaşlar arasında ortaya çıkar.

p53 Eşey hücrelerde meydana gelecek p53 geni mutasyonları genç yaşlarda (<45) birçok kanserle kendini belli eden **L-Fraumeni sendromuna** neden olur. Göğüs kanseri, kemik kanseri, lösemi, lenf kanseri ve adrenokortikal kansinomlar Li-Fraumeni sendromunun en yaygın kanserleridir.

Retinoblastoma gibi, **"iki darbe"** hipotezi bu sendrom için de geçerlidir. Bir allel eşey hücrelerinde kaybolurken, diğeri somatik olarak işlevini yitirir. Kanser riski dominant olarak kalıtılır.

P53'e "**genomun gardiyanı**" denir. Hemen her türlü kanserde bu gen işlevini yitirmiştir. P53'ün işlevinin kaybı, hücrelere yaşam avantajı lazandırır. Çünkü, işlevsel bir p53 proteininden yoksun hücreler kontrolsüz çoğalır ve apoptozdan (programlı hücre ölümü) kaçınırlar.

Onkogenler <i>Aşağıdakilerin inhibe olmaması veya işlev kazanması kansere sebep olur.</i> • Siklinler • Siklin-bağımlı kinazlar • E2F • MYC • Mdm2	Tümör baskılayıcılar <i>Aşağıdakilerin aşırı inhibe olmaları veya işlev kaybetmeleri kansere neden olur.</i> • RB • p53 • p21, p27, p57 (CIP/KIP/WAF) • p14/ARF • p16/INK4a, p17, p18, p19 • TGF-β reseptörü • BRCA1, BRCA2 • ATM
---	--



Hikmet Geckil, Professor
Department of Molecular Biology and Genetics
Inonu University
44280 Malatya, Turkey

Şekil 2.1: Hücre döngüsü aşamaları ve kanser ile ilişkisi.

2.3.1. Hücrenin Kontrol Noktaları

Normal hücrelerde, hücre döngüsü boyunca ilerleme sıkı bir şekilde düzenlenir ve bir sonraki adımın başlayabilmesi için her adımın tamamlanması gerekir. Kontrol noktalarının amacı, hücre içi ve dışı şartlar sağlanana kadar siklus geçişlerini geciktirmek ve oluşabilecek hasarın onarılması için hücreye süre kazandırmaktır. Hücre döngüsünde, hücrenin bir sonraki aşamaya geçmeden önce dış sinyalleri ve iç dengeyi izlediği üç farklı nokta vardır (Pardee, 1989). Bunlar;

1. G1 – S fazı arası
2. G2 – Mitoz arası
3. Metafaz – Anafaz fazları arasında

2.3.1.1. G1/S Kontrol Noktası

G1 fazının sonlarına doğru mayalarda START, memelilerde ise R NOKTASI (Restriksiyon noktası) olarak bilinen kritik bir nokta yer alır. Bu noktayı geçince hücre bölünmesi mitoz tamamlanıncaya kadar devam eder. Burası G1/S fazları geçişinin kontrol noktasıdır (Pardee, 1989).

G1 fazında hücre çevresi ve boyutu uygun seviyeye ulaştıktan sonra, hücre büyümesi indüklenir, DNA sentezi için hazırlık aşamasına geçilir, RNA ve protein sentezi gerçekleşir. S fazında ise DNA sentezlenir (Cabadak, 2008).

G1/S geçişindeki kontrol noktasında, hücre boyutu uygunsa DNA'nın hasar görüp görmediği kontrol edilir. Hücre döngüsü sürecinde geri dönüşü olmayan nokta S fazı olduğu için hücre, replike olabilmek için G1/S kontrol noktasında hasar kontrolü yapılır. Bu noktada DNA hasarı tespit edilirse, hücre döngüsü durur ve DNA tamir mekanizmaları devreye girer (Cabadak, 2008).

G1/S ve G2/M kontrol noktalarında görevli DNA hasar sensörleri benzerdir. Bu kontrol noktalarında hücre döngüsünü durduran hasar sensörü, sinyal dönüştürücü ve efektör bileşenlerden oluşur. Sinyal dönüştürücüler ve efektörler ise hedef molekülleri fosforile eden ve hücre döngüsü ilerlemesini durduran protein kinazlardır. Sensörler; *Rad* genleri olarak adlandırılıp *Rad3*, *Rad17*, *Rad9*, *Rad1*, *Hus1* ve *Rad26* olmak üzere altı gen tanımlanmıştır. Rad proteininin homologlarından biri olan ATM/ATR; fosfatidilinositol-3 kinaz ile ilişkili protein kinaz ailesine aittir ve hem hasar algılama hem de sinyal iletimine katılır. ATM (Ataxia Telangiectasia Mutant kinaz) tarafından *p53*'ün aktivasyonu, DNA onarımı ve apoptozisi

koordine eden DNA hasar sinyal yollarına aracılık eder. ATM çift iplik kırıklarına cevapta ve ATR olarak adlandırılan kinaz da diğer tip DNA hasarlarına cevapta görev almaktadır (Jackson ve diğ., 2000; Hirose ve diğ., 2001; Hoekstra, 1997).

Eğer hücre boyutu ve DNA bütünlüğü normal ise, G1/S kontrol noktası geçilmiş olur ve hücre S aşamasına ilerler.

Hasar tamir edilemeyecek boyutta ise apoptotik yollar aktive edilerek hücre yok edilir.

2.3.1.2. G2/M Kontrol Noktası

G2 fazında hücre büyümeye devam eder. RNA ve protein sentezi bu aşamada da gerçekleşir. Hücre mitoz hazırlanır (Blagosklonny, 2001a).

G2/M kontrol noktası, hücredeki fizyolojik koşulların mitozdan önce izlendiği ikinci önemli kontrol noktasıdır. DNA’da meydana gelen bir hasarın tamirinin yapılıp yapılmadığı, DNA replikasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği, hücrenin mitoz girişinde bir engel olup olmadığı ve kardeş kromatidlerin ayrılmasında bir hata olmaması gibi kontroller yapılır. Bu kontroller tamamlanana kadar hücre döngüsü durur. DNA’da meydana gelmiş olan bir defekt replikasyon sonrasında da kromatidler ayrılmadığı sürece onarılabilir. Özellikle iyonize radyasyona maruz kalan hücreler için bu kontrol noktası önem arz eder (Jackson ve diğ., 2000, Hirose ve diğ., 2001).

G2/M kontrol noktası hasarları kromozomal anomalilere yol açar.

2.3.1.3. M Kontrol Noktası (Metafaz- Anafaz Geçiş)

Hücre döngüsünün üçüncü kontrol noktası mitoz evresinde gerçekleşir. Bu noktada hem iğ iplikçiklerinin başarılı bir şekilde oluşumu hem de kardeş kromatidlerin ayırılmasına aracılık eden kinetokorların sentrozoma bağlanıp bağlanmadığı kontrol edilir. Eğer iğ iplikçikleri düzgün oluşturulmamışsa ya da bağlanma yetersiz ise mitoz durdurulur. Anafaz uyarıcı kompleks (Anaphase promoting complex –APC) inhibe edilir. Hasar düzeltilemeyecek durumda ise apoptozis gerçekleşir (Blagosklonny, 2001b, Klug ve diğ., 2018a).

2.3.2. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi

Hücre döngüsünü kontrol noktalarında düzenlemeye ek olarak hücrelerin, hücre döngüsünün değişik evrelerinden sistemli bir şekilde geçmeleri siklinler (cyc), siklin bağımlı protein kinazlar (cdk) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (cdki) tarafından denetlenir.

2.3.2.1. Siklinler, Siklin Bağımlı Kinaz Ve Siklin Bağımlı Kinaz Inhibitörleri

Siklin bağımlı kinazlar (cdk), hücre döngüsünün bir sonraki aşamasına geçebilmesi için gerekli olan hedef proteinleri fosforile edip döngünün devamlılığını sağlarlar. Siklus boyunca sürekli sentezlenirler fakat aktive olabilmeleri için siklinlere bağlanıp fosforile olurlar ve cyc/cdk kompleksi oluşturmaları gerekir. Bu enzim kompleksi hücre döngüsü, transkripsiyon ve hücre farklılaşmasında görev alır. Hücre döngüsü G1-S-G2 ve M fazlarından oluşur ve her bir fazda farklı bir cyc-cdk kompleksi rol almaktadır. Bu kompleksin düzenlenmesi; cyc alt biriminin hücredeki konsantrasyonuna, fosforillenme durumuna ve inhibitör moleküllere bağlıdır (Albert ve diğ., 2015b, Klopffleisch ve diğ., 2010).

Siklinler (cyc), cdk enzimlerinin aktive olmasıyla hücre döngüsünü kontrol eden bir protein sınıfıdır. Siklus boyunca bir yandan sentezlenirken bir yandan yıkımlanırlar. Siklinler spesifik olarak bir fazda en yüksek seviyede bulunurlar ve sonraki faza geçerken ise hızla yıkımlanırlar. Siklinlerin yıkımı ubiquitin proteozom yoluyla gerçekleşir. Görevleri cdk'ları aktive etmektir ve fonksiyonlarını yerine getirdikten sonra seviyeleri hızla düşer (Golias ve diğ., 2004). Siklinler, cdk'lerin kritik düzenleyici alt birimleridir. Siklin seviyeleri yükseldiğinde, cdk'lerle stabil kompleksler oluşturarak enzimatik olarak aktif heterodimerik kompleksler oluştururlar. Siklin seviyeleri düştüğünde, cdk'ler katalitik aktivitelerini kaybederler ve substratlarını fosforile edemezler (Miele, 2004). 15'ten fazla siklin tespit edilmiş olup hücre döngüsünde görevli siklinler; cyc D, cyc E, cyc A, cyc B olarak tanımlanmıştır (Aktuğ, 2014)..

Siklin D: Hücre siklusunda ekspresyon seviyesi artan ilk siklindir. G1'in ortasında eksprese edilip, S fazında kaybolur. D1, D2, D3 olmak üzere üç formu vardır. Dayanıksızdır ve ubiquitin proteozom yoluyla üzerinden yıkılır. G1 fazında cdk4 ve cdk6'ya bağlanıp aktive eder ve cycD-cdk4/6 kompleksini oluşturur (Hinds ve Brown, 2018). Bu kompleksin önemi Retinoblastoma proteinini (RB) fosforillemesidir. Hücre siklusunun ilerlemesi Rb fosforillenmesine bağlıdır. Hipofosforile Rb, E2F transkripsiyon faktörünü bağlayıp inaktive eder. E2F'nin inaktive olması sonucu hücre S fazına geçemez ve siklus durur. G0 fazındaki hücre bölünme sinyali aldığı anda Rb; cyc-cdk kompleksini aktive eder bu kompleks ise Rb proteinini fosforiller. Bu sayede E2F transkripsiyon faktörü serbest kalmış olur ve hücre S fazına girebilir (Spirin ve diğ., 1996).

Siklin E: E1 ve E2 olmak üzere iki formu vardır. S fazında cdk2 ile kompleks oluşturur. Bu kompleks sayesinde hücre döngüsü S fazına ilerler ve DNA replikasyonu başlar. Fakat bu

kompleksin oluşumu E2F transkripsiyon faktörüne bağlıdır (Sears ve Nevins, 2002). Aktifleşen E2F; cyc E ve DNA polimerazın transkripsiyonunu artırır, DNA sentezi indüklenir.

Siklin A: A1 ve A2 olmak üzere iki formu bulunur. cyc A, S fazı sırasında birikmeye başlar ve proteazom aracılı bölünme ile metafazdan önce mitoz sırasında yok edilir. E2F transkripsiyon faktörleri, cyc/cdk komplekslerinin sıralı etkisi ile Rb aracılı inhibisyonundan kurtulduktan sonra cyc A ekspresyonunu indükler. Cdk1 ve cdk2 ile kompleks oluşturabilir. cycA-cdk1 (cdc2) kompleksi; DNA replikasyonunun yeniden başlatılmasını önler ve her S fazında yalnızca bir kez replike olmasını sağlar.(Miele, 2004)

Siklin B: Cdk1 ile cycB-cdk1 (cdc2) kompleksi oluşturur. Bu kompleks Maturing Promotor Factor (MPF) olarak da bilinir, mitoz girişten sorumludur. G2'den M fazına geçişi kontrol eder. Geç G2 fazında, cyc B birikir ve aktif olmayan cdk1 molekülleri ile kompleksler oluşturur (Klug ve diğ., 2018). G2 -M geçişinde, cdc25c çekirdekte birikir ve mitoz başlangıcında MPF kompleksini aktive eder. Cdc25, cdk'lardan inhibe edici fosfat gruplarını kaldıran fosfatazdır. Cdc 25, hücre döngüsünün çeşitli fazlarına ilerlemeyi kontrol eder. (Cabadak, 2008)

MPF kompleksi hücresel bileşenlere fosfat grupları ekler. Bu fosforlanmış moleküller, M fazı için gerekli olan yapısal ve biyokimyasal değişiklikleri meydana getirirler. Nükleer membran parçalanması, kromozom yoğunlaşması ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi gibi erken mitoz olaylarını meydana getiren bir dizi proteini fosforile eder. Geç M fazında, cyc B bozular, cdk1 inaktif hale gelir ve M fazı fosforilasyonları tersine çevrilir (Klug ve diğ., 2018a). DNA'sı replike olmamış hücrelerin mitoz girişini MPF kompleksinin inaktif olması ile önlenir.

Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (cdki): G1 fazında; cyc D-cdk4/6 , G1 ve S fazında cyc E-cdk2 ve cyc A-cdk2, ve G2-M geçişinde cyc A ve cyc B-cdk1 görev alır. Düzenli kontrol edilmeyen cdk aktivitesi, artmış hücre çoğalmasına ve genomik instabiliteye neden olur. Bu durum; hücrenin kontrolsüz çoğalmasına ve kanserleşmesi ile sonuçlanır. Cdk'lar, hem aktive hem de inhibe edici fosforilasyonlar tarafından ve ayrıca cyc/cdk komplekslerini bağlayan ve aktivitelerini inhibe eden cdki tarafından düzenlenir.

Cdk'ların hücre döngüsündeki işlevlerinin düzenlenmesi ve kontrol edilmesi cdki'leri tarafından gerçekleştirilir. Cdki hücre döngüsünün negatif kontrolünde rol oynarlar. Bu inhibitörler aynı zamanda tümör süpresör görevi üstlenirler ve tümör tiplerinin büyük bir

kısımında değişikliğe uğramış durumda bulunurlar. cdk'i'leri etkiledikleri cdk ve mekanizmalara göre iki farklı alt sınıfa ayrılır. Bunlar;

1. INK4/ARF:

INK4; p15, p16, p18 ve p19'dan oluşur. Bunlar G1 fazında cdk4 ve cdk6'ya bağlanır ve cyc D ile kompleks oluşumunu inhibe ederler (Gil ve Peters, 2006).

2. Cip/Kip (Cdk Inhibitory protein / Kinase Inhibitory Protein) :

p21CIP1, p27KIP1 ve p57KIP2 olarak bilinir. Bunlar cdk 2, 4 ve 6'nın siklin A, D ve E ile yaptıkları komplekslere bağlanarak G1 ve S evreleri boyunca ilerlemenin tüm basamaklarını denetlerler. p21, DNA hasarına karşı oluşan cevapta G1 baskılanmasından sorumludur, hücreye tamir için zaman kazandırır. p27 ise antimitojenik sinyallere karşı oluşan cevapta, büyümeyi düzenleyen önemli bir moleküldür. p57; p27 ile %40 oranında homolojiye sahiptir. Proliferasyon ve diferansiyasyonda görevlidir. p21'in bazı işlevleri ise p27 ve p57 tarafından karşılanabilmektedir (Vermeulen ve diğ., 2003).

2.3.3. Hücre Siklusu Kontrol Noktaları, Büyüme Faktörleri ve D Tip Siklinlerin Kansere İlişkisi

Hücre döngüsünü kontrol eden genlerden herhangi birinin mutasyonu veya yanlış ifadesi kanser gelişimine katkıda bulunabilir. Örneğin; geç G1'deki kontrol noktası, hasarlı kromozomların kopyalanmasını önler. Geç G2'deki kontrol noktası, tam olarak kopyalanmamış kromozomların mitoz sırasında ayrılmasını önler. DNA hasarından sonra, G1/S ve G2/M kontrol noktaları, hücrelerin koordineli bir şekilde büyümelerini durdurması ve DNA onarımını başlatması için bir araç sağlar (Bunz, 2008). G1/S veya G2/M kontrol noktalarını kontrol eden genler mutasyona uğrarsa, hücre DNA hasarını tamir etmeden büyümeye ve bölünmeye devam edebilir. Bu hücreler bölünmeye devam ettikçe, hücre çoğalmasını veya metastazı kontrol eden genlerde mutasyonlar biriktirirler (Klug ve diğ., 2018a). G1/S geçişinin kontrolü, kanser hücrelerinde sıklıkla bozulur, bu nedenle potansiyel olarak otonom ve mitojenik uyarılardan bağımsız olarak çoğalabilir. G1/S geçişindeki anahtar olay, Rb'nin fosforilasyonu ve S-faz genlerinin transkripsiyonu için E2F'nin salınmasıdır. İnsan kanserinde, Rb sıklıkla işlevsel değildir, ancak bu bazı çocukluk kanserleri hariç nadiren *Rb* geninin kendisindeki bir mutasyondan kaynaklanır. Aslında Rb fonksiyonunun kaybı genellikle cdc/cdk kompleksinin uygun olmayan aktivasyonundan veya cdk'i'lerin kaybından kaynaklanabilir (Pelengaris ve Khan, 2006). İnsanlar ve maya gibi çeşitli organizmalarda, kontrol noktaları, hücreleri başarısız DNA replikasyonu ve eksik kromozomal ayrışmanın zararlı etkilerinden koruma işlevi görür.

(Bunz, 2008). Benzer şekilde, *cyc*'leri kodlayanlar gibi hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi kontrol eden genler yanlış zamanda veya yanlış seviyelerde eksprese edilirse, hücre büyüyebilir ve sürekli bölünebilir, hücre döngüsünden G0'a çıkamayabilir. Her iki durumda da sonuç, hücrenin çoğalma üzerindeki kontrolünü kaybetmesiyle sonuçlanabilir. Çeşitli araştırmalara göre; *cdk4* ve *cdk6*'da, bunları *cdki*'lere tepkisiz hale getiren mutasyonlar meydana gelebildiği, *cdk1* ve *cdk2*'nin bazı kolon tümörlerinde aşırı eksprese edilebildiği, *cdk*'lerin bazı aktive edici proteinlerinin kanserlerde rol oynadığı gözlemlenmiştir. G1/S geçişinin önemli düzenleyicileri olan *cdc25*'in deregülasyonu, *cyc/cdk* kompleksinin uygunsuz aktivasyonuna neden olabildiği bazı kanserlerde gösterilmiştir. *cdc25*'in primer meme kanserlerinin %32'sinde aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir (Pelengaris ve Khan, 2006).

Cyc D, erken G1'de *cdk4* ve *cdk6*'ya bağlanır ve hücre döngüsünün büyüme faktörü aktivasyonunun önemli bir aracısıdır. Büyümeyi uyaran sinyal, hücrede D siklin ailesinin düzeyini artırmakta ve uygun *cdk* aktive olmaktadır. Mitojenlerin reseptörlerine bağlanmasıyla aktive olan protein kinazlar sinyal ileti moleküllerini ve transkripsiyon faktörlerini fosforilleyen kinazları uyarırlar. Bu sayede transkripsiyon faktörleri aktive olarak sitoplazmadan çekirdeğe taşınır ve ilgili genleri uyarır. Transkripsiyonel faktörlerin düzenlemesini sağlayan ise E2F molekülüdür (Alberts ve diğ., 2015b). E2F, Rb proteinine bağlı halde bulunur ve Rb tarafından inaktive edilmiş durumdadır. R noktasını geçmek için E2F'nin aktive olması gerekir. *cyc D/cdk4,6* kompleksleri oluşumu sonucu Rb fosforile olur ve E2F serbest hale geçer. Bu sayede hücre R noktasını geçmiş olur ve S fazına ilerleyip DNA sentezi ve düzenleyici proteinleri sentezleyebilir (Arslan ve diğ., 2022). Bu nedenle D tipi *cyc*'lerin ekspresyon kontrolünü bozan bir mutasyon, hücreyi S fazına ilerletip, neoplastik transformasyon geliştirebilir.

Büyüme faktörlerini ve bunların reseptörlerini kodlayan genlerdeki herhangi bir mutasyon, büyüme faktörlerini onkogenik hale getirebilir. Büyüme faktörü reseptörlerinin fazla ekspresyonu, mutasyonlarından daha sık görülmektedir. Normal hücrelerde büyüme faktörleri ile ilişkili protein kinazların bağlandığı sinyal iletili proteinler vardır. Bazı onkoproteinler ise bu proteinlere bağlanarak büyüme faktörlerinin fonksiyonlarını etkisiz hale getirir veya değiştirirler. Büyüme faktörü reseptöründen sinyali alıp çekirdeğe ileten bu onkoproteinlerin başlıca üyeleri *c-ras* ve *c-abl*'dir. *Ras* gibi onkogen türleri, büyüme faktör genlerinin ve hücreyi Transformasyon Edici Büyüme Faktörü- α (TGF- α) gibi büyüme faktörlerinin aşırı ekspresyonuna neden olmaktadır. Değişmiş büyüme faktörleri uyarımları ise genellikle kanser ile sonuçlanır (Yokuş ve Çakır, 2012).

2.4. KARSİNOGENEZ

Sağlıklı bir hücrenin kanser hücresine dönüşümüne kanser genleri neden olur. Bu genler iki kısımda kategorize edilebilir.

1. Onkogenler; ilk olarak virüslerde saptanmış ve hedef hücrelerde transformasyona neden olmuş genlerdir. Proto-onkogenlerin aktive edici bir mutasyona uğraması sonucu fonksiyon ve ekspresyon seviyesinde değişiklikler meydana gelir. Bunun sonucunda onkogenler oluşur (Pelengaris ve Khan, 2006). (Proto-onkogenlerin; transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri, apoptozis baskılanması, hücre içi sinyal iletimi vb. görevleri vardır (Köktürk ve diğ., 2003)).
2. TSG'ler; onkogenlerin tersine kanser oluşumunu engelleyen bir aktivite gösterir. Bu genler hücre siklusunu inhibe edip, hücreyi farklılaşmaya iter ve apoptozisi başlatarak kontrolsüz hücre çoğalmasını engeller.

2.4.1. Onkogenler

Proto-onkogenler, genlerin ekspresyonunu uyararak transkripsiyon faktörlerini, hücre bölünmesini uyararak sinyal iletim moleküllerini ve hücre döngüsü düzenleyici proteinleri kodlar. Büyüme faktörleri, büyüme faktörlerinin reseptörleri, transkripsiyon faktörlerinin de içinde bulunduğu bu proteinler hücre fonksiyonları, özellikle hücre büyümesi ve bölünmesi için önemlidir. Hücrede sinyal iletim yollarındaki N-myc, c-myc, cdk4, ras, abl, myc vb. proteinleri kodlayan proto-onkogenlerde meydana gelen bir mutasyon sonucu; büyüme faktörlerinin aşırı ekspresyonu, hücre zarı-çekirdek arasındaki sinyal yollarının aşırı uyarımı, transripsiyon faktörlerinin çoğalması ve kontrolsüz hücre bölünmesi gibi sonuçlarla karşılaşmaktadır.

Proto-onkogenler, kromozomal translokasyon, DNA'nın nokta mutasyonu, gen amplifikasyonu, insersiyon, delesyon veya translokasyon ile aktive olarak, onkogen haline evrilmektedirler. Proto-onkogenlerde; genin yapısal bir bölgesindeki mutasyon ya da değişiklik sonucu normalden farklı fonksiyon gösteren bir protein oluşur. Bu durum genellikle SNP (Single Nucleotide Polymorphism- tek nükleotid polimorfizmi) sonucu ve insan tümörlerinde sıklıkla rastlanan onkogen anomalisi *Ras* geni mutasyonu olarak gözlemlenir. *Ras* geni mutasyonu sonucu hücre proliferasyon düzenleyicileri etkilenir ve hücre proliferasyona yönlendirilmek için çok fazla uyarılır. Sinyal aktivitesinin artması sonucu hücre çoğalması kontrol edilemez noktaya gelir. *Ras* geni gibi *myc* geninin de mutasyonu sonucu; hücrede G1 evresi kısalır ve proliferasyon artar. Birçok vakada onkogenik *myc* geninin tümör büyüme hızında artışa sebep olduğu belirtilmiştir (Pelengaris ve Khan, 2006).

Onkogenler viral enfeksiyonlara bağılı olarak ya da hücresele genlerin mutasyona uğramış formları olarak da etki gösterirler. Hücresele gen transformasyonu ilk kez retroviruslerin genomunda belirtilmiştir. Transforme olan genom ile olmayan retrovirus genom dizilimi arasında farklılıklar tespit edilmiştir. Onkogenik genlerin aşırı eksprese olması neoplastik birikim başlamasına neden olur (Alberts ve diğ., 2015a).

2.4.2. Tümör Süpresör Genler

TSG'ler, hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen veya apoptoz sürecini başlatan genlerdir. Normal hücrelerde, TSG'ler tarafından kodlanan proteinler, hücre dışı ortamdan DNA hasarına veya büyüme baskılama sinyallerine yanıt olarak hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi durdurur. TSG'ler mutasyona uğradığında veya etkisiz hale getirildiğinde, hücreler hücre döngüsü kontrol noktalarına normal şekilde yanıt veremezler veya DNA hasarı tamir edilemez boyutta ise apoptozise maruz kalmazlar. Bu, daha fazla mutasyonun birikmesine ve kanser gelişimine yol açar (Klug ve diğ., 2018b).

TSG'ler başlıca iki gruba ayrılır:

1. Bekçi (gatekeeper) tipi TSG'ler: Bu genler hücre siklusundan sorumludur ve hücreyi apoptozise yönlendiren genler bu gruba girer. Hücre çoğalmasını doğrudan baskılayan genlerdir (Deininger, 1999).
2. Bakıcı (caretaker) tipi TSG'ler: Bu genler ise hücre çoğalmasını dolaylı olarak baskılar. DNA tamirinden sorumludur ve mutasyon oluşumunu engeller. Bu genler mutasyona uğradıklarında genom boyunca mutasyonlar ortaya çıkar ve bu da genomik kararsızlığa neden olur (Deininger, 1999).

Genomik kararsızlık (microsatellit instability): DNA her bir nükleotidin karşısına eş bir nükleotid olarak kopyalanır. Bu kopyalama sırasında oluşan hatalar DNA tamir genleri tarafından onarılır. Bu tamir genlerinin bozuk olduğu durumlarda, oluşan hatalı eşleşmeler onarılamaz. Bu eşleşmeyen DNA dizileri mikrosatellit olarak adlandırılır. Mikrosatellitlerin tekrarlanıp birikmesi sonucu ise genomik kararsızlık (MSI=microsatellit instability) meydana gelir (Nojadeh ve diğ., 2018).

TSG'lerde meydana gelen somatik ve germ hattı mutasyonlar, translokasyonlar, epigenetik mekanizmalar ve kromozomal delesyonlar sonucu oluşan fonksiyon kaybı kanserleşmeye neden olabilir.

TSG'lerin mutasyonu ile kontrolsüz hücre çoğalması olabilmesi için her iki kromozomun da hasarlı geni barındırması gerekir. Yani homolog kromozomlardan birindeki allelin fonksiyon kaybı hücreyi tümör oluşumuna yatkın hale gelirken, her iki kromozomdaki allel kaybı sonucu kontrolsüz hücre çoğalması ve sonuç olarak kanser meydana gelir (Arı, 2018).

Bu gen grubunun en önemli genlerinden olan *Rb*, *p53* ve *p21 (Waf 1)* genleri mutasyonu insan kanserlerinin en önemli sebeplerindendir. Dna'da meydana gelen bir hasar sonucu hücre *p53* proteini ekspresyonunu artırır. Artan *p53* proteinleri ise *p21* geninin promotör bölgesine bağlanarak geni aktive eder ve *p21* proteini sentezlenir. *p21* ise *cdk* ve *cyc* komplekslerini bağlar. Hücre siklusunda G1/S fazı geçişini sağlamak için gerekli olan bu kompleks *p21* tarafından bağlandığı için ise siklus durur ve hasarlı DNA çoğalması engellenir (El-Deiry ve diğ., 1993).

Çalışmada incelediğimiz *p27* geni ise *cyc E/cdk2* kompleksini düzenler. Bu kompleks hücrenin G1-S fazı geçişinde kilit rol oynar. Ayrıca yapılan çalışmalarda temas inhibisyonu, cAMP gibi hücre proliferasyonunu etkileyen diğer fizyolojik ajanların da *p27* aracılığıyla etki ettiği gösterilmiştir (Sherr ve Roberts, 1995; Slingerland ve Pagano, 2000). Dolayısıyla *p27* geni hücre döngüsünde ve proliferasyonunda etkili bir TSG görevi görür.

Bir diğer TSG olan *Rb* normalde E2F'ye bağlı halde bulunur. E2F, *Rb*'ye bağlı olduğu sürece S fazını aktive edecek genleri indükleyemez. *Rb*'nin geç G1 safhasında *cyc D-cdk 4,6* kompleksleri ile fosforillenmesi sonucu E2F serbest kalır ve S fazını tetikler. *cdk*i olan *p16* ise *cyc/cdk* kompleksini inhibe ederek bu döngüye etki eder. Bu nedenle *Rb* mutasyonu, *p16* inaktivasyonu, *cyc D/cdk 4-6* kompleksinin aşırı ekspresyonu bu siklusun dengesini bozarak kontrolsüz çoğalmaya neden olur (Fiore ve diğ., 2013).

Bu genler dışında meme tümörüne neden olan *BRCA1* ve *BRCA2* TSG'leri de tespit edilmiştir. *BRCA1* ve 2 genleri, genomik stabilitenin sağlanmasında, DNA hasarında yanıtta, transkripsiyonel düzenleme ve hücresel proliferasyonda görevlidirler (Welch ve King, 2001). DNA hasar tamirinde görevli ATM ve CHK2 proteinlerini kodlar. DNA'da meydana gelen hasar bu proteinler tarafından onarılır. *BRCA* genlerinde meydana gelen bir SNP sonucu ATM ve CHK2 proteinleri sentezlenemez ve DNA hasar tamiri yapılamaz. Kusurlu genlerin çoğalması ise meme kanserine neden olur (Yoshida ve Miki, 2004).

Bir diğer TSG ise *Fosfatase ve Tensin Homolog (PTEN)*'dir. *PTEN*, yaşlanma, angiogenez, apoptozis, hücre siklusu ilerlemesi gibi önemli hücresel fonksiyonlara sahiptir.

PTEN geni hem lipid hem de proteinleri defosforilleme özelliğine sahip bir çift spesifik fosfataz kodlar (Govender ve Chetty, 2012). *PTEN* fosfoinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt sinyal yolağının negatif düzenleyicisidir ve bunu fosfotidil inositol trifosfatı (PIP3) defosforilleyerek yapar böylece PI3K aktivitesine ters olarak Akt yolağı baskılanmış olur (Milella ve diğ., 2015). Endometriyum, kolon, tiroid ve meme tümörlerinde *PTEN* kaybı ve mutasyonları bildirilmiştir (Eng, 2003; Mester ve diğ., 2013). Yapılan çalışmalar sonucu *PTEN* mutasyonunun; herediter meme kanserlerinde, sporadik meme kanserlerine kıyasla daha sık rastlandığı tespit edilmiştir. Sporadik meme kanserinde *PTEN* mutasyonunun %1-5 arası görüldüğü bildirilmiştir (Chen ve diğ., 1999; Rhei ve diğ., 1997).

2.5. KÖPEKLERDE MEME BEZİ MORFOLOJİSİ

Köpeklerde meme bezi, birleşik alveoler yapıda alt karın duvarında bulunur. Sulkus intermammarius'un her iki yanında olacak şekilde ventral torakal bölgeden inguinal bölgeye kadar, simetrik ve bilateral olarak beş çift meme bulunur. Bu meme bezleri ter bezlerinden modifiye olmuş, epiteliyal glandular dokudan ve konnektif dokudan meydana gelen, süt salgılayan deri bezleridir (Aughey ve Frye, 2001). Meme bezi musküler fibroelastik kapsüller ile çevrilir ve kapsül içindeki uzantılar sayesinde lob ve lobüllere ayrılır. Bu durum da alveoler yapının oluşmasına olanak sağlar (Evans ve Lahunta, 2012).

Meme bezlerinin gelişiminde, östrojen, progesteron (PR), ACTH, büyüme hormonu (growth hormone – GH) vb. hormonların etkisi vardır (Lamote ve diğ., 2004).

2.6. KÖPEK MEME TÜMÖRÜ PATOLOJİSİ

KMT'leri doğrudan meme bezinde başlar veya primer tümör odağından metastaz yoluyla meme bezine gelir. Dişi köpeklerde meme bezi tümörleri; miyoepitel, mezenşimal, sekretorik epitelden köken alarak gelişir. Bu gelişim sırasında hücrel farklılaşma süreci zarar görerek bu tür kitlelerin oluşumuna neden olur (Loar, 1996).

“*Tumors in Domestic Animals*” isimli kitabın meme tümörlerini sınıflandırması Tablo 2.1’ de gösterilmiştir. (Goldschmidt ve diğ., 2017):

Tablo 2.1: Meme tümörü sınıflandırması.

1.	Hiperplazi / Displazi
	Kanal ektazisi
	Lobüler hiperplazi (adenoz);
	düzenli
	salgı aktivitesi ile
	fibrozis ile
	atipi ile
	Epitelyoz
	Papillomatoz
	Fibroadenomatöz değişiklik
	Jinekomasti
2.	Bening (iyi huylu) Neoplazmalar
	Adenom – basit
	İntraduktal papiller adenom
	Duktal adenom;
	skuamöz farklılaşma ile duktal adenom
	Fibroadenom
	Miyoeptilyoma
	Kompleks adenom (adenomiyoeptilyoma)
	İyi huylu miks tümör
3.	Malign (kötü huylu) epitelyal neoplazmalar
	Karsinom – in situ
	Karsinom – basit;
	tübüler
	tübülopapiller
	kistik-papiller
	komedo karsinom
	Karsinom – mikropapiller invaziv
	Karsinom – solid
	Komedo karsinom
	Karsinom – anaplastik
	Karsinom – kompleks tip (malign epitel+benign miksepitel)
	Karsinom ve malign miyoeptilyoma
	Karsinom – miks tip
	Duktal karsinom
	İntraduktal papiller karsinom
4.	Malign epitelyal neoplazmalar – özel tipler
	Skuamöz hücre karsinoması
	Adenoskuamöz karsinom
	Müsinöz karsinom
	Lipid açısından zengin (salgılayıcı) karsinom
	İğsi hücreli karsinom;
	malign miyoeptilyoma

Tablo 2.1 (devamı) : Meme tümörü sınıflandırması.

	skuamöz hücreli karsinom-iğsi hücre varyantı
	karsinom-iğsi hücre varyantı
	İnflamatuvar karsinom
5.	Malign mezenkimal neoplazmalar – sarkomlar
	Osteosarkom
	Kondrosarkom
	Fibrosarkom
	Hemanjiyosarkom
	Diğer sarkomlar
6.	Karsinosarkom - malign mikst meme tümörü (epitel ile birlikte kemik ve/veya kıkırdak dokunun kötü huylu olması : hem epitelyal hem mezenkimal komponentin kötü olması)
7.	Meme ucunun neoplazmaları
	Adenom
	Karsinom
	Epidermal infiltrasyonlu karsinom (Paget benzeri hastalık)
8.	Meme ucunun hiperplazisi/displazisi
	Meme başı derisinin melanozu

Köpek meme tümörlerinin evrenlenmesi ise Tablo 2.2’ de gösterilmiştir. (Lana ve diğ., 2006)

Tablo 2.2: Köpek meme tümörlerinin evrenlenmesi.

T - Birincil Tümör			
T ₁ < 3 cm	maksimum çap		
T ₂ 3-5 cm	maksimum çap		
T ₃ > 5cm	maksimum çap		
N - Bölgesel Lenf Nodu			
N ₀	Histolojik veya sitolojik—Metastaz yok		
N ₁	Histolojik veya sitolojik—Metastaz mevcut		
M - Uzak Metastaz			
M ₀	Uzak metastaz saptanmadı		
M ₁	Uzak metastaz tespit edildi		
Evreler			
I	T ₁	N ₀	M ₀
II	T ₂	N ₀	M ₀
III	T ₃	N ₀	M ₀
IV	Herhangi bir T	N ₀	M ₀
V	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M ₁

Owen LN'den modifiye edilmiştir: Evcil hayvanlarda tümörlerin sınıflandırılması, Cenevre, 1980, Dünya Sağlık Örgütü.

Yapılan çalışmalar sonucu köpeklerde meme tümörlerinin malign yapıda olma olasılığının benign yapıda olma olasılığına göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Sontaş ve diğ., (2009) çalışmaları sonucu; 155 köpekte %78,3 malign meme tümörü vakası bildirilmiştir. Stratmann ve diğ., (2008) 99 meme tümörlü köpek üzerinde yaptığı çalışmada; % 73,8'nin malign, % 26,2'sinin ise benign olduğu, Itoh ve diğ., (2005) 537 meme tümörlü köpek üzerinde yaptığı bir başka çalışmada ise; % 92,9'nun malign olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Stratmann ve Itoh'un çalışmalarında karsinomların sarkomlardan daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir.

Meme tümörlü köpeklerde mastektomi ardından primer ölüm sebebi metastazdır. Lenfatik veya vasküler invazyon gösteren malign meme tümörleri olan köpeklerde tek başına cerrahi eksizyon tatmin edici olmayan sonuçlar verir, çünkü bu tümörler yüksek nüks ve metastaz oranlarına sahiptir (Simon ve diğ., 2006). Köpek malign meme tümörlerinde; uzak veya lokal organ metastazlarının erken tanı ve teşhisi, doğru tedavi yöntemi ile birleştğinde olumlu sonuçlar alınabildiği bildirilmiştir (Novosad, 2003).

2.7. KMT'lerin KLİNİK BELİRTİSİ ve TANISI

KMT'leri olan köpekler, meme bezi içinde bir veya daha fazla nodül ile veteriner hekime sunulur. Alternatif olarak, nodüller rutin bir kontrol ziyaretinde tesadüfi bir bulgu olabilir. Köpeklerin çoğu, başlangıçta klinik olarak sağlıklıdır. Metastazlar varsa, köpekler yorgunluk, uyuşukluk, kilo kaybı, nefes darlığı, öksürük, lenfödem veya topallık gibi spesifik olmayan semptomlar gösterebilir (Aydın ve diğ., 2011). Metastazların kapsamı ve yeri, klinik belirtilerin ortaya çıkışını ve şiddetini belirler. Karsinomlar epitel kökenli oldukları için birincil olarak lenfatik sistem yoluyla bölgesel lenf düğümlerine ve akciğerlere metastaz yapsa da ikincil yol olarak hematojen metastaz da yapabilir. Ancak tiroid tümörlerinde bu kural pek yoktur. Daha az yaygın olarak bildirilen diğer metastaz bölgeleri karaciğer, kemik, beyin, dalak, böbrek, cilt, göz, adrenal bezler, rahim, kalp, kas ve pankreasır (Moulton ve diğ., 1970).

KMT'lerin ilk şüphesi, hastaya ait tıbbi geçmiş (doğum sayısı, ovariohisterektomi, hormon tedavisi kullanımı, abort ve yalancı gebelik öyküsü), üreme döngüsü, varsa lezyonların sahibi tarafından ilk fark edildiği yaklaşık tarih ve önceki tümör lezyonları hakkında bilgi toplamalıdır. Daha sonra genel durum ve fiziksel muayene yapılır (Cassali ve diğ., 2011).

Fiziksel muayene, köpeğin genel muayenesini ve meme bezlerinin özel muayenesini içerir. Köpek sırt üstü yatar pozisyondayken meme bezleri palpe edilir. Köpek meme tümörleri

genellikle, çapları birkaç milimetreden 10–20 cm'ye kadar değişen sıkı, iyi sınırlı nodüllerdir. Üstteki deri ve tümörün kendisi travmatize olabilir ve ülser olabilir (Lana ve diğ., 2006; Sorenmo, 2003; Sleenckx ve diğ., 2011). Bölgesel lenf düğümlerinin palpasyonu mutlaka yapılmalıdır. Normal aksiller ve yüzeysel kasık düğümleri genellikle palpe edilemez, ancak büyümüşse hissedilebilirler (Sleenckx ve diğ., 2011) .

Vücudun sol veya sağ tarafında yer alan beş bezden oluşan bir kümeye meme zinciri denir. Klinik muayene sırasında iki meme zinciri ve lenf düğümleri araştırılmalıdır. Kanserin kesin klinik evrelemesini belirlemek için, akciğer metastazı standart tanı prosedürüdür. Bu nedenle ventrodorsal, sağ lateral ve sol lateral (VD, RL, LL) olmak üzere üç pozisyonda akciğer grafileri bakılmalıdır. Altı ila sekiz mm çapındaki akciğer lezyonları, geleneksel radyografi kullanılarak tespit edilebilir. Bilgisayarlı tomografi kullanılarak 6 mm'den küçük metastatik lezyonların erken tespiti sağlanabilir. Akciğer, malign meme bezi tümörleri olan köpeklerde uzak metastaz için en yaygın bölgedir, ancak hastanın sunduğu spesifik klinik belirtilere bağlı olarak diğer anatomik bölgelerin araştırılması için abdominal ultrason veya radyografi gibi ek testler önerilmelidir. Uzak metastazların gözlemlenmesi, olumsuz bir prognoz ile ilişkilidir (Sorenmo, 2003; Cassali ve diğ., 2011).

2.7.1. Sitolojik Muayene

Köpekte meme bezi tümörlerinin ilk tanısı için eksizyonel biyopsi önerilir, ancak aspirasyon sitolojisinin kullanımı zamanla artmış ve sitolojik ve histopatoloji sonuçları arasında yüksek düzeyde uyum tanımlanmıştır.

Sitoloji, lenf düğümü metastaz tespiti için %100 duyarlılığa ve %96 özgülüğe sahiptir (Langenbach ve diğ., 2001). Bu nedenle, metastaz varlığının kanserin klinik evrelemesini ve tedavi yaklaşımını etkilediği için ele gelen lenf nodlarının ince iğne aspirasyon sitolojisi (İİAS) önerilmektedir. Metastaz için pozitif veya şüpheli sonuç durumlarında etkilenen lenf nodlarının eksizyonu yapılmalıdır (Sorenmo, 2003; Cassali ve diğ., 2011). Klinik muayenede hacim, şekil ve kıvamda değişiklikler gösteren lenf düğümlerinde İİAS yapılmalıdır. Delinmeden elde edilen hücre yaymaları havayla kurutulmalı veya %70 etanol solüsyonunda hemen sabitlenmelidir. Numunenin kalitesini tehlikeye atabileceğinden kan, kıl ve sıvılaştırılmış malzeme ile aşırı kontaminasyondan kaçınılmalıdır (Yıldız, 2004; Cassali ve diğ., 2007).

2.7.2. Histopatolojik Değerlendirme

Kesin tanı, pleomorfizm, farklılaşma derecesi, mitotik indeks, nekroz varlığı veya yokluğu ve eksizyonun kesinliği gibi tümör histomorfolojisinin titizlikle değerlendirilmesine izin verdiği için histopatoloji raporlarına dayanmalıdır. En güvenli tanı yöntemi eksizyonel veya insizyonel biyopsilerin histopatolojik incelemesidir. Lezyon sınıflandırmasını kolaylaştırmanın yanı sıra histopatolojik inceleme, araştırmacıların deri, yumuşak doku ve çevreleyen kan damarlarının infiltrasyonunu, tümörün histomorfolojisine ilişkin ayrıntıları değerlendirmesine olanak tanır (Ferreira ve diğ., 2003).

Miyoeptelyal/bazal hücre tabakasının bütünlüğünün değerlendirilmesi meme kanseri teşhisi için önemli bir kriterdir. İn situ ve invaziv malign lezyonlar arasındaki ayırıcı tanıya yardımcı olur, özellikle mikroinvazyon noktalarının saptanması için faydalıdır (Sternlicht ve diğ., 1997; Yaziji ve diğ., 2000). Veteriner hekimlik tıbbında, alfa düz kas aktin, S100, calponin, p63 ve maspin gibi miyoeptelyal belirteçler ağırlıklı olarak tümör histogenezinin belirlenmesine yönelik araştırmalarda kullanılmıştır. Ancak invazyonu belirlemede yardımcı bir araç olarak kullanımları sınırlıdır ve az sayıda çalışma bu yönü ele almıştır (Destexhe ve diğ., 1993; Espinosa ve diğ., 2002; Gama ve diğ., 2003; Monteros ve diğ., 2005 ve Bertagnolli ve diğ., 2009).

2.8. KMT'lerde TEDAVİ

Meme kanserinin tedavisinde kullanılan yöntemler cerrahi, radyasyon tedavisi, hormon tedavisi veya kemoterapiyi içerir.

Tümör dokusunun cerrahi girişimlerle çıkarılması yalnızca küçük, invaziv olmayan, tümörler için sağaltıcı tedavidir (Sorensen ve diğ., 2003). Hastanın cerrahi tedaviye uygunluğu; lenfatik drenaj, lezyon boyutu, lezyon konumu, deri ve kas yapışması, ülserasyon gibi faktörlere bağlıdır. 0,5cm'den küçük lezyonlar bu malignite parametreleri değerlendirildikten sonra nodulektomi veya lumpektomi ile tedavi edilebilir. Diğer tümörler, etkilenen meme bezinin lenfatik drenajına bağlı olarak basit, blok veya radikal mastektomi ile çıkarılır (Brodey, 1983, Lana ve diğ., 2006, Cassali ve diğ., 2011). Büyük, çevre dokuya yapışık, histopatolojik tanı teknikleriyle ileri derecede metastazik olduğu saptanan malign tümörlerin tedavisinde cerrahi işlemlerle birlikte ek kemoterapi zorunludur. Histopatolojik değerlendirme sonrasında solid karsinom, mikropapiller karsinom, anaplastik karsinom ve karsinosarkom tanısı alan hastalara lenf nodu veya akciğer metastazı görülmesi dahi kemoterapi uygulanmalıdır. Tümörün

histolojik tipi ne olursa olsun metastazı olan hastalarda kemoterapi önerilir (Cassali ve diğ., 2011).

Sorenmo'ya (2003) göre dişi köpeklerde (hem iyi huylu hem de kötü huylu) meme tümörü östrojen reseptörünü (ER) eksprese eder. Bu reseptör için pozitif karsinomları olan köpekler hormon tedavisi için adaydır (Martin ve diğ., 1984). Benign epitelyal tümörler ve iyi diferansiye karsinomlar sıklıkla ER için pozitiflik gösterirken, kötü diferansiye ve anaplastik tümörler bu hormon reseptörü için negatif olma eğilimindedir (Ferreira ve diğ., 2009 ve Silva ve diğ., 2004).

Radyasyon tedavisi meme bezi tümörlerinin tedavisinde nadiren kullanılır. Radyasyon tedavisi, tam olarak rezeke edilmemiş tümörler için lokal hastalığın kontrolüne yardımcı olmak için kullanılabilir veya rezeke edilemeyen veya inflamatuvar meme karsinomları için palyatif olarak kullanılabilir (Novosad, 2003).

2.9. KÖPEK MEME TÜMÖRÜNÜN MODEL OLARAK KULLANILMASI

Köpek meme kanseri, insan meme kanserine benzer epidemiyolojik, klinik, morfolojik ve prognostik özelliklere sahiptir. Aynı çevre, risk faktörleri ve hastalık karakterleri benzerdir. Yaşlanma, doğum yapmamış olma, kalıtım gibi özellikler köpeklerin model olarak kullanılmasında önemlidir. Her iki türde de kanserin ilerlemesine ve gelişmesine yol açan çevresel, yaş, cinsiyet ve üreme faktörleri benzerdir (Visan ve diğ., 2016).

Köpek genom diziliminde neredeyse tüm genlerin insan genlerinin ortologları olarak tanımlaması, köpek kanserlerinin insan modelleri olarak kabul edilmesine olanak sağlamıştır. İki türde de siklin bağımlı kinaz inhibitörleri üyelerinin delesyon ve kayıpları tespit edilmiştir (Kabir ve diğ., 2015).

Steroid hormon reseptörü, Epidermal Hücre Büyüme Faktörü(EGF), proliferasyon belirteçleri, metalloproteinaz ve siklooksijenaz aşırı ekspresyonu ve p53 geni mutasyonu her iki türde meme kanserine neden olur (Nieto ve diğ., 2000, Millanta ve diğ., 2005).

İnsan ve köpek meme kanseri vakalarının epigenetik faktörlerden kaynaklandığı da yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Kabir ve diğ. (2015) yaptığı bir çalışmada, miRNA ekspresyon ifadeleri hem KMT hem de insan meme tümörü vakalarında değişiklik göstermiş ve bu değişikliğin kuvvetli bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Yine Fish ve diğ. (2018) yaptığı bir çalışmada, tıpkı insan vakalarında olduğu gibi köpeğe ait sağlıklı ve KMT vakalarına

ait meme epitel hücre kültüründen elde edilen ekzozomlarda miRNA ekspresyonlarında farklılıklar olduğu gözlenmiştir.

Köpeğin model olarak kullanılmasındaki bir diğer avantaj ise insanlarda biyopsi yapılması nadir ya da olanaksız olan dokuların, köpeklerde beş çift meme bezi olmasından kaynaklı fazla sayıda örnek tespiti yapılabilir olmasıdır. Ayrıca büyük tümör boyutunun, lenf nodu metastazlarının varlığının ve ileri klinik evrenin her iki türde de daha kötü prognoz ile ilişkili olması köpeğin model olarak kullanılmasında önemli faktörlerdendir (Namagerdi ve diğ., 2020).

Ayrıca, her iki türde de *P450* sitokromunun benzer rolü nedeniyle, köpek modeli, insan antikanser ilaçlarını test etmek için klinik deneylerde kullanılabilir (Barh ve diğ., 2010).

2.10. KÖPEKLERDE MEME TÜMÖRÜ ETİYOLOJİSİ

Evcil hayvanlar arasında, köpekler meme tümörü insidansı en yüksek olan hayvanlardır. Köpeklerde meme tümörünün yaş, ırk, beslenme (obezite), hormonlar, genetik yatkınlık, büyüme faktörleri ile yakından ilgili olduğu görülmüştür (Sleeckx ve diğ., 2011).

2.10.1. Yaş

Meme tümörlerinin yaş ile olan ilgisi çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir. Buna göre; 3-4 yaşındaki köpeklerde; %4; 4-8 yaşındaki köpeklerde %29; 8 yaş üstünde ise %67 oranında görüldüğü bildirilmiştir (Gültiken ve Vural, 2007). Zatloukal ve diğ. (2005) ise benign tümörler için en riskli yaşı 10, malign tümörler için 13 olduğunu bildirmiştir. Jain (2006), köpek meme tümörlerinin en yüksek insidansını 8-10 yaş aralığında olduğunu (%30,00), ardından 10-12 yaş (%22,50), 4-6 yaş (%17,50) ve 6-8 yaş (%12,50) olarak takip ettiğini bildirmiştir. En düşük insidansı ise 2 yaşından (%2,50) küçük köpeklerde gözlemlemiştir. Sharda (2007), 1 ile 15 yaş arasındaki köpeklerde yaptığı bir çalışmada; ortalama yaşı 8,8 olarak gözlemlemiştir. En fazla vaka sayısının 8-10 yaş grubunda (%28,6), en az vaka sayısının ise 4 yaş altındaki (%3,57) köpeklerde görüldüğünü bildirmiştir. 15 yaşın üzerinde herhangi vaka bildirilmemiştir. Benign neoplastik lezyonların malign olanlara (ortalama yaş 9,7) göre daha erken yaşta (ortalama yaş 6,3) ortaya çıktığı da gözlenmiştir. Benzer şekilde Gupta (2008), köpeklerde meme tümörü görülme yaşının 2-16 arasında değiştiğini ve ortalama yaşı 10,8 olduğunu bildirmiştir. En yüksek insidansın 10-12 yaşlarında olduğunu belirtmiştir ve 2 yaşın altındaki hayvanlarda meme tümörüne ait hiçbir vaka kaydedilmemiştir. Başka bir çalışmaya göre meme bezi

tümörlerinin görüldüğü yaş ortalama 10-11 olarak bildirilmiştir (Argyle ve diğ., 2008). Devarathnam ve diğ. (2021) yaptığı çalışmada ise; en yüksek insidans 7-9 yaş grubunda (%41,67) gözlenmiş olup, bunu 10-12 yaş (%33,33) ve 4-6 yaşın (%19,44) izlediği bildirilmiştir. En düşük insidans (%5,56) 13-15 yaş grubunda görülmüş olup, 1-3 yaş grubunda herhangi bir insidans gözlenmemiştir. Gupta ve diğ. (2012) köpeklerde meme tümörünün en sık görüldüğü yaşın ırklara göre değişebileceğini belirtmiştir. Büyük ırk köpeklerin yaşam süresi küçük ırklara göre daha az olduğundan; büyük ırklarda meme tümörü görülme yaş aralığının daha düşük olduğunu bildirmiştir.

2.10.2. Irk ve Genetik Faktör

Yapılan çalışmalarda; Dachshund'da %42, Poodle'da %15, Spaniel'de %10,8 ve Alman Çobanları'nda ve diğer ırklarda %10'luk bir meme tümörü insidansı bildirilmiştir (Gupta ve diğ., 2012). Owen (1991), Dachshunds ve Cocker Spaniel köpeklerinin meme tümörü geliştirme riskinin yüksek olduğunu, Chihuahualar'da ise riskin daha az olduğunu gözlemlenmiştir. Boldizsar ve diğ. (1992), Pulis'in (Macaristan menşeli bir ırk) meme tümörüne en yatkın ırk olduğunu bildirmiştir. Stone (1994), Pointer, Retriever, English setter, Spaniel, Poodle, Boston Terrier ve Dachshunds gibi av köpeklerinin, köpek meme tümörü insidansının daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Sandhu (1995) ve Gill (1997), Spitz ırklarında köpek meme tümörlerinin insidansının yüksek olduğunu, ardından Doberman Pincher'in takip ettiğini gözlemlemiştir. Goldschmidt (1998), olgunlaşmamış Poodle, Yorkshire terrier, Chihuahua ve Malta Beyazı gibi küçük köpek ırklarında being meme tümörü insidansının yüksek olduğunu bildirmiştir. İngiliz Setter, Chihuahua, Minyatür Poodle ve Afgan tazi ırklarının ise yüksek oranda malign meme tümörü insidansına sahip olduğunu belirtmiştir. Golden Retriever, Rottweiler ve Boxer ırklarının da meme tümörü geliştirme riskinin minimum olduğunu gözlemlemiştir. Atalay ve Aydın (2001) Poodle, Caniche, Teriyer, Alman Çoban, Pinschers, melez köpeklerde meme tümörlerinin oluştuğunu ve diğer köpek ırklarına göre Poodle ve Caniche ırklarında malign meme tümörlerinin daha sık görüldüğünü gözlemlemişlerdir. Palta (2000), Samoyed/Beyaz Spitz ırkının en sık meme tümörü görülen ırk olduğunu (%34,10), ardından Doberman (%19,65) Alman Çoban (%9,83), Labrador Retriever (%7,57) Pointer, (%5,78) Melez (%5,20), Dachshund (%2,89), Boxer (%2,31), Cocker Spaniel (%1,73), Lhasa Apso (%1,16), Tibet Mastifi, Poodle ve İrlandalı Setter ırkları (%0,58 her biri) izlediğini bildirmiştir. Benzer şekilde Nayyar (2002), Samoyed/Beyaz Spitz ırkında en yüksek meme tümörü insidansını belirtmiş (%33,33), ardından ise Doberman (%22,22), Melez

(%8,33), Gaddi ve Pointer (%5,55) ve Danua, Alman Çoban, Labrador Retriever, Bull Terrier ve Cocker Spaniel' in (her biri %2,78) takip ettiğini gözlemlemiştir. Bala (2005) Samoyed/Beyaz Spitz ırkının (%38,46) meme tümörlerine daha yatkın olduğunu, bunu Labrador Retriever (%23,07), Alman Çoban (%19,23), Doberman (%7,69) ve Dalmaçyalı'nın (%3,85) izlediğini gözlemlemiştir. Benzer şekilde en yüksek köpek meme tümörü insidansı Samoyed/Beyaz Spitz'de (%35,05), ardından Doberman (%15), Alman Çoban Köpeği (%12,50), Labrador (%10) ve Gaddi, Pointer, Irish Setter ve Lhasa apso'da (her biri %2,5) rapor edilmiştir (Jain, 2006). Sharda'nın (2007) çalışmasında, Pomerian cinsinde (%36,36) en sık meme tümörü görüldüğünü, bunu Alman Çoban (%24,24), Labrador Retriever (%12,12), Spitz (%9,09) ve Dachshund (%6,06) izlediğini bildirmiştir. Gupta (2008) ise köpek meme tümörü vakalarını Samoyed/Spitz ırkında (%57,5) en yüksek insidansa sahip olduğunu kaydetmiştir (Gupta ve diğ., 2012). Salas ve diğ. (2015) KMT'lerin belirli alt tiplerinde ırk yatkınlığı bildirilmiş; Poodle ve Schnauzer ırkları, kompleks ve tübüler tip karsinomlarla en güçlü ilişkiyi gösterirken, Cocker Spaniel'ler karsinosarkom ve mezenkimal kökenli tümörlerle daha yüksek bir uyum göstermiştir. Malta Cinsi, esas olarak insan meme kanserinde de en yaygın tip olan epitelial tümörlerle ilişkilendirilmiştir. Devarathnam ve diğ. (2021) çalışmasında ise, bildirilen tüm köpek meme tümörü vakaları arasında, Spitz, Labrador ve Mongrel gibi hastaneye başvuran sadece üç ırkta insidans gözlenmiştir. Olguların çoğunluğu Spitz ırkında (%61,11), ardından Labrador (%25) ve en düşük insidans ise melez ırkta (%13,89) görülmüştür.

Lee ve diğ. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada; KMT oluşumunda *PIK3CA* geni mutasyonu Shih-Tzu (%50), Poodle (%37,5) ve Malta (%38,9) ırklarında , Schnauzer, Dachshund (%25), Yorkshire Terrier (%0) ve Cocker Spaniel (%16,7) ırklarından daha etkili bulunmuştur.

Kadınlarda *BRCA1* veya *BRCA2* (*BRCA1/2*) genlerindeki kalıtsal mutasyonların yaşam boyu meme kanserine yakalanma riskinin %56 ila %84'e neden olduğu bilinmektedir. Rivera ve diğ. (2009) yaptığı bir çalışmada, İngiliz Springer Spaniel'de KMT'ler ile on insan meme kanseri geni incelenmiştir. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin bu cinste KMT'lerin gelişiminde rol oynadığı ortaya çıkmıştır. Ayrıca Enginler ve diğ. (2014) 25 meme tümörü taşıyan ve 10 adet tümörsüz köpekten elde edilen örnekler ile yaptıkları bir çalışmada, sekansların karşılaştırılması sonucu *BRCA1*'in intron 8 ve ekson 9'daki iki SNP'nin ve *BRCA2*'nin ekson 24 ve ekson 27'deki iki SNP'nin, ilk kez köpeklerde meme tümörü gelişimi ile ilişkili olabileceği tespit edilmiştir.

2.10.3. Beslenme

Yağlı ve besin dengesi olmayan ev yapımı yemekler ile beslenen köpeklerin, ticari evcil hayvan mamaları ile beslenenlere göre meme tümörlerine daha yatkın oldukları bildirilmiştir. Bunun sebebi ise ev yemekleri ile beslenen köpeklerin obeziteye daha yatkın hale gelmesine bağlı olarak, KMT insidansının daha fazla olmasına neden olabilir (Varma ve diğ., 2021). KMT'lerin varlığı ile ilişkili diğer faktörler, yüksek miktarda sığır eti ve domuz eti alımı ve düşük tavuk alımıdır (Alenza ve diğ., 2000).

2.10.4. Hormonlar ve Büyüme Faktörleri

Hormonal kökenli kanserlerin oluşumundaki mekanizma; neoplazinin, normal büyümesi ve işlevi bir ya da daha fazla steroid veya polipeptit hormonu tarafından kontrol edilen hedef organın uzun süreli hormonal stimülasyonunun sonucu olduğu düşünülmektedir. (Bernstein ve diğ., 2017). Progesteron, östrojen gibi hormonların hayvanlara dışarıdan verilmesinin meme tümörü riskini artırdığı belirtilmiştir (Giles ve diğ., 1978).

Puberteye ulaşmamış dişilerde meme dokusu henüz tam olarak gelişimini tamamlamamıştır. Gelişimini tamamlamayan meme dokusunun ise çevresel karsinojenlere yatkınlığı daha fazladır. Bu olgunlaşmamış meme dokusu hücreleri karsinojenler tarafından oluşturulan genetik kodlarındaki hasarları onaramazlar. Bu nedenle; ilk östrüsten önce ovariohisterektomi yapılan köpeklerde meme tümörü riski %1'dir. Yaş ilerledikçe ovariohisterektominin koruyuculuğu azalır. Birinci östrus sonrası ovariohisterektomi ve tümör insidansı; 1/12 ikinci östrus sonrası ise ovariohisterektomi ve tümör insidansı; 1/4'e düşer. Östrus siklusu sayısı arttıkça meme tümörü gelişme riski artar (Schneider ve diğ., 1969).

Ayrıca meme tümörlerinde östrojen ve progesteron reseptörleri tanımlanmıştır. Östrojen, epitel hücre proliferasyonunu ve duktal morfogenezini teşvik ederek normal meme epitelinin gelişimi için gereklidir, ancak aynı zamanda ER ekspresyonu çoğu meme kanserinin büyümesinde önemli bir rol oynar (Bocchinfuso ve Korach, 1997; Colditz, 1998). Epidemiyolojik kanıtlar, meme kanseri riskinin menopoz sonrası östrojen seviyeleri ile pozitif ilişkili olduğunu göstermektedir (Clemons ve Goss, 2001). Östrojen etkileri esas olarak hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için DNA'daki östrojene duyarlı elementleri bağlayan ER'ler ERa ve ERb olmak üzere iki nükleer ligandla aktive olan transkripsiyon faktörlerine bağlanma yoluyla aracılık eder (Yager ve Davidson, 2006). Normal memede, ERa lümen epitel hücrelerinde bulunur, ancak stromada bulunmaz, oysa ERb'nin hem lümen hem de miyoepitelyal hücrelerde ve ayrıca fibroblastlar, endotel hücreleri gibi stromal hücrelerde

eksprese edildiği gösterilmiştir (Petersen diğ., 1987; Speirs ve diğ., 2002). ERa meme kanserinin anahtar düzenleyicisidir ve ekspresyon durumu meme kanseri alt tiplerinin sınıflandırılmasında diğer reseptörlerle birlikte kullanılmaktadır (Perou ve diğ., 2000; Simoes ve diğ., 2015)

Progesteronun, hamilelik sırasında meme bezinin hem pubertal yan dallanması hem de lobüler alveolar gelişimi için çok önemli olduğu gösterilmiştir (Lydon ve diğ., 1995, Briskin, 2013). Farelerde yapılan çalışmalar, meme bezi gelişiminin, meme kök hücre havuzunun progesteron kaynaklı genişlemesinden kaynaklandığını ve ayrıca PR'nin (progesteron reseptörü) kanserojen kaynaklı meme tümörü oluşumu için önemli olduğunu göstermiştir (Lydon ve diğ., 1999; Asselin-Labat ve diğ., 2010; Joshi ve diğ., 2010). Progesteron sinyaline, iki izoformu (PRA ve PRB) içeren PR aracılık eder (Kastner ve diğ., 1990). İzofoma özgü fare mutantları, PRB'nin meme bezi morfogenezini, PRA'nın ise ovaryum fonksiyonları için önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Mulac-Jericevic ve diğ., 2000; 2003). PRB kaybı, atipi veya malignite gelişimi ile ve *BRCA1* veya *BRCA2*'de germ hattı mutasyonları olan kadınlarda görüldüğü bildirilmiştir (Mote ve diğ., 2002).

Östrojenler duktal büyümeyi desteklerken, progestinler, salgı ve miyoepitelyal hücrelerin hiperplazisi ile meme bezlerinin lobülo-alveolar gelişimini indükler (Rutteman, 1990). Dişilerde olduğu gibi kadınlarda da ovaryum steroidleri, fizyolojik koşullar altında normal meme dokusunun büyümesini uyarır. Epitel üzerindeki proliferatif etkileri neoplastik çoğalma için koşullar yaratabilir (Thomas, 1984; Genuth, 1998; Sorenmo ve diğ., 2000; Queiroga ve diğ., 2005). Steroidal hormonlar meme karsinogenezinin erken evrelerinde hedef hücreler üzerinde etki gösterirler, ancak hastalığın sonraki evrelerinde uyarıcı etkilerini kaybederler (Alenza ve diğ., 2000).

Köpek östrus döngüsünün uzun luteal fazı sırasında, meme bezi yüksek konsantrasyonda progesterona maruz kalır (Schaefer-Okkens ve diğ., 2005). Progesteron kaynaklı KMT'lerde yer alan olası mekanizmalar, meme bezi içinde GH üretiminin yukarı regülasyonunu içerir (Mol ve diğerleri 1996; Queiroga ve diğ., 2008.) GH'nin meme kanseri oluşumu sürecinde ilk adım olarak meme kök hücrelerinin proliferasyonunu uyardığı tahmin edilmektedir (Sleeckx ve diğ., 2011).

Veteriner hekimlik uygulamalarında östrusu önlemek veya yalancı gebelikleri tedavi etmek için kullanılan östrojenler ve progestinlerin (medroksiprogesteron asetat) kombinasyonları, meme neoplazisi insidansını artırabilir. Sağlıklı köpeklerde

medroksiprogesteron asetat ve proligestron uygulamasının her ikisi de aşırı GH üretimine, adrenal korteksin baskılanmasına ve displazilerin ve iyi huylu meme tümörlerinin gelişmesine neden olur (Alenza ve diğ., 2000).

2.10.5. Meme Tümörüne Yatkınlık Oluşturabilecek Aday Genler

Meme tümörlerinin bir diğer nedeni ise bazı kromozomal anormalliklerdir. *FGFR2*, *LSP1*, *MAP3K1* ve *TOX3* genlerinin, yakın zamanda genom çapında bir ilişki çalışmasında insanlarda meme kanseri riskinde hafif bir artışla ilişkili olduğu bulunmuştur (Easton ve diğ., 2007). *RCAS1* ve *p53*'ün meme kanseri de dahil olmak üzere bir çok kanser türüyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Rousseau, 2002). *ERBB2*'nin insan meme kanserinde ekspresyonu değiştirdiği gösterilmiştir ve *CHEK2* genindeki bir delesyonun meme kanseri riskinde 2 ila 3 kat artışla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Meijers-Heijboer, 2002; 2003). KMT ayrıca karmaşık bir geçmişe sahip heterojen bir hastalık olarak kabul edilir. KMT'nin kökeninin multifaktöriyel olduğu, çoklu major ve minor genler ile çevresel faktörler arasındaki etkileşimine bağlı olduğu öne sürülmüştür (Rivera ve diğ., 2009).

Rivera ve diğ. (2009) yaptığı bir çalışmada; English Springer Spaniels ırkı köpeklerde KMT'lerle ilişki için 10 insan meme kanseri genini (*BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *ERBB2*, *FGFR2*, *LSP1*, *MAP3K1*, *RCAS1*, *TOX3* ve *TP53*) değerlendirmiştir. *BRCA1* ve *BRCA2*, KMT ile önemli ölçüde ilişkili bulunmuştur. Malign vakalarda *BRCA1* ile daha güçlü bir ilişkiye sahip olduğu bildirilmiştir. *FGFR2* için ise sınırda ilişki görülmüştür.

2.11. P27 Kip1

p27Kip1, köpekte 27. kromozomda lokalize olan *CDKN1B* (*KIP1*) olarak tanımlanan gen tarafından kodlanan bir cdk'i'dir. 198 aminoasitten oluşur (Vecchione ve diğ., 2004). P27 Kip1, önemli bir hücre siklus düzenleyicisidir. Aynı zamanda TSG görevi de görür. Literatürlerde birçok çalışmada *p27*, *p27Kip1* ve *CDKN1B* gen isimleri birbirinin yerine kullanılmıştır. Bu çalışmada da *p27* ve *CDKN1B* isimlendirmeleri birbirinin yerine kullanılmıştır.

Sinir, çizgili kas, olgun alyuvar ve eşey hücreleri gibi bölünmeyen hücrelerde, *p27*, cyc D/cdk4 ile kompleks halinde bulunur. Hücreler, sıklusa girmek için uyarıldığı zaman, cyc D/cdk4 kompleksinin miktarı giderek artar ve *p27*'nin miktarını geçerek onun inhibitör etkisini engeller. TGF- β ile uyarılan hücrelerde ise *p27*, cyc E/cdk2 kompleksine de bağlanıp her iki

kinazın aktivasyonunu kaybetmesine ve hücre siklusunun G1'de durmasına sebep olur. *p27*, bulundukları dokuya herhangi bir zarar gelmeden uyarılmayan inaktif hücrelerde (hareketsiz hücre); yüksek miktarda bulunur ve ekspresyonu, S-fazına girdikten sonra hızla azalır. Cyc E/cdk2 ve cyc A/cdk2 komplekslerinin inhibitörüdür. *p27*, tercihen cyc E/cdk2 ve cyc A/cdk2 komplekslerine bağlanır ve bunları inaktive eder, böylece S fazına girişi engeller. *p27* cyc A/cdk2 kompleksinin kristal yapısı, cyc ve cdk alt birimleri için ayrı bağlanma yerleri gösterir. Bu kompleksleri, N-terminal ucu ile yakalayıp, cdk'daki katalitik yarığı tıkar. Böylece ATP bağlanmasını engellemiş olur (Macri ve Loda, 1998; Sheaff ve diğ., 1997)

P27'nin düzenlenmesi, transkripsiyonel ve posttranslasyonel olarak yapılmaktadır. Transkripsiyonel olarak PI3K-Akt yoluyla fosforilasyon şeklinde, posttranslasyonel düzenlenme ise ubiquitin proteozom yolu ile yapılmaktadır (Macri ve Loda, 1998; Ishida ve diğ., 2000).

PI3K-Akt yolu fosforilasyon ile gerçekleşir. Fosforilasyon mekanizmasındaki bozukluklar ise sitoplazmik birikime neden olur ve bu durumda da *p27*'nin çekirdekteki fonksiyonu baskılanır (Kim ve diğ., 2009).

Ubikitin proteozom yolu; değiştirilmemiş genlerden türetilen fonksiyonel olarak normal proteinlerin hızlı yıkımı, hücre bölünmesinin kontrolünde yer alan anahtar düzenleyici proteinlerin geri dönüşümsüz olarak inaktive edildiği güçlü, hızlı ve oldukça spesifik bir yoldur. Ubikitin molekülü; anormal bir hücrenin malign hücreye dönüşümünde rol oynayan hücre içi sinyaller, hücre proliferasyonu, bağışıklık yanıtı ve transkripsiyonun düzenlenmesi gibi birçok moleküler hücre içi düzenleme mekanizmasına katılır. Ubikitin, 76 aminoasitlik küçük bir peptittir. Hedef substratlara E1 (ubikitin aktifleştirici enzim), E2 (ubikitin konjuge edici enzimler) ve E3 (ubikitin ligaz) denen 3 enzimin sırasıyla etkinleşmesi ile bağlanan ve onları proteozom adlı subselüler organelle hedef gösteren bir moleküldür. Proteinlerin katlanması ya da protein komplekslerinin oluşumu endoplazmik retikulumda gerçekleşir. Yanlış katlanan proteinler endoplazmik retikulum tarafından tanınır, çoklu ubiquitinlerle işaretlenir (poliubikitinlenme) ve 26S proteozom aracılığıyla yıkılır. Proteozom inhibitörlerinin eklenmesi üzerine *p27*'nin hücre içi miktarının arttığı ve *p27*'nin intakt hücrelerde ve hücre lizatlarında ubiquitin eklenmiş halde bulunduğu tespit edilmiştir. Büyüyen hücrelere kıyasla hareketsiz hücrelerde *p27*'ye ubiquitin eklenmesi aktivitesinde bir azalma vardır, bu hücrelerde *p27*'nin daha uzun yarılanma ömrü hesaba katılır (Nakayama ve Nakayama, 2006).

P27 proteini, hem tümör süpresör hem de onkojenik bir gen olarak tanımlanabilir. Düzenlenmesi ve hücredeki yerleşimi biyolojik görevini etkiler. Fosforilasyonu ve/veya sitoplazmik yerleşimi inaktive olmasına sebep olabilir. Tümör baskılayıcı özelliği, çekirdekteki yerleşimine ve *cyc E/cdk2* kompleksleriyle ilişkisine bağlıdır. Onkojenik aktivitesi ise bu ilişkiden bağımsız, sitoplazmik yerleşimle ve çok sayıda fosforilasyon bölgesinin düzenlenmesiyle ilişkilidir (Polyak, 2006, Vervoorts ve Lüscher, 2008).

2.11.1. Tümör Süpresör Gen Olarak *p27*

Yapılan bir çalışmada, *p27* proteini yetersiz eksprese olan fareler %100 penetrasyona sahip hipofiz pars intermedia tümörleri geliştirmiştir (Fero ve diğ., 1996; Kiyokawa ve diğ., 1996). Hem *p27* iki alleli de işlevsiz homozigot hem de *p27* heterozigot farelerin, y-ışınlanması veya kimyasal bir kanserojen ile tehdit edildiğinde çoklu dokularda tümörlere yatkın olduğu gösterilmiştir (Fero, 1998). Bu nedenle *p27*, farelerde çok dokulu bir tümör baskılayıcıdır. *p27* heterozigot farelerdeki tümörlerin moleküler analizleri, kalan vahşi tip alelin mutasyona uğramadığını ve susturulmadığını göstermektedir. Bu nedenle, *p27*, tümör baskılanması için haplo-yetersizdir. Ek olarak, *p27* onkojenik proteinler olan adenoviral E1A ve HPV E7'nin hedefidir. Çünkü Adenoviral E1A (Mal ve diğ., 1996) ve Human Papilloma Viral E7 (Zerfass-Thome ve diğ., 1996) onkoproteinlerinin, *p27*'yi *cyc-cdk* komplekslerinden ayırarak inaktive ettiği bildirilmiştir.

Bununla birlikte, geleneksel TSG'lerin aksine, Southern blot ve PCR-SSCP ile çok sayıda insan kanseri ve insan hücre hattında analiz edilen *p27* geni, homozigot delesyonlar veya nokta mutasyonları göstermemiştir (Macri ve Loda, 1999).

2.12. *P27* ve MEME TÜMÖRÜ

Meme tümörü teşhisindeki en yararlı klinik olgular; tümörün boyutu, histopatolojik derecesi veya farklılaşma durumu, metastatik meme kanseri tarafından tutulan aksiller lenf nodlarının sayısı, östrojen reseptör durumu ve hastanın yaşıdır. Fakat meme kanseri için yeni moleküler prognostik belirteçlerin ve tedaviye potansiyel yanıtın moleküler göstergelerinin tanımlanmasına ihtiyaç vardır. *p27* protein seviyeleri ve lokalizasyonu, meme kanserinde prognostik kullanıma sahip gibi görünmektedir ve hormonal tedavilere yanıtı tahmin etmeye yardımcı olabilir. Normal insan meme epitel hücrelerinin çekirdeklerinde güçlü *p27* immün boyama gözlenirken, meme kanserinde *p27* protein kaybı sıklıkla görülür. Köpekler ve insanlar

üzerinde yapılan bazı araştırmalar primer meme kanserlerinde p27 çalışmaları bildirmiştir (Alkarain ve diğ., 2004).

Yang ve diğ. (2017) 84 meme tümörlü köpek üzerinde yapılan bir çalışmada; immünohistokimya tahliline göre, köpek malign meme bezi tümöründe p27 proteininin ekspresyon hızının, iyi huylu tümördekinden daha düşük olduğunu bildirmiştir. Bu, p27 ekspresyon seviyesinin, malign köpek meme bezi tümörünün derecesi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir.

Kim ve diğ. (2017) tarafından 11 yaşın üzerinde 79 köpek ile yapılan çalışmada; metastazik potansiyeli olan köpek meme tümörlerinde, p27'nin negatif ekspresyon gösterdiği belirtilmiştir.

Tan ve diğ. (1997) tarafından yapılan çalışmada; tümör çapı 1 cm'den küçük meme kanserli 202 hastada, immünohistokimya ile pozitif boyanan tümör çekirdeklerinin %50'sinden daha azı düşük nükleer p27 protein düzeylerinin, ölüm riskini 3,4 kat artıran prognostik bir faktör olduğunu gözlemlemiştir.

278 primer meme kanserli hasta ile yapılan bir çalışmada çok değişkenli analizde, azalmış p27 seviyesi genel sağkalımın kötü olduğunu göstermiştir. Hem düşük p27 hem de yüksek cyc E proteinleri gösteren hastaların en yüksek ölüm oranına sahip olduğu belirtilmiştir. (Porter ve diğ., 1997).

Catzavelos ve diğ. (1997), 168 meme kanserli hastada, azalmış p27 seviyesinin, hastalıksız sağkalımın azalmasının güçlü bir bağımsız öngörücüsü olduğunu ve hastalığın nüksetme riskini 2,7 kat artırdığını tespit etmiştir. Düşük p27 seviyesi gösteren meme tümörlerinin, yüksek cyc E/cdk2 aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Meme kanserlerinde cyc E ve çekirdekteki p27 seviyeleri arasında ters bir ilişki gözlenmiştir.

Sonraki birkaç primer meme kanseri çalışması, düşük p27 seviyeleri ile yüksek tümör derecesi, negatif östrojen reseptör durumu ve düşük cyc D1 ekspresyonu arasındaki korelasyonu doğrulamıştır (Alkarain ve diğ., 2004).

198 meme kanseri hastası üzerinde yapılan bir başka çalışma, p27'nin doku ekspresyonunun 5 yıllık meme kanserine özgü sağkalımı tahmin etmede önemli olacağı sonucuna varmıştır (Leivonen ve diğ., 2001).

Lenf nodu metastazı varlığı meme kanseri için en önemli prognostik değişkenlerden biridir. Daha iyi genel prognozlarına rağmen, lenf nodu negatif meme kanserleri %30'a varan

nüks ve ölüm oranı göstermiştir. Wu ve diğ. (1999) 97 adet lenf nodu metastazı olmayan meme kanserli hasta üzerinde yaptıkları çalışmada; azalan p27 seviyesini hastalıksız ve genel sağkalım için sırasıyla 5.7 ($p = 0.001$) ve 3.7 ($p = 0.049$) göreceli riski olan bağımsız bir prognostik faktör olarak tespit etmiştir. Lenf nodu negatif meme kanseri olan 118 kadında, azalmış p27seviyesi, 10 kat artmış hastalık nüksü riski ile ilişkilendirilmiştir(Chappuis, 2000).

Yapılan tez çalışması TSG görevine sahip p27 proteinini kodlayan köpek *CDKN1B* genindeki polimorfizmlerin köpeklerde meme tümörüne yatkınlık ile ilişkili bir aday gen olabileceği hipotezine dayandırılmıştır. Çalışmada; tümörlü köpeklerden alınan kanlardan izole edilen DNA örneklerinde varyasyonlar taranarak tümörle ilişkili olabilecek varyantların tespit edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen veriler ışığında, köpek ve insan meme tümörü vakalarında p27 proteininde benzer özellikte polimorfizmlerin bulunup bulunmadığının ve bu olası polimorfizmlerin türler arasında benzerlik gösterip göstermediğinin araştırılması, bulunan sonuçlar doğrultusunda KMT vakalarının insan meme tümörü vakalarına model olarak sunulup sunulamayacağı tartışılması hedeflenmiştir.

3. YÖNTEM

3.1. HAYVAN MATERYALİ ve DNA ÖRNEKLERİ

Çalışmada yer alan vaka ve kontrol grupları İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi-Cerrahpaşa Doğum ve Jinekoloji Kliniği'ne gelen köpeklerden oluşmaktadır. Meme tümörü şüphesi ile gelen 39 adet dişi köpekten sitolojik ve histopatolojik incelemeler sonucunda 27 tanesine malign meme tümörü tanısı konmuştur. Sonuç olarak bu çalışmada 27 adet malign meme tümörü tanısı konulmuş dişi köpek ve 10 adet normal meme dokusu olan köpekten kan alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Meme tümörü şüphesiyle kliniğe gelen hayvanlardan operasyona girmeden önce vena cephalica antebrachii'den uygun vacutainer yardımı ile EDTA'lı tüpe 5ml kan alınmıştır. Kan örnekleri DNA izolasyonuna kadar -80 °C'de saklanmıştır. Çalışma; 02/03/2018 tarih ve 2018/08 sayılı İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu kararı ile onaylanmıştır. Toplam 27 adet malign meme tümörlü köpeğe (ırk, yaş, tümörün bulunduğu meme lobu ve tümör sınıfı) ve 10 adet kontrol grubuna ait veriler kayıt altına alınmıştır; bu veriler Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de verilmiştir. DNA örnekleri çalışmanın laboratuvar aşamasına kadar -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.1: Kontrol grubuna dahil edilmiş dişi köpeklerin kontrol numarası, protokol numarası, ırk, yaş, kilo bilgileri.

Kontrol no.	Protokol no.	İrk	Yaş	Kilo	OHE
Kontrol 1	1	Melez	12 yaş	22 kg	-
Kontrol 2	2	Melez	10 yaş	18 kg	-
Kontrol 3	3	Collie	11 yaş	18 kg	-
Kontrol 4	4	Melez	13 yaş	32 kg	-
Kontrol 5	5	Kangal	10 yaş	28 kg	-
Kontrol 6	6	Akbaş	10 yaş	35 kg	-
Kontrol 7	7	Kangal	14 yaş	38 kg	-
Kontrol 8	8	Alman Çoban	10 yaş	23 kg	-
Kontrol 9	9	Alman Çoban	9 yaş	23 kg	-
Kontrol 10	10	Melez	11 yaş	17 kg	-

Tablo 3.2: Vaka grubuna dahil edilmiş köpeklerin vaka numarası, protokol numarası, ırk, yaş, kilo, doğum sayısı (DS), tümör lokalizasyonu(TL), ovariohisterektomi durumu (OHE) ve tümör sınıfı bilgileri.

Vaka no.	Protokol no.	İrk	Yaş	Kilo	Doğum sayısı	OHE	Tümör lokalizasyonu	Tümör sınıfı
1	1	Terrier	15 yaş	10kg	1	-	Sol kranioabdominal Sol kaudoabdominal Sol inguinal	Adenokarsinom Adenokarsinom Miks karsinom
2	3	Yorkshire Terrier	11 yaş	5 kg	-	-	Sol toraka kranial Sol-sağ kranioabdominal Sol inguinal	Tubuler adenokarsinom Kompleks karsinom Kompleks karsinom
3	6	American Cocker Spaniel	13 yaş	18 kg	-	-	Sağ kaudotorakal	Kötü diferensiye sarkom
4	7	Alman Çoban Köpeği	10 yaş	30 kg	6	-	Sol kraniotorasik Sol inguinal Sağ kaudotorasik	Tubuler karsinom Yassı hücreli karsinom Karsinoma- miks tip
5	9	Alman Çoban Köpeği	7 yaş	27 kg	-	-	Sol kranioabdominal Sağ kaudotorasik	Anaplastik karsinom Tubuler karsinom
6	10	Melez	13 yaş	12 kg	-	-	Sol kranioabdominal Sağ kranioabdominal Sol kaudoabdominal	Tubulopapiller karsinom Kompleks karsinom Tubulopapiller karsinom
7	11	American Cocker Spaniel	8 yaş	15 kg	-	+	Sağ kranioabdominal	Adenokarsinom
8	12	Terrier	8 yaş	10 kg	-	-	Tüm loblar	Tubuler karsinom
9	13	Pekinez	5,5yaş	6 kg	-	-	Sol kaudoabdominal	Kompleks karsinom
10	14	Alman kurdu	9 yaş	25 kg	-	-	Sağ kaudoabdominal	Kompleks adenokarsinom
11	17	Melez	13 yaş	16 kg	-	-	Sol kaudoabdominal Sağ inguinal	Kompleks adenokarsinom Kompleks adenokarsinom

Tablo 3.2'nin devamı: Vaka grubuna dahil edilmiş köpeklerin vaka numarası, protokol numarası, ırk, yaş, kilo, doğum sayısı (DS), tümör lokalizasyonu(TL), ovariohisterektomi durumu (OHE) ve tümör sınıfı bilgileri.

Vaka no.	Protokol no.	İrk	Yaş	Kilo	Doğum sayısı	OHE	Tümör lokalizasyonu	Tümör sınıfı
12	18	Pinscher	16	6,3kg	-	-	Sol kaudoabdominal	Kompleks karsinom
							Sol kraniobdominal	Kompleks karsinom
							Sağ inguinal	Basit adenokarsinom
13	19	Terrier	13 yaş	7 kg	-	+	Sağ kraniotorakal	Karsinosarkom
							Sağ kraniobdominal	Adenokarsinom, kompleks karsinom
							Sağ kaudoabdominal	Adenokarsinom, kompleks karsinom
14	22	Kangal	5 yaş	50 kg	4	-	Sağ inguinal	Karsinom
15	23	American Cocker Spaniel	11 yaş	16 kg	1	-	Sol kaudoabdominal	Malign miks tümör, kompleks karsinom
16	24	Golden Retriever	10 yaş	16 kg	-	-	Tüm loblar	Papiller karsinom
17	25	Terrier	9 yaş	11 kg	-	+	Sol inguinal	Basit adenokarsinom
							Sağ kaudoabdominal	Osteokondrosarkom
							Sağ inguinal	Osteokondrosarkom
							Sol kaudal torasik	Osteokondrosarkom
							Sol kaudoabdominal	Osteoblastik osteosarkom
18	26	French Bulldog	8 yaş	15 kg	-	+	Sol inguinal	Osteoblastik osteosarkom
							Sağ inguinal	İn situ karsinom
							Sol inguinal	Tubulopapiller karsinom
							Sol-sağ kraniotorakal	Tubular karsinom
							Sol-sağ kaudotorakal	Tubular karsinom
19	27	Melez	13 yaş	7 kg	-	-	Sol-sağ kraniobdominal	Tubular karsinom
							Sol-sağ kaudoabdominal	Tubular karsinom
							Sağ inguinal	Tubular karsinom
							Sol inguinal	Tubular karsinom
							Sol inguinal	Kompleks karsinom
20	28	Poodle	13 yaş	5 kg	-	-	Sol inguinal	Kompleks karsinom
							Sol inguinal	Kompleks karsinom
							Sol inguinal	Kompleks karsinom
							Sol inguinal	Kompleks karsinom
							Sol inguinal	Kompleks karsinom

Tablo 3.2'nin devamı: Vaka grubuna dahil edilmiş köpeklerin vaka numarası, protokol numarası, ırk, yaş, kilo, doğum sayısı (DS), tümör lokalizasyonu(TL), ovariohisterektomi durumu (OHE) ve tümör sınıfı bilgileri.

Vaka no.	Protokol no.	İrk	Yaş	Kilo	Doğum sayısı	OHE	Tümör lokalizasyonu	Tümör sınıfı
21	29	American Cocker Spaniel	13 yaş	13 kg	-	-	Sol inguinal	Kompleks karsinoma
							Sağ kaudoabdominal	Basit adenokarsinoma
22	30	English Setter	7 yaş	22 kg	1	-	Sağ inguinal	Tubular karsinom
							Sol-sağ kaudoabdominal	Tubular karsinom
23	31	Golden Retriever	11 yaş	30 kg	-	-	Sol kaudoabdominal	Tubulopapiller karsinom
24	32	English Setter	10 yaş	25 kg	1	-	Sağ-sol inguinal	Tubulopapiller karsinom
							Sağ torakal	Tubulopapiller karsinom
							Sol kranioabdominal	Tubulopapiller karsinom
25	35	Rottweiler	8 yaş	40 kg	-	-	Sağ torakakaudal	Karsinosarkom
26	37	Terrier	10 yaş	9 kg	-	-	Sağ torakal	Kompleks karsinom
							Sağ kranioabdominal	Tubuler karsinom
							Sağ kaudoabdominal	Tubuler karsinom
							Sağ inguinal	Kompleks karsinom
							Sol kranioabdominal	Karsinosarkom,malign miks tümör
							Sol kaudoabdominal	Kondrosarkom
							Sol inguinal	Kompleks karsinom
27	38	Alman Çoban	9 yaş	336kg	-	-	Sağ-sol kranioabdominal	Karsinosarkom
							Sol kaudotorakal	Karsinosarkom
							Sol inguinal	Karsinosarkom

3.2. HASTA ve KONTROL GRUBU OLGULARININ SEÇİLMESİ

Meme tümörü tanısı; anamnez bilgileri, fiziksel muayene, sitoloji ve histopatoloji sonuçları doğrultusunda konulmuştur. Kliniğe meme loblarında kitle şikayeti ile gelen hastalardan biyopsi örneği alarak histopatolojik inceleme sonucu ortaya çıkan malign meme tümörlü hastalar kullanılmıştır.

3.3. LABORATUVAR YÖNTEMLERİ

3.3.1. DNA İzolasyonu

Alınan tam kan örneklerinden Roche High Pure PCR Template Preparation Kit ile genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon aşamaları şu şekilde uygulanmıştır:

- İzolasyona başlamadan önce; elution tamponu her örnek için 200 µl olacak şekilde bir ependorfa alınmış ve 70 °C'ye kadar ısıtılıp kullanıma hazır hale getirilmiştir.
- Nükleaz-free 1,5 ml ependorf tüpüne 200 µl kan, 200 µl binding tamponu (6M guanidin HCl, 10 mM üre, 10 mM Tris HCl, % 20 Triton X-100 (V/V), 40 µl proteinaz K eklenmiş, karıştırılmış ve 70 °C de 10 dakika (dk) inkübe edilmiştir.
- Tüm örnekler 100'er µl isopropanol eklenmiş ve vorteks yardımı ile iyice karıştırılmıştır.
- Toplama tüplerine filtreli tüpler yerleştirilmiş ve örnekler filtreli tüpün üst kısmına (tampon haznesine) aktarılmıştır. Tüp 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden sonra toplama tüpünden filtreli tüp çıkarılmış, toplama tüpü ve sıvı kısım atılmıştır. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Filtreli tüpe 500 µl removal tampon (5M guanidine-HCl, 20mM Tris-HCl, pH:6.6, 25 °C, 20 ml etanol ilave edildikten sonra kullanıldı) eklenmiş ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj işleminden sonra, toplama tüpünden filtreli tüp çıkarılmıştır. Toplama tüpü ve sıvı kısım atılmıştır. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Filtreli tüpe 500 µl yıkama solüsyonu (20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH:7,5 ve 80 ml etanol ilave edildikten sonra kullanıldı) eklenmiş ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj tamamlandıktan sonra toplama tüpünden filtreli tüp çıkarılmıştır. Toplama tüpü ve sıvı kısım atılmıştır. Filtreli tüp yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Tekrar filtreli tüpe 500 µl yıkama solüsyonu eklenmiş ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

- Santrifüjden çıkarılan toplama tüpünün içindeki sıvı kısım dökülmüş ve filtreli tüp aynı toplama tüpüne tekrar yerleştirilmiştir. 14000 rpm’de 10 saniye santrifüj edilmiştir. İşlem bittikten sonra toplama tüpü atılmıştır.
- DNA’yı elde etmek için filtreli tüpler 1,5 ml ependorflara yerleştirilmiş, üzerine önceden ısıtılan elution tampondan 200 µl eklenmiş ve 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- Tüp içinde kullanıma hazır DNA solüsyonu elde edilmiş, elde edilen DNA örnekleri - 20 °C’de saklanmıştır.

3.3.2. Sitolojik yöntem

Patoloji laboratuvarına giden tümör şüpheli meme dokularına merkez, düşey ve yatay eksenler boyunca kesitler uygulanmıştır. Örnekleri hazırlamak için kazıma tekniği kullanılmıştır. Dokunun kesit yüzeyi 90° açı yapacak şekilde bistüri ile birkaç kez kazınmıştır. Bistürinin üzerindeki kalıntı temiz lam üzerine yayılmıştır. Lamalar %96’lık etanolde 1 saat bekletilmiş ve Papanicolaou boya (PAP) prosedürü uygulanmıştır.

3.3.3. Histopatolojik Yöntem

Sitolojik preparasyon hazırlandıktan sonra dokular %10’luk formalin ile tespit edilmiştir. Rutin laboratuvar işlemlerinden (alkol-ksilol) geçirilen, parafin bloklara gömülü doku örneklerinden kalınlığı 4-5µm olacak şekilde kesitler alınmıştır. Kesitler Hematoksilen & Eozin (H&E) ile boyanmıştır. Işık mikroskopunda incelenmiştir.

3.3.4. Mikroskopik değerlendirme yöntemi

Preparatlarda 21 sitolojik malignite kriteri belirlenmiştir. Bu kriterleri puanlamak için 40X’lik ve 100X’lik objektiflerde 10’ar mikroskop alanı değerlendirilmiştir. Her bir kriter için (0) – (+3) arasında puan verilmiştir. Değerlendirme sonucunda puanlar toplanmış ve 10 kriterden en az 5 tanesi “+2” üzeri puan aldığına malign olarak belirlenmiştir.

3.4. KULLANILAN CİHAZLAR

İ.Ü.C. Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı bünyesindeki bulunan aşağıdaki cihazlar proje çerçevesinde kullanılmıştır:

Adı	Alım Yılı	Kullanım Amacı
Güç kaynağı	2004	Agaroz jel elektroforez
Thermal cycler	2004	Polimeraz zincir reaksiyonu
UV görüntüleme tablası	2004	PZR ürünlerinin görüntülenmesi
Yatay mini jel elektroforez	2010	Agaroz jel elektroforez
Vorteks karıştırıcı	2011	PZR karışımının hazırlanması
No-frost buzdolabı	2003	PZR’de kullanılacak kimyasalların saklanması
Mini santrifüj	2005	PZR karışımının hazırlanması
Laminar Flow kabini	2007	PZR karışımının hazırlanması
-20°C buzdolabı	2003	DNA örneklerinin saklanması

3.5. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler aşağıda sunulmuştur:

Agaroz	(Biomax/IB70073)
İsopropanol	(Riedel-de Haen/67-63-0)
TEB tampon çözeltisi	(Chembio/B6680.1000)
Etidyum Bromür	(Thermo Scientific/17898)
Yükleme tamponu (6X)	(Thermo Scientific/R0611)
dNTP seti (4x25 µl)	(Bioline/BIO-39025)
Taq DNA polimeraz	(Tampon ve MgCl ₂) (Thermo Scientific/EP0401)
Primerler	(Macrogen Inc.)

3.6. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

Köpek *p27* geni 5287 baz çiftinden (Erişim numarası: NC_051831.1) oluşmaktadır. Tüm gen dizileme işlemi için *p27* geninin sekiz bölge halinde PZR ile çoğaltılması hedeflenmiştir. PZR işleminde kullanılan maddelerin hazırlanışı aşağıda açıklanmıştır.

3.6.1. Primer Tasarımı

p27 geninin nükleotid dizisi European Molecular Biology Laboratory (EMBL) veritabanına bağlı çalışan <https://www.ensembl.org/index.html> sitesinden alınmıştır. Primer tasarlanırken PZR primerlerinin tüm gen dizisini çoğaltması amaçlanıp, genin tamamının 8 parçada dizilenmesi planlanmıştır. Tasarımı yapılan ve optimizasyon aşamasında kullanılan PZR primerleri ve T_m (°C)'leri Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3: *p27* geninin dizilenmesinde kullanılan primerler.

Primer No.	Primer Dizisi	T_m (°C)
P27_1F	5' TGT TTTCCGAGAGAGGGAGA 3'	57
P27_1R	5' GAAAAGCAAGCTGCGGTTAG 3'	57
P27_2F	5' TTAAAGGCCACCGGGAATGA 3'	57
P27_2R	5' TTGGGTATCTCGGGGTGTGA 3'	59
P27_3F	5' TCCATTGCTCAGGTATTTTACAAC 3'	59
P27_3R	5' ACTGCTTCTCTCCATGCAAGT 3'	58
P27_4F	5' GAGGGTGGGGCTGAGGA 3'	60
P27_4R	5' GTGTCTACATAGCCCAAAGTCCA 3'	61
P27_5F	5' ATTCTGGGCAAAATTCTGGGGTA 3'	59
P27_5R	5' GCAACCTTTTAAGCATAGCCATAT 3'	58
P27_6F	5' AGACCATATACAAGCCAAAGTGG 3'	59
P27_6R	5' CCTGCAAATGTGTGATCAGCC 3'	60
P27_7F	5' GACGTGTAAAGTGGAAAAGCCAC 3'	61
P27_7R	5' TCAGGTATTTGACGGAAACTGCT 3'	59
P27_8F	5' ACCCAAAAAACAATTAGTTACTTCACACT 3'	60
5P27_8R	5' TTCGGGGCAGTTTGCGGA 3'	58

3.6.2. Primer Solüsyonunun Hazırlanması

Liyofilize şekilde bulunan primerler 100 µl distile su ile çözündürülmüştür. Bu hazırlanan stok solüsyondan ise 1 µl alınıp, primerin nmol değerine distile su ile tamamlanarak, 10 pmol/ml konsantrasyon değeri elde edilmiştir. İstenilen konsantrasyon sağlandıktan sonra çözelti mikrosantrijüj yardımı ile karıştırılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.6.3. dNTP Solüsyonunun Hazırlanması

dNTP karışımını hazırlamak amacıyla her bir nükleotid trifosfat (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) çözeltisinden 10'ar µl alınıp 0,5 ml'lik bir ependorfa koyulup üzerine de 40 µl distile su eklenmiştir. Bu şekilde 100 µM konsantrasyonda dNTP çözeltisi elde edilmiştir. Son aşama olarak dNTP karışımı mikrosantrifüj ile karıştırılıp, -20°C'de saklanmıştır.

3.7. PZR OPTİMİZASYONU

4 vaka ve 4 kontrol grubu olmak üzere rastgele seçilen toplam 8 örnek ile PZR optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. 8 bölgede incelenecek olan *p27* geninin çoğaltılabilmesi amacıyla, sırası ile 8 adet PZR Forward ve PZR Reverse primerleri ile deneme yapılmıştır. Yapılan çalışmadan 5. ve 8. bölgelerde amplikon çoğalması elde edilememiştir. Tekrarlanan çalışmalar sonucu bu iki bölgeye ait primer tasarımları güncellenmiştir. 5. bölgede amplikon elde edilmiştir fakat 8. bölgede bir çoğalma gözlenmemiştir. Bu nedenle 8. bölge çalışmadan çıkarılmıştır.

Kalan 7 bölgenin Forward ve Reverse primerleri ile yapılan PZR çalışmasında amplikon elde edilmiştir. Optimizasyon aşamaları sonucu PZR bileşenleri ve PZR koşulları tespit edilmiştir.

3.8. PZR BİLEŞENLERİ ve ŞARTLARI

PZR işlemlerinde kullanılan bileşenlere ait içerik bilgileri Tablo 3.4'te gösterilmiştir.

Tablo 3.4: PZR bileşenleri.

Malzeme	Miktar (µl)
PZR tamponu ve MgCl ₂	4,5
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
dNTP karışımı	0,3
dH ₂ O	13,2
Hot Start Taq Polimeraz	0,5

Touch-down PCR yöntemi kullanılarak şu şekilde yapılmıştır; 95°C’de 3 dakika başlangıç denatürasyonunun ardından 15 siklus boyunca, 95°C’de 20 saniye denatürasyon, 60°C’de 25 saniye bağlanma (her siklusa 0,5°C düşürerek), 72°C’de 50 saniye uzama, bu şekilde devam eden 15 siklusun sonunda ise 19 siklus boyunca, 95°C’de 15 saniye denatürasyon, 52 °C’de 20 saniye bağlanma, 72°C’de 40 saniye uzama ve son aşamada ise 72°C’de 5 dakika son uzama reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

3.9. AGAROS JEL ELEKTROFOREZİ

PZR işleminin ardından sonuçların kontrolü için örnekler %2’lik agaroz jele yüklenerek elektroforeze yerleştirilmiştir. %2’lik agaroz jelin hazırlanma aşamaları şu şekildedir; 0,6 g agaroz tartılıp 30 ml 0,5XTEB tampon çözeltisi içine aktarılmıştır, çözelti hafif çalkalanıp kaynatma işlemine geçilmiştir. Kaynama sayesinde çözündürülen jel sıvı haldeyken içine 1,5 µl etidyum bromür eklenmiş ve tarakların yerleştirildiği tablaya hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek dökülmüştür. Daha sonra soğumaya bırakılmıştır. Yaklaşık 15-20 dakika jelin polimerize olması beklenmiştir. Bu sürenin ardından örnek yükleyebilmek için taraklar jelden ayrılmış ve kuyucuk oluşumu sağlanmıştır.

Yükleme aşaması için gereken koşullar ise şu şekildedir; 4 µl PZR ürünü 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılıp jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Yatay jel elektroforez cihazında 35-40 dakika süreyle 110 Volt uygulanmıştır. Bu işlemin ardından jel elektroforezden çıkarılıp UV ışık altında görüntülenmiştir. Başarılı bir şekilde çoğaltılan PZR ürünleri DNA dizileme işlemi için hizmet alımı kapsamında bir firmaya gönderilmiştir.

3.10. DNA DİZİLEME İŞLEMLERİ

Her bir ampikon Sanger dizileme işlemine tabi tutulmuştur. Dizileme aşaması ABI-3100 sekans cihazında (PE Biosystems, Almanya) gerçekleştirilmiştir.

Sanger dizileme işlemlerinde BigDye™ dizileme kiti kullanılmıştır (BigDye™ terminator cycle sequencing kit-ThermoFisher Scientific, USA). Bu yöntem için tek iplikli bir kalıp DNA, primer DNA, DNA’nın kendini klonlamasını sağlayacak olan DNA polimeraz, dNTP’ler ve zincir büyümesini sonlandıran modifiye edilmiş bazlar kullanılır. Bu bazlar dizileme makinalarında otomatik olarak tespit edilmek için, radyoaktif olarak işaretlenir. DNA

numunesi 4 ayrı reaksiyon için (A, T, G, C bazları için ayrı ayrı yapılacak olan) paylaştırılır ve bunlarda ortak olarak deoksinükleotit bulunur. Ardından her numuneye bir tane baz eklenir, bazlarla deoksinükleotitler arasında bağ kurulamadığından DNA zinciri daha fazla uzayamaz ve reaksiyon sona erer. Böylece elimizde farklı uzunluklar DNA zincirleri bulunur. Sanger dizilemenin aşamaları şu şekildedir:

Ex-Sap Aşaması: PZR ürünüdeki, ortamda serbest kalan dNTP'ler ve primerler enzimatik yöntemlerle uzaklaştırılmıştır.

BigDye Aşaması: Bu aşamada kimyasal olarak ampliconlara uygun tek yönlü primer (PZR aşamasında Forward ya da Reverse-Primer) ve her baz için farklı floresan boya ile işaretli dNTP'ler kullanılmıştır. Bu aşamaya uygun kimyasallar yardımı ile PZR yapılmış, amplicon büyüklüğü kadar çeşitliliğe sahip farklı uzunluklarda ve floresan işaretli ampliconlar meydana gelmiştir.

“CleanUp” Aşaması: Sekanslama sırasında kirlilik oluşumunu engellemek amacıyla primer ve floresan işaretli dNTP'ler reaksiyondan uzaklaştırılmıştır.

Kapiller Jel Elektroforez Aşaması: Oluşan ürünlerin ayrıştırılabilmesi için yüksek rezülasyonlu denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi kullanılır. Sekanslamanın gerçekleştiği bu aşamada, farklı büyüklüklerdeki ampliconlar kapiller içindeki polimerde elektriksel akım ile yürütülerek uzunluk temelli sıralanmıştır. Sıralanan ampliconların ışımaları lazer yardımı ile görüntülenerek sekans dizisi ortaya çıkarılmıştır.

3.11. DNA DİZİ ANALİZİ

p27 genine ait elde edilen DNA dizileri MEGAX bilgisayar programındaki (Tamura ve diğ., 2013) Clustal W programı kullanılarak hizalanmıştır. Vaka ve kontrol grubuna dahil örnekler birbirleriyle ve Gen Bankası'ndan elde edilen *Canis familiaris p27* genine ait referans sekans (Erişim numarası: NC_051831.1) ile karşılaştırılmıştır.

3.12. İSTATİSTİKİ ANALİZ

Referans sekansta daha önce 5'UTR bölgesinde, lokasyonu 27:33921086 olan 1 adet SNP' e rastlanmıştır. Çalışmada yer alan örneklerde referans sekanstan farklı olarak monomorfik olan SNP'ler ve minör allel frekansı 0,01'den küçük olan SNP'ler analiz dışında bırakılmıştır. Malign meme tümörlü örnekler ve kontrol grubu, *p27* geninde tespit edilen

SNP'lerin allel ve genotip frekansları açısından karşılaştırılmıştır. Vakalar ve kontrol grubunda SNP'lere ait allel frekansları, genotip frekansları ve Hardy-Weinberg eşitliğine uyum SPSS programı kullanılarak hesaplanmıştır. SNP'ler ile vakalar arasındaki ilişkinin önemi SPSS 20.0 programındaki (IBM, 2011) Pearson çift taraflı χ^2 (ki-kare) testi ile tespit edilmiştir. Olasılık oranları (%95 güven aralığı ile) koşulsuz lojistik regresyon analizi ile belirlenmiştir.



4. BULGULAR

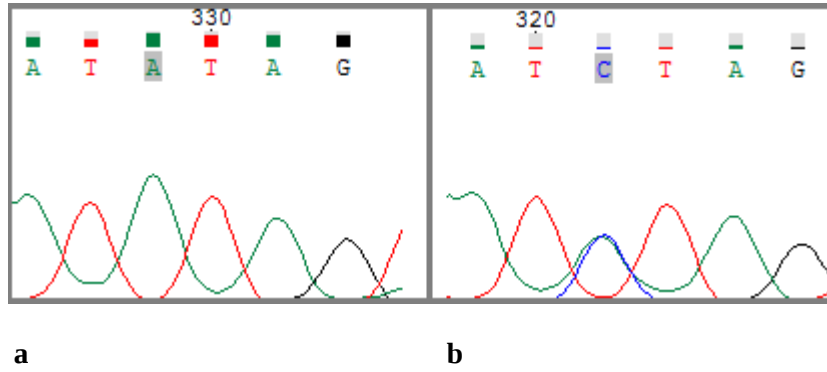
4.1. *p27* GENİNDE BELİRLenen TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMLERİ

DNA dizi analizi sonucunda köpek *p27* geninde yedi adet SNP belirlenmiştir. *p27* geni 3'UTR bölgesinde 5 adet A/G transisyonu ve 2 adet A/C transversiyonu tanımlanmıştır. Bu çalışmada tespit edilen SNP'ler veritabanlarında bulunmamaktadır. Söz konusu polimorfizmlerin genotiplendirilmesi için dizileme sonuçlarına ait kromotogramlar görüntülenerek homozigot ve heterozigot bireyler tespit edilmiştir. Belirlenen 7 adet SNP'e ait minör allel frekansları ve genotip frekansları Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

4.2. *p27* GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE 27:33916135 POZİSYONUNDA BULUNAN A/C POLİMORFİZMİ

p27 geni 3'UTR bölgesinde 27:33916135 pozisyonunda yer alan A/C polimorfizmi köpek veritabanına kayıtlı bir transversiyon değildir.

Çalışmada yapılan analizler sonucunda polimorfizme ait AA ve AC olmak üzere iki genotipe rastlanmıştır.



Şekil 4.1: *p27* geni 27:33916135 pozisyonunda tanımlanan A/C polimorfizmi

a) AA homozigot

b) AC heterozigot

Minör allel C allelidir. C allelinin frekansı kontrol ve vaka olmak üzere toplam tüm örneklerde 0,11, meme tümörlü vakalarda ise 0,13 olarak hesaplanmıştır. Kontrol ve vaka grupları karşılaştırıldığında C allelinin her iki grupta da A allelinden daha düşük bir frekansa sahip olduğu belirlenmiştir.

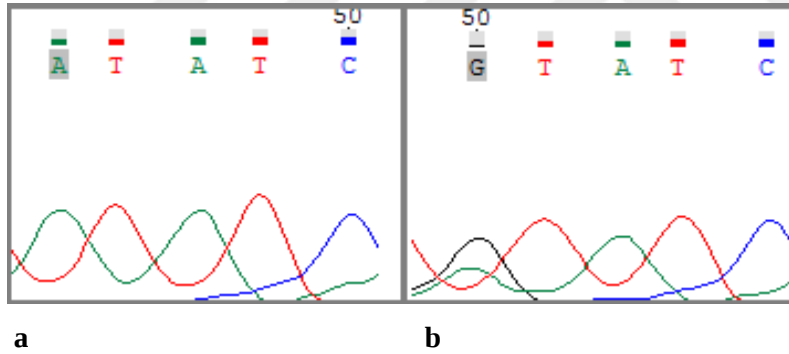
Genotip frekanslarının gruplardaki dağılımına bakıldığında, AA genotipinin vaka ve kontrol gruplarında sırasıyla %77,8 ve %87,5 değerleriyle diğer genotiplere oranla daha yüksek bir frekansa sahip olduğu tespit edilmiştir. Heterozigot bireyler çalışmada analizi yürütülen örneklerin tamamı değerlendirildiğinde %20 ile en düşük orana sahiptir.

27:33916135. pozisyonundaki SNP ile meme tümörü arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla kontrol ve vaka gruplarındaki allel ve genotip frekansları karşılaştırılmıştır, ancak A/C transversiyonu ile meme tümörü arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

4.3. *p27* GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE 27:33915991 POZİSYONUNDA BULUNAN A/G POLİMORFİZMİ

p27 geni 3'UTR bölgesinde 27:33915991 pozisyonunda yer alan A/G polimorfizmi, köpek SNP veritabanına kayıtlı bir transisyon değildir.

Çalışmada yapılan analizler sonucunda polimorfizme ait AA ve AG olmak üzere iki genotipe rastlanmıştır.



Şekil 4.2: *p27* geni 27:33915991 pozisyonunda tanımlanan A/G polimorfizmi

a) AA homozigot

b) AG heterozigot

Minör allel G allelidir. G allelinin frekansı kontrol ve vaka olmak üzere toplam tüm örneklerde 0,11, meme tümörlü vakalarda ise 0,11 olarak hesaplanmıştır. Kontrol ve vaka grupları karşılaştırıldığında G allelinin her iki grupta da A allelinden daha düşük bir frekansa sahip olduğu belirlenmiştir.

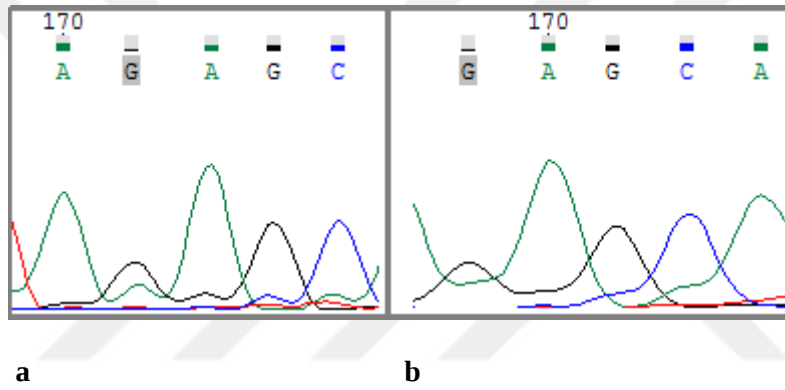
Genotip frekanslarının gruplardaki dağılımına bakıldığında, AA genotipinin vaka ve kontrol gruplarında sırasıyla %77,8 ve %80 değerleriyle diğer genotiplere oranla daha yüksek bir frekansa sahip olduğu tespit edilmiştir. Heterozigot bireyler çalışmada analizi yürütülen örneklerin tamamı değerlendirildiğinde %21,6 ile en düşük orana sahiptir.

27:33915991. pozisyonundaki SNP ile meme tümörü arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla kontrol ve vaka gruplarındaki allel ve genotip frekansları karşılaştırılmıştır, ancak A/G transisyonu ile meme tümörü arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

4.4. *p27* GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE 27:33915866 POZİSYONUNDA BULUNAN A/G POLİMORFİZMİ

p27 geni 3'UTR bölgesinde 27:33915866 pozisyonunda yer alan A/G polimorfizmi, köpek SNP veritabanına kayıtlı bir transisyon değildir.

Çalışmada yapılan analizler sonucunda polimorfizme ait GG ve AG olmak üzere iki genotipe rastlanmıştır.



Şekil 4.3: *p27* geni 27:33915866 pozisyonunda tanımlanan A/G polimorfizmi

a) AG heterozigot

b) GG homozigot

Minör allel A allelidir. A allelinin frekansı kontrol ve vaka olmak üzere toplam tüm örneklerde 0,44, meme tümörlü vakalarda ise 0,44 olarak hesaplanmıştır. Kontrol ve vaka grupları karşılaştırıldığında A allelinin her iki grupta da G allelinden daha düşük bir frekansa sahip olduğu belirlenmiştir.

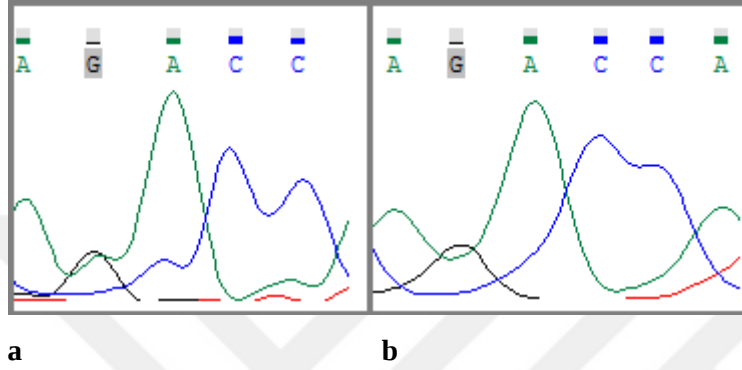
Genotip frekanslarının gruplardaki dağılımına bakıldığında, AG genotipinin vaka ve kontrol gruplarında sırasıyla %88,5 ve %88,9 değerleriyle diğer genotiplere oranla daha yüksek bir frekansa sahip olduğu tespit edilmiştir. Homozigot bireyler çalışmada analizi yürütülen örneklerin tamamı değerlendirildiğinde %11,4 ile en düşük orana sahiptir.

Çalışmada, allel frekanslarının ve iki genotipe ait frekansların kontrol ve vaka grupları arasında karşılaştırılması sonucunda 27:33915866. pozisyonundaki A/G transisyonu ile meme tümörü arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

4.5. *p27* GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE 27:33915855 POZİSYONUNDA BULUNAN A/G POLİMORFİZMİ

p27 geni 3'UTR bölgesinde 27:33915855 pozisyonunda yer alan A/G polimorfizmi, köpek SNP veritabanına kayıtlı bir transisyon değildir.

Çalışmada yapılan analizler sonucunda polimorfizme ait GG ve AG olmak üzere iki genotipe rastlanmıştır.



Şekil 4.4: *p27* geni 27:33915855 pozisyonunda tanımlanan A/G polimorfizmi

a) AG heterozigot

b) GG homozigot

Minör allel A allelidir. A allelinin frekansı kontrol ve vaka olmak üzere toplam tüm örneklerde 0,46 meme tümörlü vakalarda ise 0,46 olarak hesaplanmıştır. Kontrol ve vaka grupları karşılaştırıldığında A allelinin her iki grupta da G allelinden daha düşük bir frekansa sahip olduğu belirlenmiştir.

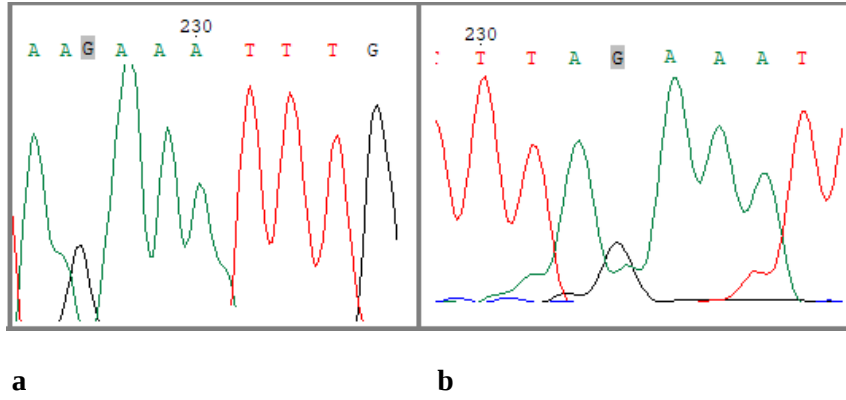
Genotip frekanslarının gruptaki dağılımına bakıldığında, AG genotipinin vaka ve kontrol gruplarında sırasıyla %92,3 ve %90 değerleriyle diğer genotiplere oranla daha yüksek bir frekansa sahip olduğu tespit edilmiştir. Homozigot bireyler çalışmada analizi yürütülen örneklerin tamamı değerlendirildiğinde %8,3 ile en düşük orana sahiptir.

Çalışmada, allel frekanslarının ve iki genotipe ait frekansların kontrol ve vaka grupları arasında karşılaştırılması sonucunda 27:33915855. pozisyonundaki A/G transisyonu ile meme tümörü arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

4.6. *p27* GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE 27:33915802 POZİSYONUNDA BULUNAN A/G POLİMORFİZMİ

p27 geni 3'UTR bölgesinde 27:33915802 pozisyonunda yer alan A/G polimorfizmi, köpek SNP veritabanına kayıtlı bir transisyon değildir.

Çalışmada yapılan analizler sonucunda polimorfizme ait GG ve AG olmak üzere iki genotipe rastlanmıştır.



Şekil 4.5: p27 geni 27:33915802 tanımlanan A/G polimorfizmi

a) GG homozigot

b) AG heterozigot

Minör allel A allelidir. A allelinin frekansı kontrol ve vaka olmak üzere toplam tüm örneklerde 0,44, meme tümörlü vakalarda ise 0,44 olarak hesaplanmıştır. Kontrol ve vaka grupları karşılaştırıldığında A allelinin her iki grupta da G allelinden daha düşük bir frekansa sahip olduğu belirlenmiştir.

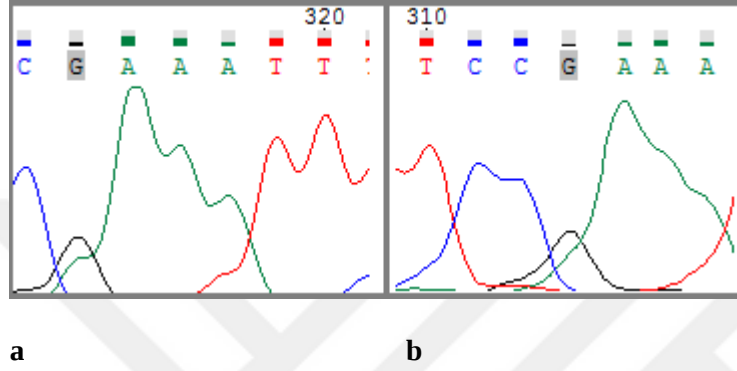
Genotip frekanslarının gruptaki dağılımına bakıldığında, AG genotipinin vaka ve kontrol gruplarında sırasıyla %88,5 ve %88,9 değerleriyle diğer genotiplere oranla daha yüksek bir frekansa sahip olduğu tespit edilmiştir. Homozigot bireyler çalışmada analizi yürütülen örneklerin tamamı değerlendirildiğinde %11,4 ile en düşük orana sahiptir.

Çalışmada allel frekanslarının ve iki genotipe ait frekansların kontrol ve vaka grupları arasında karşılaştırılması sonucunda 27:33915802. pozisyonundaki A/G transisyonu ile meme tümörü arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

4.7. p27 GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE 27:33915723 POZİSYONUNDA BULUNAN A/G POLİMORFİZMİ

p27 geni 3'UTR bölgesinde 27:33915723 pozisyonunda yer alan A/G polimorfizmi, köpek SNP veritabanına kayıtlı bir transisyon değildir.

Çalışmada yapılan analizler sonucunda polimorfizme ait GG ve AG olmak üzere iki genotipe rastlanmıştır.



Şekil 4.6: p27 geni 27:33915723 pozisyonunda tanımlanan A/G polimorfizmi

a) AG heterozigot

b) GG homozigot

Minör allel A allelidir. A allelinin frekansı kontrol ve vaka olmak üzere toplam tüm örneklerde 0,43, meme tümörlü vakalarda ise 0,42 olarak hesaplanmıştır. Kontrol ve vaka grupları karşılaştırıldığında A allelinin her iki grupta da G allelinden daha düşük bir frekansa sahip olduğu belirlenmiştir.

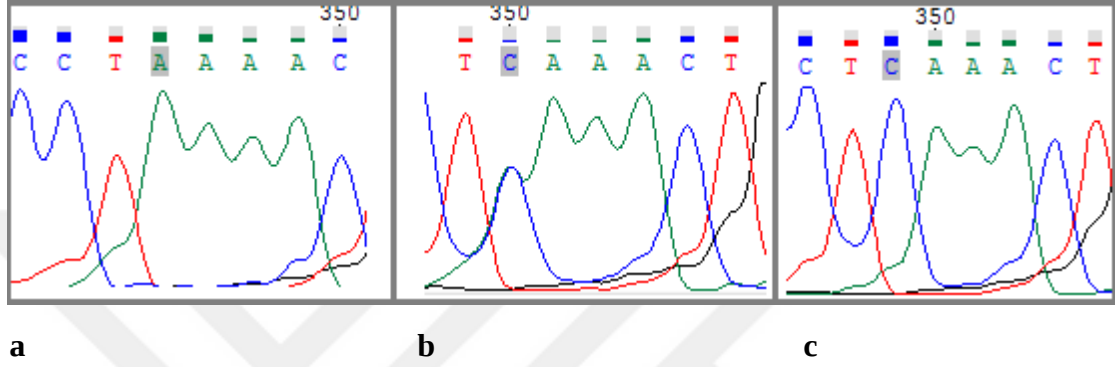
Genotip frekanslarının gruplardaki dağılımına bakıldığında AG genotipinin vaka ve kontrol gruplarında sırasıyla %84,6 ve %88,9 değerleriyle diğer genotiplere oranla daha yüksek bir frekansa sahip olduğu tespit edilmiştir. Homozigot bireyler çalışmada analizi yürütülen örneklerin tamamı değerlendirildiğinde %14,3 ile en düşük orana sahiptir.

Çalışmada, allel frekanslarının ve iki genotipe ait frekansların kontrol ve vaka grupları arasında karşılaştırılması sonucunda 27:33915723. pozisyonundaki A/G transisyonu ile meme tümörü arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

4.8. p27 GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE 27:33915693 POZİSYONUNDA BULUNAN A/C POLİMORFİZMİ

p27 geni 3'UTR bölgesinde 27:33915693 pozisyonunda yer alan A/C polimorfizmi, köpek SNP veritabanına kayıtlı bir transversiyon değildir.

Çalışmaya dahil edilen örneklerde, DNA dizileme yöntemiyle CC homozigot, AC heterozigot ve AA homozigot olmak üzere üç adet genotip belirlenmiştir.



Şekil 4.7: p27 geni 27:33915693 pozisyonunda tanımlanan A/C polimorfizmi

a) AA homozigot b) AC heterozigot c) CC homozigot

Minör allel A allelidir. A allelinin frekansı kontrol ve vaka olmak üzere toplam tüm örneklerde 0,43 meme tümörlü vakalarda ise 0,42 olarak hesaplanmıştır. Kontrol ve vaka grupları karşılaştırıldığında A allelinin her iki grupta da G allelinden daha düşük bir frekansa sahip olduğu belirlenmiştir.

Genotip frekansları açısından değerlendirildiğinde; AC ve CC genotip frekansları 0,38 ile vaka grubunda en yüksek değere sahipken, AC genotip frekansı kontrol grubunda diğerlerinden daha yüksek (0,44) bulunmuştur. Vaka ve kontrol gruplarının toplamında ise homozigot bireyler daha az sayıdadır.

Çalışmada, allel frekanslarının ve üç genotipe ait frekansların kontrol ve vaka grupları arasında karşılaştırılması sonucunda 27:33915693. pozisyonundaki A/C polimorfizmi ile meme tümörü arasında istatistiki olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

Tablo 4.1: *p27* genindeki polimorfizmlerin köpeklerde meme tümörü ile ilişkisi

SNP	Genom pozisyonu	Alleller	Minör allel	Minör allel frekansı		Olasılık oranları (95% güven aralığı)	χ^2
				Tüm örnekler	Vakalar		
Yeni SNP	27:33916135	A/C	C	0,11	0,13	0,448 (0,51-3,938)	0,549 Ns
Yeni SNP	27:33915991	A/G	G	0,11	0,11	0,889 (0,164-4,815)	0,019 Ns
Yeni SNP	27:33915866	A/G	A	0,44	0,44	0,991 (0,337-2,916)	0,000 Ns
Yeni SNP	27:33915855	A/G	A	0,46	0,46	1,048 (0,372-2,952)	0,008 Ns
Yeni SNP	27:33915802	A/G	A	0,44	0,44	0,991 (0,337-2,916)	0,000 Ns
Yeni SNP	27:33915723	A/G	A	0,43	0,42	0,917 (0,311-2,700)	0,025 Ns
Yeni SNP	27:33915693	A/C	A	0,43	0,42	0,917 (0,311-2,700)	0,025 Ns

Ns: önemsiz, * $p < 0,05$

Tablo 4.2: *CDKN1B* genindeki polimorfizmlerin köpeklerde meme tümörü ile ilişkisi.

	Genotip Frekansı (%)																					
Genom pozisyonu	27:33916135			27:33915991			27:33915866			27:33915855			27:33915802			27:33915723			27:33915693			
Grup	AA	AC	χ^2	AA	AG	χ^2	GG	AG	χ^2	GG	AG	χ^2	GG	AG	χ^2	GG	AG	χ^2	AA	AC	CC	χ^2
Vaka	77,8	22,2	0,546	77,8	22,2	0,21	11,5	88,5	0,001	7,7	92,3	0,05	11,5	88,5	0,001	15,4	84,6	0,1	23,1	38,5	38,5	0,109
Kontrol	87,5	12,5	Ns	80	20	Ns	11,1	88,9	Ns	10	90	Ns	11,1	88,9	Ns	11,1	88,9	Ns	22,2	44,4	33,3	Ns

Ns: önemsiz, *p<0,05

5. TARTIŞMA

İnsanlarda meme kanserleri kadınlarda en yaygın rastlanan kanser tiplerinden ve çoğu zaman ölümle sonuçlanan önemli hastalıklardan biridir (Kumar ve diğ., 2013). Kanser, günümüzde artık insanlarda olduğu kadar hayvanlarda da önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir. Dişi köpekler, evcil hayvanlar içinde meme tümörü insidensi en yüksek hayvan türüdür. Erkek köpeklerde ise yaklaşık %1 oranında görülmektedir (Saba ve diğ., 2007). Hayvanlarda meme tümörleri; görülen tüm tümörler içerisinde %25-42 oranında tespit edilmiştir (Doré ve diğ., 2003; Hellmén, 2005). Dişi köpeklerde meme kanserleri ise malign tümörler içinde en yaygın rastlananlarıdır ve yıllık insidens oranı yaklaşık 198/100000'dir (Misdorp, 2002; Hellmén, 2005). Köpeklerde meme tümörlerinin görülme yaşı ortalama 10-11'dir ve vakaların yaklaşık %50'si malign seyredir. Hastalığın sıklıkla Poodle, English Spaniel, English Setter, English Cocker, Dachshund, Fox Terrier, Boston Terrier, Cocker Spaniel, Pointer ırklarında ve özellikle 6-7 yaşından sonra görüldüğü bildirilmiştir (Argyle ve diğ., 2008, Zatloukal ve diğ., 2005).

Tek Sağlık yaklaşımının bileşenlerinden biri olan karşılaştırmalı onkoloji açısından insan ve köpeklerde görülen meme tümörleri önemli bir araştırma alanı sunmaktadır (Davis ve Ostrander, 2014). Köpek meme tümörleri ile insan meme kanseri arasındaki klinik ve moleküler benzerlikler son yıllarda tanımlanmıştır. Tüm köpek genomunun (%99 tamamlanmış, ~2.5 milyar baz çifti) dizilenmesi ve ortolog genler açısından insan genomu ile yakın benzerliğinin açık kanıtı ile birlikte köpek, insanlardaki kanser araştırmaları için uygun bir alternatif model olarak ortaya çıkmıştır (Lindblad ve diğ., 2005). Klinik olarak ise; spontan tümörler, hormonal etiyoloji, başlangıç yaşı, hastalığın seyri, tümör boyutu, lenf nodu invazivliği ve klinik evre gibi çok güçlü benzerlikler söz konusudur. Köpek meme tümörü modelleri ile yapılan çalışmalar özellikle hücre döngüsünü düzenleyen genlerin, tümör baskılayıcı genlerin, onkogenlerin ve kodlayıcı olmayan RNA veya mikroRNA'ların ifadenme düzeylerindeki değişikliklerin insanlardaki ifadenme düzeyleriyle korelasyona sahip olduğunu göstermiştir (Kabir ve diğ., 2015). Tüm bu benzerlik ve uyum içerisinde köpekler, insanlardaki meme tümörü araştırmaları için uygun bir modeldir.

Bu çalışma, köpeklerde *CDKN1B* genindeki SNP'lerin belirlenerek meme kanseri ile ilişkilerinin tespitini amaçlayan literatürdeki ilk çalışmadır. Meme kanseri olgularında, *CDKN1B* geni ürünü olan p27'nin ekspresyonunun önemli seviyede düşüşü nedeniyle; *CDKN1B* genindeki germ hattı varyantlarının ve meme tümörüne duyarlılık açısından incelenmesi önemli bulunmuştur. Köpek *CDKN1B* geni dizi analizleri sonucunda kodlama yapmayan 3'UTR bölgesinde yedi adet SNP tespit edilmiştir. Tespit edilen SNP'lerin köpeklerde meme tümörü ile istatistiki olarak anlamlı derecede ilişkili olmadığı belirlenmiştir.

5.1. KÖPEKLERDE KALITSAL MEME KANSERİNDE ETKİLİ GERM HATTI MUTASYONLARI

Hem insanlarda hem de köpeklerde tümör hücrelerinde ortaya çıkan somatik mutasyonlar (edinilmiş mutasyonlar) uzun yıllardır yoğun şekilde araştırılmaktadır. Somatik mutasyonların birikiminden önce kanser gelişimine yol açan kalıtsal (germ hattı) varyantlarının belirlenmesi çok önemli olmakla birlikte köpek meme tümörlerindeki genetik risk faktörlerini inceleyen çalışmalar sınırlı sayıdadır (Goebel ve Merner, 2017).

Kalıtsal meme kanseri açısından riski arttıran genetik varyantlar, diğer bir ifadeyle germ hattı mutasyonları, otozomal dominant bir kalıtım mekanizmasına sahiptir. Bu varyantlar meme kanserine yol açma riskine göre yüksek, orta ve düşük etkili olarak sınıflandırılmaktadır. Söz konusu varyantlara sahip genler meme kanserine duyarlılık genleri olarak tanımlanmaktadır (Chandler ve diğ., 2016).

Köpeklerde meme kanseri ile ilişkilendirilen ilk kalıtsal varyant *p53* tümör süpresör geninde tespit edilmiştir (Veldhoen ve diğ., 1999). Ardından *BRCA1* ve *BRCA2* genleri üzerinde yapılan çalışmalarda meme kanseriyle ilişkili polimorfizmler belirlenmiştir (Enginler ve diğ., 2014; Borge ve diğ., 2011; Hsu ve diğ., 2010; Rowell ve diğ., 2011; Yoshikawa ve diğ., 2005). Yüksek ve düşük riskli olarak tanımlanan farklı köpek ırklarının karşılaştırıldığı bir çalışmada ise 11 adet aday gen (*BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *EGFR*, *ESR1*, *HER2*, *PTEN*, *STK11*, *TP53*) dizilenmiştir (Borge ve diğ., 2011). Vaka-kontrol çalışması olmayan bu çalışmada *BRCA2*, *EGFR* ve *HER2* genlerinde risk faktörü olabileceği tahmin edilen polimorfizmler tespit edilmiştir. English Springer Spaniel (ESS)'de yapılan bir vaka-kontrol karşılaştırmasında ise *ESR1* geninde köpeklerde meme tümörüyle ilişkili SNP'ler belirlenmiştir (Borge ve diğ., 2013). Köpek meme tümörlerinde genetik risk faktörlerini ortaya koymayı amaçlayan ilk genom boyu ilişkilendirme çalışmasında (GWAS)

11. ve 27. kromozomlarda bulunan bazı SNP'lerin istatistiki olarak belirgin şekilde meme tümörü için risk taşıma potansiyeli olduğu ileri sürülmüştür. Aynı çalışmada hücre siklusunun düzenlenmesinden sorumlu bir siklin bağımlı kinazı kodlayan *CDK5RAP2* geni öne çıkmıştır (Melin ve diğ., 2016).

Yüksek riskli duyarlılık genlerinin bir kısmı hem insanlarda hem de köpeklerde bildirilmiştir. İlk kez karşılaştırmalı olarak çalışılan meme kanseri duyarlılık genlerinden *BRCA1*; insan ve köpek arasında %84 nükleotid benzerliğine ve %73,8 aminoasit benzerliğine sahiptir (Szabo ve diğ., 1996).

5.2. RİSK FAKTÖRÜ OLARAK HÜCRE SİKLUSUNDA GÖREVLİ *CDKN1B* GENİ

Meme kanserinin genetik patogenezinin araştırılmasında hücre siklusu düzenleyicileri olan cdk ve cdk'i kodlayan genlerin incelenmesi aydınlatıcı olacaktır. Hücre siklusunda rol oynayan p21, p27 ve p53 proteinleri ve onları kodlayan genler kanser araştırmalarında öne çıkmaktadır. Bu çalışmada incelenen, *CDKN1B* geni Cip/Kip ailesinin bir üyesi p27'yi kodlamaktadır. p27 proteini cdk'leri düzenleyerek hücre döngüsü ilerlemesini durdurabilen evrensel bir cdk'i'dir. Daha önce bu gen üzerinde köpeklerde 5'UTR bölgesinde 1 adet SNP (rs850568697) tespit edilmiştir. İnsanlarda yapılan çalışmalar farklı kanser türleriyle ilişkili olduğuna işaret etmektedir ancak farklı bulgular da mevcuttur (Dreijerink ve diğ., 2006; Ferrando ve diğ., 1996; Kawata ve diğ., 1995; Schöndorf ve diğ., 2004; Landa ve diğ., 2010).

CDKN1B geni tarafından kodlanan p27 proteini cdk komplekslerine bağlanarak hücre siklusunun ilerlemesini inhibe eden bir proteindir (Polyak ve diğ., 1994). Bir hücrenin bölünmesiyle sonuçlanacak olan hücre siklusuna girip girmeyeceğine dair uyarının oluşturulmasından sorumludur (Belletti ve diğ., 2005). Bugüne kadar yapılan çalışmalar, p27 proteinin hücre üzerindeki etkilerinin çok farklı protein etkileşimlerinin sonucunda ortaya çıktığını göstermektedir. Proteinin N- ve C-terminal bölgeleri, hücre siklusu inhibitör bölgesi, nükleer eksportasyon sinyal bölgesi ve nükleer yerleşim sinyali bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgelere bağlanan düzenleyici proteinler, proteinin fonksiyonlarını etkilemekte ve hücre içindeki konumunu belirlemektedir (Sharma ve Pledger, 2016). p27 proteinin farklı etkileşimleri ve hücre içi konumunun tümör gelişimi üzerinde farklı yönde etkileri olması nedeniyle *CDKN1B* geninin onkogen veya TSG olarak rol oynadığı ileri sürülmektedir (Larrea ve diğ., 2009).

İnsanlarda yapılan farklı çalışmalarda *CDKN1B* genindeki kalıtsal kanser hastalıklarında rol oynayan germ hattı mutasyonları ve sporadik kanserlerde tümör hücrelerinde ortaya çıkan somatik mutasyonlar incelenmiştir. Köpeklerde her iki alanda da çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda meme kanserine yatkınlık üzerine etkili olabilecek germ hattı mutasyonları incelenmiştir. Köpek *CDKN1B* geninin kodlayıcı bölgesinde vaka ve kontrol gruplarına dahil köpeklerde herhangi bir polimorfizme rastlanmamıştır. Genin kodlayıcı bölgesinin, en azından bizim çalışmamızdaki bireyler göz önüne alındığında monomorfik olduğu görülmektedir. Bu durum, *p27*'nin tümör gelişimi üzerine etkisinde translasyon sonrası modifikasyonların da sorumlu olabileceği yaklaşımıyla tutarlıdır. Fosforilasyon, ubiquitinasyon ve sumoylasyon gibi modifikasyonların *p27*'nin etkisini ve diğer proteinlerle etkileşimini değiştirebileceği düşünülmektedir ancak konuyla ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Cusan ve diğ., 2018). Bunun yanı sıra *p27*'nin etkinliği başka genler tarafından da yönlendirilmektedir. Dolayısıyla tek faktör *CDKN1B* genindeki varyasyonlar değildir. Örneğin; *MEN1* geni *CDKN1B* transkripsiyonun düzenlemektedir (Dreijerink ve diğ., 2006).

p27Kip1 proteininin ekspresyon kaybı veya aşağı regülasyonunun, çeşitli insan malignitelerinde bağımsız bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (Bian ve diğ., 2015; Sion-Vardy ve diğ., 2010). Bizim çalışmamızda; 5274. pozisyonundaki A/C polimorfizminde minör alel C olarak belirlenmiştir, vaka ve kontrol grubunda en yüksek frekans AA genotipine ait olduğu tespit edilmiştir. Heterozigot bireyler ise %20 oranla en düşük frekansa sahiptir. 5413. pozisyonunda bulunan A/G polimorfizminde, G minör aleldir ve AA genotipi tüm gruplarda en yüksek frekansa sahiptir. Heterozigot bireyler ise %21,6 ile yine en düşük frekansa sahiptir. 5538, 5551, 5621, 5683. pozisyonlarda tespit edilen polimorfizmlerde ise minör alel A allelidir, AG genotipi ise vaka ve kontrol gruplarındaki en yüksek frekansa sahiptir. Bu dört SNP'de de homozigot bireyler daha az sayıdadır. Son olarak 5713. pozisyonunda bulunan A/C polimorfizminde yine minör alel A allelidir. AC ve CC genotipleri vakalarda yüksek frekansa sahipken, AC genotipi kontrol grubunda daha yüksektir. Diğer dört SNP'de olduğu gibi bu SNP'de de homozigot bireyler sayıca daha az bulunmuştur. Fakat bulduğumuz yedi adet SNP'in meme tümörü ile anlamlı bir ilişkisi tespit edilememiştir. İnsanlarda *CDKN1B* geninde toplam 21 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) rapor edilmiştir (Gen Bankası erişim numarası AF480891) (Zilani ve diğ., 2018). Bu SNP'ler arasında 326'da T>G, 838'de C>A ve 673'te T>A ve 79'da C>T ve 502'de G>A değişimleri daha önce analiz edilmiştir (Yakobson ve diğ., 2000; Longuini ve diğ., 2014).

İnsan *CDKN1B* geninin V109G polimorfizmi ilk olarak 1995 yılında tanımlanmıştır (Kawamata ve diğ., 1995). Polimorfizm, kanser hastalarının %11-26'sında, aynı zamanda sağlıklı bireylerin yaklaşık %39'unda ve kanser dokusu örneklerinin kötü huylu olmayan hücrelerinde bulunmuştur. p27/V109G fenotipinin ilişkili olduğu ileri evre prostat karsinomunun aksine meme kanseri gelişimi ile ilişkisiz olduğu düşünülmüştür (Ferrando ve diğ., 1996, Kawata ve diğ., 1995, Schöndorf ve diğ., 2004) . Bu SNP önemlidir. Çünkü p27'de amino asit değişikliğine (Valin/Glisin) yol açan tek SNP'dir ve sonuç olarak sitozolik translokasyonu azalttığı ve proteinin nükleer stabilitesini arttırdığı belirtilmiştir (Barbieri ve diğ., 2014; Ma ve diğ., 2006). p27'nin kodon 109'daki polimorfizmi, oral skuamöz hücreli karsinom, meme kanseri, prostat kanseri, ve tiroid kanserinde prognoz riskini arttırmaktadır (Wei ve diğ., 2012; Jia ve diğ., 2014). Xiang ve diğ. (2013) tarafından yapılan bir meta analiz çalışmasında; *CDKN1B* genindeki iki polimorfizmin rs2066827 (Yu ve diğ., 2009; Driver ve diğ., 2008; Ma ve diğ., 2006; Ferrando ve diğ., 1996) ve rs34330 (Canbay ve diğ., 2010, Yu ve diğ., 2009; Driver ve diğ., 2008; Ma ve diğ., 2006) kadınlarda meme kanserine olan yatkınlığa etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada önceki araştırmaların aksine 326T>G polimorfizmi (rs2066827) ve kadınlarda meme kanseri arasında bir ilişki saptanamamıştır. Genin 5'UTR bölgesinde bulunan diğer SNP ise ilişkili bulunmuştur ve konumu nedeniyle p27 üretimini azaltabileceği ileri sürülmüştür. Bu durumun meme kanserine duyarlılığı arttırabildiği bildirilmektedir (Wang ve diğ., 2007). Tiroid kanseri üzerine yapılan bir çalışmada da rs34330 polimorfizminin *CDKN1B* transkripsiyonunu etkileyerek tiroid kanserinin gelişiminde rol aldığı belirtilmiştir (Landa ve diğ., 2010).

p27 ekspresyonunun kaybı da meme kanserleri olgularında yaygındır ve yüksek tümör derecesi ve kötü prognoz ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir (Schöndorf ve diğ., 2004). Spurdle ve diğ. (2009); *BRCA1* ve *BRCA2* mutant genlerine sahip 2359 kadın üzerinde yaptığı çalışmada, p27 ekspresyonunun ciddi şekilde azalmasını göz önünde bulundurarak, bu genler ile *CDKN1B* geni polimorfizmleri arasında anlamlı bir ilişki olabileceğine dair incelemelerde bulunmuşlardır. Meme kanseri ile alakalı olabilecek V109G dahil olmak üzere 5 adet SNP incelenmiş fakat anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Yapılan çalışmalardaki bu tutarsızlıklarla ilgili birkaç olası neden vardır. İlk neden örnekleme farkıdır. Daha fazla sayıda örnek içeren bir çalışmanın gerçek SNP-kanser ilişkisini ortaya koymaya daha yatkın olduğu bilinmektedir. İkinci neden heterojen popülasyonlar ve etnik farklılıklar olabilir. Çeşitli genetik geçmişlerden kaynaklanan olası sonuçlar, alel frekans

varyansını, farklı gen-gen etkileşimlerini ve gen-çevre etkileşimlerini içerir. Üçüncü neden ise farklı kanser türleri olabilir. Çeşitli bölgelerdeki insan kanserleri, patolojinin etiyolojisi açısından büyük farklılıklar gösterebilir (Lu ve diğ., 2015).

Yapılan bir çalışmada; *p27/V109G*'nin lenf nodu tutulumu negatif olan meme kanseri hastalarında, hastalıksız sağkalım için prognostik bir gösterge olabileceğini göstermektedir. Verilerde, tüm çalışma grubunda polimorfizmin, tümör hücrelerinin nodal tutulumu ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. *p27* ekspresyonunun, lenf nodu metastazları ile korele olduğu bildirilmiştir. *p27* ifadesi, *V109G* polimorfizminden bağımsız olduğu düşünülmüştür. Lenf nodu negatif alt grupta, *V109G* polimorfizmi, hastaların önemli ölçüde kısalmış hastalıksız sağkalımını göstermiştir. Malign olmayan dokularda ortaya çıkması nedeniyle, polimorfizmin *p27*'yi işlevsel olarak bozmadığı genel olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, meme kanseri hücrelerinde vahşi tip *p27* ve *p27/V109G* mutasyonunu ayırt eden bir faktörün varlığını tahmin etmek ilgi çekicidir. Bu faktörün, nükleer eksport veya bozunma mekanizmalarıyla ilgili olabileceği ve sonuç olarak *p27/V109G*'nin düzenlenmesini etkileyebileceği düşünülmüştür. *p27*'nin artan bozunmasının düzensiz hücre döngüsüne yol açtığı iyi bilinmektedir. Hücrel bozunma sistemleri, vahşi tip *p27*'ye kıyasla *p27/V109G*'nin bozulmasını destekleyebilir. *p27*'nin Jun aktivasyon alanı bağlayıcı protein 1'e (JAB1) fiziksel bağlantısı, proteolitik *p27* bozulmasını tetikler. Jun-bağlanma bölgesi, *p27* proteininin 97 ve 151 amino asitleri arasında yer alır, dolayısıyla polimorfik bölge de buna dahildir (Schöndorf ve diğ., 2004).

Onay ve diğ. (2006) tarafından yayınlanan bir çalışmada; *p27-V109G* ile meme kanseri riski arasında bir ilişki olmadığı bildirilmiştir. Benzer şekilde; Ma ve diğ. (2006)'de Çinli kadınlar arasında bu polimorfizm ile meme kanseri riski arasında bir ilişki göstermediğini belirtmişlerdir.

Bir başka çalışmada ise, *p27/V109G* polimorfizminin kanserin T evresi yüksekliği ve nodal tutulum ile ilişkisi bulunmuş fakat meme kanseri ile bir ilişkisi bulunamamıştır (Figueiredo ve diğ., 2007).

Bu çalışmalar; *p27* polimorfizminin herhangi bir organdaki tümörün başlangıcı değil ama tümör gelişimi ve nodal tutulumu ile ilişkili olduğu, dolayısı ile meme kanserinin ortaya çıkışı ile değil de gelişimiyle ilişkili olabileceği sonucuna ulaşmamızı sağlayabilir. Bizim çalışmamızda tespit edilen 7 adet SNP'in de meme tümörü ile anlamlı bir ilişkisi bulunamamıştır. Çalışmamızın amacı *p27*'deki olası mutasyonların meme kanserine yatkınlığa

etkisinin belirlenmesi yönünde olduğu için bir ilişki bulunamamış olabilir. İleriki çalışmalarda bulduğumuz SNP'lerin köpeklerde nodal tutulum, T evresi gibi tümör özellikleri ve sağkalım ile ilişkili olup olmadığının incelenmesi kanser gelişimi açısından önemli sonuçlar sunabilir.

5.3. *CDKN1B* GENİNDEKİ GERM HATTI MUTASYONLARI

İnsanlarda *CDKN1B* genindeki çeşitli germ hattı mutasyonlarıyla ilişkili olduğu belirlenen başlıca iki kalıtsal kanser hastalığı mevcuttur (Cusan ve diğ., 2018) Bunlardan ilki; paratiroid, pankreas ve hipofiz bezi tümörleriyle karakterize Çoklu Endokrin Neoplazi Sendromu 4'tür (Multiple Endocrine Neoplasia Syndrome-MEN) (Pellegata ve diğ., 2006). MEN-4 sendromunun görüldüğü ailelerde yaygın olarak genin kodlayıcı bölgelerinde yanlış anlamalı mutasyonlar belirlenmiştir. Yapılan in vitro çalışmalarda, kimi örneklerde p27'nin ilgili diğer proteinlerle (örn; cdk2) bağlanması ve hücre çekirdeğindeki yerleşimi etkilenirken, kimi örneklerde p27'nin fonksiyonlarını sürdürdüğü gözlemlenmiştir (Bugalho ve Domingues, 2016). Çalışmamızda vaka ve kontrol gruplarında benzer yanlış anlamalı mutasyonlara rastlanmamıştır. Ancak p27 ifadenmesini UTR'lerde değişikliğe yol açarak etkileyen ve MEN-1 ve MEN-4 ile ilişkili olduğu ileri sürülen germ hattı mutasyonları da belirlenmiştir. 5'UTR bölgesindeki mutasyonların uORF'yi (upstream open reading frame – yukarı akış açık okuma çerçevesi) değiştirerek ve mRNA molekülünün ikincil yapısını değiştirerek etkisini gösterdiği ileri sürülmektedir (Cusan ve diğ., 2018). *CDKN1B* geni germ hattı mutasyonlarının etkili oldu bir diğer kalıtsal kanser, ailesel prostat kanseridir. Chang ve diğ. (2004) prostat karsinomu görülen aileler üzerinde yaptıkları çalışmada *CDKN1B* geninde promotor bölge, ekzonlar ve intronlarda olmak üzere 10 adet germ hattı varyantı belirlemişlerdir. Promotor bölgedeki polimorfizmlerin transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinde olduğu, böylece genin transkripsiyonun etkileyebileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada tespit edilen tüm SNP'ler genin 3'UTR bölgesindedir. İstatistiki olarak meme kanseriyle belirgin bir ilişki tespit edilemese de, söz konusu SNPlar p27 proteinin ifadenmesinde, miktarında ve dolayısıyla protein etkileşimlerinde etkili olabilirler. Çalışmadaki vaka ve kontrol grubundaki toplam birey sayısı olası etkiyi ortaya çıkarmaya yeterli olmamış olabilir. Köpeklerde ilk defa tanımlanan ve veritabanlarına girilecek olan bu SNP'lerle ilgili daha fazla sayıda hasta üzerinde çalışma yürütülmesi önerilebilir.

5.4. KORUNMUŞ BİR GEN OLARAK *CDKN1B*

p27 proteinin hücre siklusunun düzenlenmesinin yanı sıra hücre migrasyonu, transkripsiyonun düzenlenmesi, sitoskelet organizasyonu, otofaji, sitokinez, hücre farklılaşması ve hareketliliği gibi birçok farklı görevi bulunmaktadır (Sharma ve diğ., 2016). Bu temel görevleri nedeniyle tür içi ve türler arası korunmuşluk seviyesi yüksektir. Türler arası homolojiye bakıldığında *CDKN1B* geninin şempanze, Rhesus maağı, köpek, sığır, fare, sıçan, tavuk ve zebra balığında korunmuş olduğu görülmektedir (NCBI). *CDKN1B* geni ve p27 proteini dizileri karşılaştırıldığında da köpeklerdeki dizinin şempanze ve Rhesus maağından sonra insana en benzer dizi olduğu görülmektedir (Tablo 4.3). mRNA ve aminoasit dizilerinde %90 benzerlik bulunmaktadır (Şekil 4.8).

Bu çalışmada da farklı ırklardan köpeklerde yapılan analizlerde tür içinde özellikle ekzon ve intronlarda monomorfik bir tabloyla karşılaşılmıştır. Köpek *CDKN1B* geni için veri tabanlarında bugüne kadar bildirilmiş sadece bir adet A/G polimorfizmi bulunmaktadır ve 5'UTR bölgesinde yer almaktadır (dbSNP rs850568697). Kodlayıcı bölgelerde bir polimorfizm belirlenmemiştir. Çalışmamıza dahil olan köpekler söz konusu polimorfizm açısından monomorfik bulunmuştur. Kodlayıcı bölgelerde herhangi bir polimorfizme rastalanmamıştır. Kodlayıcı bölgeler göz önüne alındığında çalışmanın sonuçları ROS_Cfam_1.0 köpek genomundan elde edilen veritabanlarıyla uyumludur.

Ancak insanlarda bazı kanser türlerinde çok sayıda somatik mutasyon bildirilmiştir. Kanser hücrelerinin genetik analizleri sonucunda meme kanseri, prostat kanseri ve ince bağırsaktaki nöroendokrin tümörlerde genin farklı bölgelerinde ortaya çıkan mutasyonlar ve etkileri bildirilmiştir (Cusan ve diğ., 2018). Bu çalışmada sadece tam kandan izole edilen DNA ile çalışılmıştır. Tümörlü dokulardan izolasyon yapılmamıştır. Tezin temel araştırma konusu *CDKN1B* geninde meme kanserine yatkınlığı belirleyen germ hattı varyantları olup olmadığıdır. İlerleyen çalışmalarda proteinin fonksiyonunu etkileyerek tümorogeneze yol açan somatik mutasyonların araştırılması önem arz etmektedir.

Tablo 4.3: Omurgalı türlerinde, insana benzerlik sırasıyla p27 proteini aminoasit dizisi karşılaştırması.

Tür	Erişim no.	Aminoasit dizisi
İnsan	NP 004055.1	1 MSNVRVSNNGSPSLERMDARQAHPKPSACRNLFPGVDHEELTRDLEKHCR 50
Şempanze	XP 522347.3	1 MSNVRVSNNGSPSLERMDARQAHPKPSACRNLFPGVDHEELTRDLEKHCR 50
Rhesus makağı	XP 001085433.1	1 MSNVRVSNNGSPSLERMDARQAHPKPSACRNLFPGVDHEELTRDLEKHCR 50
Köpek	NP 001002957.1	1 MSNVRVSNNGSPTSERRDAKQAEYPKPSACRNLFPGVNHEELTRDLEKHCR 50
Siğir	NP 001093816.1	1 MSNVRVSNNGSPSLERMDARQAEPKPSACRNLFPGVNHEELTRDLEKHCR 50
Fare	NP 034005.2	1 MSNVRVSNNGSPSLERMDARQAHPKPSACRNLFPGVNHEELTRDLEKHCR 50
Sıçan	NP 113950.2	1 MSNVRVSNNGSPSLERMDARQTEHPKPSACRNLFPGVNHEELTRDLEKHCR 50
Tavuk	NP 989587.1	1 MSNVRISNGSPTLERMEARQSEYKPSACRNLFPGVNHEELNRDLKKHRK 50
Zebra balığı	NP 997957.1	1 MSNVRLSNGSPTLERMEARLSDQPKPSACRNLFPGVDHEELKKDFQRQLR 50
İnsan	NP 004055.1	51 DMEEASQRKWNFDFQNHKP-LEGKYEWQVEKGSLEPFYYRPPRPPKGAC 99
Şempanze	XP 522347.3	51 DMEEASQRKWNFDFQNHKP-LEGKYEWQVEKGSLEPFYYRPPRPPKGAC 99
Rhesus makağı	XP 001085433.1	51 DMEEASQRKWNFDFQNHKP-LEGKYEWQVEKGSLEPFYYRPPRPPKGAC 99
Köpek	NP 001002957.1	51 DMEEASQRKWNFDFQNHKP-LEGKYEWQVEKGSLEPFYYRPPRPPKGAC 99
Siğir	NP 001093816.1	51 DMEEASQRKWNFDFQNHKP-LEGKYEWQVEKGSLEPFYHRPPRPPKGAC 99
Fare	NP 034005.2	51 DMEEASQRKWNFDFQNHKP-LEGRYEWQVEKGSLEPFYYRPPRPPKSAC 99
Sıçan	NP 113950.2	51 DMEEASQRKWNFDFQNHKP-LEGRYEWQVEKGSLEPFYYRPPRPPKSAC 99
Tavuk	NP 989587.1	51 EMEEACQRKWNFDFQNHKP-LEGRYEWQAVEKGSPPDFYFRQRLSKAVC 99
Zebra balığı	NP 997957.1	51 TMEDASAEAWNDFSTHTPRADGRYQWEALDIRSVPGFYRSERGGKSDI 100
İnsan	NP 004055.1	100 KVPA-----QESQDVSGSRPAAPLIGAPANSEDTHLVDPKTDPDSQTGL 144
Şempanze	XP 522347.3	100 KVPA-----QESQDVSGSRPAAPLIGAPANSEDTHLVDPKTDPDSQTGL 144
Rhesus makağı	XP 001085433.1	100 KVPA-----QESQDVSGSRPAAPLIGAPANPEDTHLVDPKTDPDSQTGL 144
Köpek	NP 001002957.1	100 KVPA-----QESQDVSGTRQAGPLIGSQANSEDTHLVDQKTDAPDSQTGL 144
Siğir	NP 001093816.1	100 KVPA-----QEGQDASGARPAVPLLGSQLANPEDTHLVDQKTDAPDSQTGL 144
Fare	NP 034005.2	100 KVLA-----QESQDVSGSRQAVPLIGSQANSEDRHLVDQMPDSSDNPAAGL 144
Sıçan	NP 113950.2	100 KVPA-----QESLDVSGSRQAVPSIGSQANSEDRHLVDQMPDSSDSPAGL 144
Tavuk	NP 989587.1	100 KSAG-----RQSLDVNGNCQTAICAASQGISEDTHCVGRKTDVAGSQTD 144
Zebra balığı	NP 997957.1	100 HISSSGNNNDNNVDVNGNH-----DCRVTEQSAETPETLRE- 136
İnsan	NP 004055.1	145 AEQCAGIRKRPATDDSSQNKANRTEENVSDGSPNAGSVEQTPKKPGLR 194
Şempanze	XP 522347.3	145 AEQCAGIRKRPATDDSSQNKANRTEENVSDGSPNAGSVEQTPKKPGLR 194
Rhesus makağı	XP 001085433.1	145 AEQCAGIRKRPATDDSSQNKANRTEENVSDGSPNAGSVEQTPKKPGLR 194
Köpek	NP 001002957.1	145 AEQCAGIRKRPATDDSSQNKANRTEENVSDGSPNAGSVEQTPKKPGLR 194
Siğir	NP 001093816.1	145 AEQCPGIRKRPAAEDSSQNKANRTEENVSDGSPNAGSVEQTPKKPGLR 194
Fare	NP 034005.2	145 AEQCPGMRKRPAAEDSSQNKANRTEENVSDGSPNAGTVEQTPKKPGL- 193
Sıçan	NP 113950.2	145 AEQCPGMRKRPAAEDSSQNKANRTEENVSDGSPNAGTVEQTPKKPGL- 193
Tavuk	NP 989587.1	145 AEQCAGQRKRPAAEDSSQNKANRTEENVSDGSPNAGTVEQTPKKPGL- 194
Zebra balığı	NP 997957.1	137 -----PRKRSSCLDSSCQSKRSHICVDEVT-----RTPRKPKK 170
İnsan	NP 004055.1	195 RRQT----- 198
Şempanze	XP 522347.3	195 RRQT----- 198
Rhesus makağı	XP 001085433.1	195 RRQT----- 198
Köpek	NP 001002957.1	195 RRQT----- 198
Siğir	NP 001093816.1	195 RRQT----- 198
Fare	NP 034005.2	194 RRQT----- 197
Sıçan	NP 113950.2	194 RRQT----- 197
Tavuk	NP 989587.1	195 RHQT----- 198
Zebra balığı	NP 997957.1	171 RKPLSPTPT 179

Şekil 4.8: İnsan ve köpek p27 geninin nükleotid dizilerinin karşılaştırması.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
765 bits(414)	0.0	537/598(90%)	2/598(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGTCAAACGTGCGAGTGTCTAACGGGAGCCCGA-CTCGGAGCGGAGGACGCCAAACA	59		
Sbjct 473	ATGTCAAACGTGCGAGTGTCTAACGGGAGCCCTAGCCT-GGAGCGGATGGACGCCAGGCA	531		
Query 60	GGCCGAGTACCCCAAGCCCTCCGCCTGCAGGAACCTCTTCGGCCCGGTCAACCACGAAGA	119		
Sbjct 532	GGCGGAGCACCACCAAGCCCTCGGCCTGCAGGAACCTCTTCGGCCCGGTGGACACGAAGA	591		
Query 120	GTGACCCGGGACTTGGAGAAGCACTGCATAGACATGGAAGAGGCGAGCCAAAACAAGTG	179		
Sbjct 592	GTTAACCCTGGGACTTGGAGAAGCACTGCAGAGACATGGAGAGGCGAGCCAGCGCAAGTG	651		
Query 180	GAATTTTGATTTCAGAATCACAAGCCCTTGGAGGGCAAATACGAGTGGCAGGAGGTGGA	239		
Sbjct 652	GAATTTGATTTTCAGAATCACAAGCCCTAGAGGGCAAGTACGAGTGGCAAGAGGTGGA	711		
Query 240	GAAGGGCAGCTTGCCCGAGTTCTACTACAGACCCCGCGGCCACCCAAAGGCGCTGCAA	299		
Sbjct 712	GAAGGGCAGCTTGCCCGAGTTCTACTACAGACCCCGCGGCCACCCAAAGGTGCCTGCAA	771		
Query 300	GGTGCCGCGCAGGAGAGCCAGGACGTGAGCGGGACCCGCCAGGCGGGCCCTTTACTGGG	359		
Sbjct 772	GGTGCCGCGCAGGAGAGCCAGGATGTCAGCGGGAGCCGCCGCGGCCCTTTAATTGG	831		
Query 360	GTCTCAGGCCAACTCAGAGGACACACTTGGTAGACCAAAAGACTGATGCGCCGACAG	419		
Sbjct 832	GGCTCCGGCTAACTCTGAGGACACGCATTTGGTGGACCCAAAGACTGATCCGTCGACAG	891		
Query 420	CCAGACGGGGCTAGCGGAGCAGTGCCTGGGATCAGGAAGCGACCCGCGACCGACGATTC	479		
Sbjct 892	CCAGACGGGGTTAGCGGAGCAATGCGCAGGAATAAGGAAGCGACCTGCAACCGACGATTC	951		
Query 480	CTCTCCTCAAAACAAAAGAGCCAAACAGAACAGAGAAAACGTCTCAGACGGTTCCCCGAA	539		
Sbjct 952	TTCTACTCAAAACAAAAGAGCCAAACAGAACAGAGAAAATGTTTCAGACGGTTCCCCAAA	1011		
Query 540	CGCGGGTTCAGTGGAGCAGACGCCCTAAGAAGCCGGGCTTAGAAGACGTCAAACGTAA	597		
Sbjct 1012	TGCGGGTTCAGTGGAGCAGACGCCCAAGAAGCCTGGCCTCAGAAGACGTCAAACGTAA	1069		

5.5. *CDKN1B* GENİ 3'UTR BÖLGESİNDE TESPİT EDİLEN SNP'LER

CDKN1B geninde hem insanda hem de köpeklerde, 5' ve 3'UTR'lerin toplamı kodlayıcı dizilerden daha fazladır (Ensembl.org). Fonksiyonel açıdan bu bölgelerin gen ifadenmesinde etkin olduğu düşünülmektedir (Cusan ve diğ., 2018). Yukarıda belirtildiği gibi çalışmamızda köpek *CDKN1B* geninin 3'UTR bölgesinde 7 adet SNP tespiti edilmiştir. p27 ekspresyonunun insanlarda mikroRNA'lar aracılığıyla düzenlendiği, özellikle miR-221 ve miR-222'nin mRNA degradasyonunda etkili olduğu bilinmektedir (Cusan ve diğ., 2018). Hücre kültürü çalışmalarında p27 ve miR-223 etkileşiminin hücre proliferasyonu/hücre siklusunun durması düzenlenmesinde etkili olduğu belirlenmiştir (Armenia ve diğ., 2014). Bu nedenle p27 ifadenme düzeyleri ve bunun hücre döngüsündeki etkilerinde 3'UTR'deki mutasyonların dikkate alınması önem taşımaktadır.

Yorumu kolay olduğundan dolayı, ilişkilendirme çalışmalarında, genlerin eksprese edilen kodlama bölgelerinde (eksonlar) bulunan genetik varyantlara daha fazla öncelik verilmektedir. Fakat kodlama varyantları kompleks hastalıkları tanımlamak için yetersiz kalır. İntronlar veya UTR'lerdeki varyantlar, protein dizisini değiştirmese de, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli fonksiyonlara sahip olabilirler (Steri ve diğ., 2018)

UTR'ler, kodlama dizisinin başlangıcını ve sonunu çevreleyen haberci RNA (mRNA) dizileridir ama proteine çevrilmezler. Özellikle, GWAS çalışmalarında tespit edilen genetik varyantların %3,7'sinin UTR'lerde yer aldığı bildirilmiştir. Polimorfizmler ve mutasyonlar, bir veya daha fazla nükleotid değişikliği içerebilir. Yapılan araştırmalarda, mutasyonların 5'UTR'lerde, polimorfizmlerin ise 3'UTR'lerde daha yaygın olduğu bildirilmiştir. Bu bölgelerdeki düzenleyici mekanizmaların değiştirilmesi moleküler yolları ve hücresel süreçleri değiştirebilir. Bu durum da çeşitli hastalıkların görülmesine neden olabilir. UTR'lerdeki genetik varyasyonlar, melanom, multiple miyelom, bipolar bozukluk, meme kanseri ve diğer patolojiler gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Steri ve diğ., 2019).

3'UTR, kodlama dizisinin aşağı akışında bulunur ve RNA stabilitesi, mRNA translasyonu ve lokalizasyonu gibi düzenleyici mekanizmalarda yer alır. 3'UTR, miRNA'lar için bağlanma bölgelerine sahiptir. Bu nedenle 3'UTR uzunluğundaki ve dizisindeki herhangi bir varyasyon, miRNA'ların bağlanmasını değiştirerek ya da engelleyerek gen ifadesinde değişikliğe yol açabilir. miRNA'lar, mRNA'ların 3'UTR içindeki homolog dizileri eşleştirerek çok çeşitli hedef genlerin ekspresyonunu modüle edebilen kısa (19-25 nükleotid) RNA

dizileridir, böylece onların translasyonunu önleyebilir veya bozabilir veya RNA bozulmasını teşvik edebilir (Gramantieri ve diğ., 2009).

miRNA'lar, çoğunlukla hedef mRNA'ların 3'UTR'sinde bulunan miRNA düzenleyici öğeleri tanır ve bağlar; ancak 5'UTR gibi diğer bölgeleri bağlayan miRNA'ların varlığı da bildirilmiştir. Fonksiyonel varyantlar, hedef mRNA'da miRNA bağlanma bölgeleri oluşturmalarına veya bozmalarına bağlı olarak iki gruba ayrılabilir. Ek olarak, SNP'ler ve genel olarak genetik varyantlar, bağlanma bölgelerine erişilebilirliği etkileyerek veya olgun mRNA'daki miRNA bağlama bölgesinin varlığını değiştirerek mRNA'nın ikincil yapısını değiştirebilir (Steri ve diğ., 2019).

p27 ekspresyonunun insanlarda mikroRNA'lar aracılığıyla düzenlendiği, özellikle miR-221 ve miR-222'nin mRNA degradasyonunda etkili olduğu bilinmektedir (Cusan ve diğ., 2018). Hücre kültürü çalışmalarında p27 ve miR-223 etkileşiminin hücre proliferasyonu/hücre siklusunun durması düzenlenmesinde etkili olduğu belirlenmiştir (Armenia ve diğ., 2014). Bu nedenle p27 ifadenme düzeyleri ve bunun hücre döngüsündeki etkilerinde 3'UTR'deki mutasyonların dikkate alınması önem taşımaktadır.

Bir çalışmada; miRNA'ların birkaç farklı kanserde hem tümör baskılayıcı hem de onkogen olarak hareket ettiği bulunduğundan, on miRNA (miR-15a, miR-16, miR-17-5p, miR-21, miR-29b, miR-125b, insan meme kanserleri ile ilişkili olduğu bilinen miR-145, miR-155, miR-181b, let-7f), malign köpek meme tümörleri ve normal köpek meme dokusu ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler, kanserli numunelerde miR-29b ve miR-21'in istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir yukarı regülasyona sahip olduğunu ortaya koymuştur (Boggs ve diğ., 2008). Köpek meme tümörlerinde anlamlı bulunan bu iki miRNA'nın ise p27 proteini ile ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucu; miR-29b'nin aşırı ekspresyonu, hücre döngüsüne bağlı kinaz inhibitörleri p21 ve p27'nin ekspresyonunu indükleyerek G1 fazındaki hücrelerin yüzdesini önemli ölçüde arttırdığı belirtilmiştir (Li ve diğ., 2013; Amodio ve diğ., 2012).

Domuz gronüloza hücrelerinde miR-29b etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise; miR-29b nin yıkımının *CDKN1B* geninin ekspresyonunu azalttığı belirtilmiştir (Hilker, 2022).

Bir onkogen olarak miR-21'in aşırı ekspresyonu, daha kötü tümör farklılaşması, lenf nodu metastazı ve T evresi ile ilişkilidir.

Mide kanserinde mTOR sinyal yolunun aktive olduğu bildirilmiştir. Aktive edilmiş mTOR, mide kanserli hastalarda tümör progresyonu ve kötü sağkalım ile pozitif korelasyon göstermiştir. mTOR inhibitörünün hücre döngüsü durmasını ve mide kanseri hücre hattının apoptozunu indüklediği doğrulanmıştır. Yapılan bir çalışmada mide kanseri için kullanılan bir ilacın etkisinin, miR-21-mTOR sinyal yolunu inhibe ederek p27 protein seviyesindeki bir artıştan kaynaklandığı bildirilmiştir (Sha ve diğ., 2015).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise miR-21'in dolaylı yoldan p21/p27 ifadesinin inhibisyonuna yol açtığı rapor edilmiştir (Li ve diğ., 2014).

Çalışmamızda bulduğumuz 7 adet polimorfizm *CDKN1B* geninin 3'UTR bölgesinde yer almaktadır. Bu bölgelerin miRNA'ların bağlanmak için hedef bölgesi olduğu bildirilmiştir. Köpeklerde yapılan çalışmalarda, köpek meme kanseri ile ilişkili iki adet miRNA bulunmuştur. Yayınlanan başka araştırmalar sonucu ise bu miRNA'ların ise p27 proteini ekspresyonu ile ilişki olduğu belirtilmiştir. Bu miRNA'ları kodlayan bölgelerdeki herhangi bir polimorfizmin p27 ifadesinde değişikliğe neden olabileceği dolayısıyla da meme tümörü gelişimine neden olabileceği düşünülmektedir. İleride köpek meme tümörü konusunda yapılacak çalışmalarda, p27 proteinini etkileyen bu miRNA'ların çalışmamızda bulduğumuz polimorfizmler ile anlamlı bir ilişkisi olabileceği düşünülebilir.

5.6. *CDKN1B* GEN VARYANTLARININ p27 DÜZEYİYLE İLİŞKİSİ

Bu çalışmada; *CDKN1B* geninin 3'UTR bölgesinde 7 adet SNP tespit edilmiştir. Bu SNP'ler şu şekilde sıralanabilir: 5274: 27:33783892 A>C, 5413: 27:33783753 A>G , 5538: 27:33783628 G>A, 5551: 27:33783615 G>A, 5601: 27:33783565 G>A, 5683: 27:33783483 G>A, 5713: 27:33783453 C>A . Bu SNP'ler ile meme tümörü arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

İnsanlarda kalıtsal ailesel ve sporadik kanser vakaları üzerine bugüne kadar yapılan çalışmalara bakıldığında *CDKN1B* geninde sorumlu olabilecek çok sayıda germ hattı ve somatik mutasyon belirlenmiştir. Ancak yine çalışmaların bulguları gendeki mutasyonlarla p27 proteini ekspresyonu arasındaki ilişkiyi tam olarak açıklayamamaktadır. Bizim çalışmamızda da tespit edilen 7 SNP ile meme kanseri arasında bir ilişki saptanamamıştır, bunun nedeni söz konusu mutasyonların p27 düzeylerini etkilememesi olabilir.

p27'nin bir özelliği de "özünde düzensiz" bir protein (IDP- intrinsically disordered protein) olmasıdır. IDP'ler başka makromoleküller ile etkileşime girmeden düzenli bir yapı

kazanmayan ve düzensiz bölgelere sahip proteinlerdir, bu nedenle fonksiyonel düzenlenmede post-translasyonel modifikasyonlar önemli bir etkiye sahiptir (Cusan ve diğ., 2018; Dyson ve Wright, 2005). Tümör gelişiminde rol oynadığı bilinen p27 proteinin kodlayan *CDKN1B* geninde çalışmamızdaki köpeklerde etkili bir polimorfizme rastlanmaması, bu şekilde açıklanabilir. Crona ve diğ. (2015) ince bağırsak nöroendokrin tümörü olan 200 hastadan elde edilen 362 örnek inceledikleri araştırma sonucunda, %8 oranıyla hastalar arasında en sık mutasyona uğrayan gen olarak *CDKN1B* tespit edilmiştir. Ancak *CDKN1B* mutasyonları ile p27 proteininin ekspresyonu arasında bir korelasyon belirlenememiştir. *CDKN1B* mutasyonu içeren ve içermeyen tümör taşıyıcıları arasında da klinik veriler açısından net bir farklılık gözlemlenmemiştir. Çalışmamızda 3'UTR bölgesinde tespit edilen 7 adet SNP'nin de benzer şekilde vaka ve kontrollerdeki dağılımları meme kanseriyle belirgin bir ilişkiye işaret etmemektedir. Söz konusu SNP'lerin p27 ekspresyon düzeylerini değiştirmedeği ileri sürülebilir. İleride köpeklerde meme kanseri ya da başka kanserlerde p27'nin görevi üzerine yapılacak çalışmalarda *CDKN1B* genindeki varyantların yanı sıra tümörlü dokuda p27 ekspresyonunun da belirlenmesi önem taşımaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

NGS (Next Generation Sequencing) ile *CDKN1B* geninin kanserdeki rolü daha fazla ortaya kinsa da, henüz bu gendeki mutasyonlarla, genin ürünü olan p27 ekspresyon düzeyi arasındaki ilişki henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Hem insanlarda hem de uygun bir model olan köpekte yapılan çalışmalar her iki türün sağlığı için önem taşımaktadır. Köpek *CDKN1B* genindeki varyantlar, bunların p27 protein ifadenme düzeyi üzerine etkileri, p27 proteininin tümör süpresör rolünü, kalıtsal ve sporadik kanserlerin ortaya çıkmasındaki mekanizmaları aydınlatmak için genetik ve fonksiyonel çalışmaların birlikte yürütülmesi gerekmektedir. Ayrıca yeni nesil genetik analiz yöntemlerinin devreye sokulması çalışmaları hızlandıracaktır.

Genetik ve birçok çevresel faktöre bağlı olarak ortaya çıkan meme kanserinin köpeklerdeki genetik alt yapısını, metabolik yollarını anlamak tedavi ve profilaksi için büyük önem taşır. Bu güne kadar meme kanserinde p27 ekspresyonunun azalması çeşitli çalışmalar ile bildirilmiştir. Bu nedenle bu gendeki mutasyonların da meme kanserinde önemli olabileceği düşünülmüştür. Köpeklerde daha önce *CDKN1B* geninin dizi analizi yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda hücre siklusunun düzenlenmesinden sorumlu p27'yi kodlayan *CDKN1B* geni tüm gen dizileme yöntemi ile analiz edilmiştir. Meme tümörlü vaka ve sağlıklı kontrol gruplarının karşılaştırılmasıyla; *CDKN1B* geni 3'UTR bölgesinde 7 adet SNP belirlenmiş fakat meme tümörü ile anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Köpek *CDKN1B* geni polimorfizmi ile meme kanseri ilişkisine dair literatürdeki ilk çalışma olması nedeniyle, araştırma bulgularının hastalığın gelişimini aydınlatılmasına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar; özellikle köpeklerde *CDKN1B* mutasyonları ile p27 protein ekspresyonu ve işlevi arasındaki etkileşimin henüz tamamen açıklığa kavuşmaktan uzak olduğunu ve özellikle kodlamayan RNA'ların modülasyonu ile ilgili olarak kesinlikle daha fazla araştırmayı hak ettiğini göstermektedir. Bu nedenle ileride yapılacak olan çalışmalarda; varyantların tümörlerdeki ve sağlıklı dokulardaki p27 ekspresyon düzeyleriyle ilişkisinin belirlenmesi, buna ek olarak p27 geninin ifadenmesinden ve p27 proteininin fonksiyonuna giden süreçteki post-transkripsiyonel ve post-translasyonel aşamaların gen, mRNA ve protein

karşılaştırmasıyla incelenmesi önerilmektedir. Ayrıca kanser oluşumuna neden olan epigenetik faktörlerin, özellikle de miRNA'ların analizi bu çalışmaların geleceği açısından büyük önem taşımaktadır.

Tümör baskılanmasında *p27*'nin rolünü ve özellikle hormonal faktörler tarafından yönlendirilen tümörlerde, ailesel ve sporadik kanserlerde genetik veya fonksiyonel düzensizliğini önemini açıklayabilmek için daha fazla deneysel çalışma gerekli olacaktır. Bu önemli hedefe ulaşmak ve tanımlanan her bir spesifik mutasyonun kanserin başlaması, evreleri, ilerlemesi, metastaz, nodal tutulum, tedavi yanıtı ve sağkalım üzerinde ne ölçüde etkili olduğunu belirlemek için genetik ve fonksiyonel çalışmaların birleştirilmesi, en uygun model sistemlerin kullanılması zorunlu olacaktır.

İleride yapılacak daha kapsamlı çalışmalarla köpek meme kanserinin anlaşılmasına katkısı olan, anlamlı SNP'nin tespit edilmesi ve meme kanseri oluşumunda etkili metabolik yollarda görev alan farklı proteinleri kodlayan genlerin, aday gen potansiyellerinin belirlenmesi veteriner hekimlik açısından önemli olduğu kadar, insanlarda görülen meme kanseri olgularının da aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Adams, V.J., Evans, K.M., Sampson, J., Wood, J.L.N., 2010, Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK, *Journal of small animal practice*, 51 (10), 512-524.

Aktuğ, H., 2014, Apoptozis ve hücre döngüsü, *Ege tıp dergisi*, 53 (1), 60-64.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2015a, *Cancer*, Molecular biology of the cell, Bölüm 20, In: Wolfe, N. (ed.), Garland science, U.S.A, ISBN: 978-0-8153-4432-2, 1091-1145.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2015b, *The cell cycle*, Molecular biology of the cell, Bölüm 17, In: Wolfe, N. (ed.), Garland science, U.S.A, ISBN: 978-0-8153-4432-2, 963-1021.

Alenza, M.P., Pena, L., Castillo, N.D., Nieto, A.I., 2000, Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours, *Journal of small animal practice*, 41 (7), 287-291.

Alkarain, A., Jordan, R., Slingerland, J., 2004, p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy, *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 9 (1), 67-80.

Amodio, N., Di Martino, M. T., Foresta, U., Leone, E., Lionetti, M., Leotta, M., Gulla, A.M., Pitari, M.R., Conforti, F., Rossi, M., Agosti, V., Fulciniti, M., Misso, G., Morabito, F., Ferrarini, M., Neri, A., Caraglia, M., Munshi, N.C., Anderson, K.C., Tagliaferri, P., Tassone, P., 2012, miR-29b sensitizes multiple myeloma cells to bortezomib-induced apoptosis through the activation of a feedback loop with the transcription factor Sp1. *Cell death & disease*, 3 (11), e436-e436.

Argyle, D.J., Brearley, M.J., Turek, M.M., 2008, *Decision Making in Small Animal Oncology*, Wiley-Blackwell, USA.

Arı, M., 2018, *Meme kanseri hücre dizisinde (mcf-7) oleuropein ve d vitamininin antiproliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerinin araştırılması*, Tez (Doktora), Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Armenia, J., Fabris, L., Lovat, F., Berton, S., Segatto, I., D'Andrea, S., Ivan, C., Cascione, L., Calin, G.A., Croce, C.M., Colombatti, A., Vecchione, A., Belletti, B., Baldassarre, G., 2014, Contact inhibition modulates intracellular levels of miR-223 in a p27kip1-dependent manner, *Oncotarget*, 5 (5), 1185.

Arslan, G., Önkol, T., Özçelik, A.B., 2022, Siklin bağımlı kinaz 4/6 ve inhibitörleri, *Ankara eczacılık fakültesi dergisi*, 46 (1), 193-208.

Asselin-Labat, M.L., Vaillant, F., Sheridan, J.M., Pal, B., Wu, D., Simpson, E. R., Yasuda, H., Smyth, G.K., Martin, T.J., Lindeman, G., Visvader, J.E., 2010, Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling, *Nature*, 465 (7299), 798-802.

- Aughey, E., Frye, F.L., 2001, *Female reproductive system*, Comparative veterinary histology, In: Northcott, J. (ed.), Bölüm 12, Manson Publishing Ltd., London, ISBN: 1-874545-66-9, 194-195.
- Aydın, D., Erdikmen, D.O., Ülgen, S., Demirutku, A., Durmuş, D., 2011, Kedi ve köpeklerde paraneoplastik sendromlar, *Erciyes üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 8 (2), 127-137.
- Bala, M., 2005, *Clinical studies on the evaluation of doxorubicin as an adjuvant chemotherapy for the management of canine mammary neoplasms*, Tez (Yüksek Lisans), Punjab Agricultural University.
- M, R.B., Bufalo, N.E., Secolin, R., Assumpção, L.V., Maciel, R.M., Cerutti, J.M., Ward, L.S., 2014, Polymorphisms of cell cycle control genes influence the development of sporadic medullary thyroid carcinoma, *European journal of endocrinology*, 171 (6), 761-767.
- Barh, D., Malhotra, R., Ravi, B., Sindhurani, P., 2010, MicroRNA let7: an emerging next-generation cancer therapeutic, *Current oncology*, 17 (1), 70-80.
- Belletti, B., Nicoloso, M.S., Schiappacassi, M., Chimienti, E., Berton, S., Lovat, F., Colombatti, A., Baldassarre, G., 2005, p27kip1 functional regulation in human cancer: a potential target for therapeutic designs, *Current medicinal chemistry*, 12 (14), 1589-1605.
- Bernstein, L., Pu, X., Gu, j., 2017, Endocrine and genetic bases of hormone-related cancers, *Holland-Frei Cancer Medicine*, 9. Baskı, In: Bast Jr., R.C., Croce, C.M., Hait, W.N., Hong, W.K., Kufe, D.W., Piccart-Gebhart, M., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Wang, H., Holland, J.F. (ed.), Bölüm 4 (24), Wiley-Blackwell, New Jersey, ISBN: 9781119000839, 307-321.
- Bertagnolli, A.C., Cassali, G.D., Genelhu, M.C.L.S., Costa, F.A., Oliveira, J.F.C., Gonçalves, P.B.D., 2009, Immunohistochemical expression of p63 and Δ Np63 in mixed tumors of canine mammary glands and its relation with p53 expression, *Veterinary pathology*, 46 (3), 407-415.
- Bian, C., Li, Z., Xu, Y., Wang, J., Xu, L., Shen, H., 2015, Clinical outcome and expression of mutant P53, P16, and Smad4 in lung adenocarcinoma: a prospective study, *World journal of surgical oncology*, 13 (1), 1-8.
- Bird, R.C., DeInnocentes, P., Church Bird, A.E., van Ginkel, F.W., Lindquist, J., Smith, B.F., 2011, An autologous dendritic cell canine mammary tumor hybrid-cell fusion vaccine, *Cancer immunology, immunotherapy*, 60 (1), 87-97.
- Blagosklonny, M.V., 2001a, *Cell Cycle Molecular Targets and Drug Discovery*, Cell Cycle Checkpoints and Cancer, In: Blagosklonny, M.V. (ed.), Bölüm 4, Eurekah, U.S.A, ISBN: 1-58706-067-1, 235-241.
- Blagosklonny, M.V., 2001b, *DNA Damage*, Cell Cycle Checkpoints and Cancer, In: Blagosklonny, M.V. (ed.), Bölüm 4, Eurekah, U.S.A, ISBN: 1-58706-067-1, 65-73.
- Bocchinfuso, W.P., Gil, K.S., 1997, Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 2 (4), 323-334.
- Boggs, R.M., Wright, Z.M., Stickney, M.J., Porter, W.W., Murphy, K.E., 2008, MicroRNA expression in canine mammary cancer, *Mammalian genome*, 19 (7), 561-569.

- Boldizsar, H., Szenci, O., Muray, T., Csenki, J., 1992, Studies on canine mammary tumours. I. Age, seasonal and breed distribution, *Acta veterinaria hungarica*, 40 (1-2), 75-87.
- Borge, K.S., Børresen-Dale, A.L., Lingaas, F., 2011, Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour, *Veterinary and comparative oncology*, 9 (4), 241-250.
- Borge, K.S., Melin, M., Rivera, P., Thoresen, S.I., Webster, M.T., von Euler, H., Lindblad-Toh, K., Lingaas, F., 2013, The ESR1 gene is associated with risk for canine mammary tumours, *BMC veterinary research*, 9 (1), 1-9.
- Briskin, C., 2013, Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight, *Nature reviews cancer*, 13 (6), 385-396.
- Brodey, R.S., 1983, Canine mammary gland neoplasms, *Journal of the american animal hospital association*, 19, 61-90.
- Bugalho, M.J., Domingues, R., 2016, Uncommon association of cerebral meningioma, parathyroid adenoma and papillary thyroid carcinoma in a patient harbouring a rare germline variant in the CDKN1B gene, *Case reports*, 2016, bcr2015213934.
- Bujak, J.K., Szopa, I.M., Pingwara, R., Kruczyk, O., Krzemińska, N., Mucha, J., Majchrzak-Kuligowska, K., 2020, The expression of selected factors related to T lymphocyte activity in canine mammary tumors, *International journal of molecular sciences*, 21 (7), 2292.
- Bunz, F., 2008, *Cancer gene pathways*, Principles of cancer genetics, 2.baskı, 6.Bölüm, Springer Science+Business Media, U.S.A, ISBN: 978-94-017-7482-6, 203-271.
- Cabadak, H., 2008, Hücre siklusu ve kanser, *Adnan Menderes Üniversitesi tıp fakültesi dergisi*, 9 (3), 51-61.
- Canbay, E., Eraltan, I.Y., Cercel, A., Isbir, T., Gazioglu, E., Aydogan, F., Cacina, C., Cengiz, A., Ferahman, M., Zengin, E., Unal, H., 2010, CCND1 and CDKN1B polymorphisms and risk of breast cancer, *Anticancer research*, 30 (7), 3093-3098.
- Cassali, G.D., Lavallo, G.E., De Nardi, A.B., Ferreira, E., Bertagnolli, A.C., Estrela-Lima, A., Alessi, A.C., Daleck, C.R., Salgado, B.S., Fernandes, C.G., Sobral, R.A., Amorim, R.L., Gamba, C.O., Damasceno, K.A., Auler, P.A., Magalhães, G.M., Silva, J.O., Raposo, J.B., Ferreira, A.M.R., Oliveira, L.O., Malm, C., Zuccari, D.A.P.C., Tanaka, N.M., Ribeiro, L.R., Campos, L.C., Souza, C.M., Leite, J.S., Soares, L.M.C., Cavalcanti, M.F., Fonteles, Z.G.C., Schuch, I.D., Paniago, J., Oliveira, T.S., Terra, E.M., Castanheira, T.L.L., Felix, A.O.C., Carvalho, G.D., Guim, T.N., Guim, T.N., Garrido, E., Fernandes, S.C., Maia, F.C.L., Dagli, M.L.Z., Rocha, N.S., Fukumasu, H., Grandi, F., Machado, J.P., Silva, S.M.M.S., Bezerril, J.E., Frehse, M.S., Almeida, E.C.P., Campos, C.P., 2011, Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors, *Brazilian journal of veterinary pathology*, 4 (2), 153-180.
- Cassali, G.D., Gobbi, H., Malm, C., Schmitt, F.C., 2007, Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours, *Cytopathology*, 18 (3), 191-196.
- Catzavelos, C., Bhattacharya, N., Ung, Y.C., Wilson, J.A., Roncari, L., Sandhu, C., Shaw, P., Yeger, H., Morava-Protzner, I., Kapusta, L., Franssen, E., Pritchard, K.I., Slingerland, J.M.,

1997, Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer, *Nature medicine*, 3 (2), 227-230.

Chandler, M.R., Bilgili, E.P., Merner, N.D., 2016, A review of whole-exome sequencing efforts toward hereditary breast cancer susceptibility gene discovery. *Human mutation*, 37 (9), 835-846.

Chang, B.L., Zheng, S.L., Isaacs, S.D., Wiley, K.E., Turner, A., Li, G., Walsh, P.C., Meyers, D.A., Isaacs, W.B., Xu, J., 2004, A polymorphism in the CDKN1B gene is associated with increased risk of hereditary prostate cancer, *Cancer research*, 64 (6), 1997-1999.

Chappuis, P.O., Kapusta, L., Bégin, L.R., Wong, N., Brunet, J.S., Narod, S.A., Slingerland, J., Foulkes, W.D., 2000, Germline BRCA1/2 mutations and p27Kip1 protein levels independently predict outcome after breast cancer, *Journal of clinical oncology*, 18 (24), 4045-4052.

Chen, S.T., Yu, S.Y., Tsai, M., Yeh, K.T., Wang, J.C., Kao, M.C., Shih, M.C., Chang, J.G., 1999, Mutation analysis of the putative tumor suppression gene PTEN/MMAC1 in sporadic breast cancer, *Breast cancer research and treatment*, 55, 85-89.

Clemons, M., Goss, P., 2001, Estrogen and the risk of breast cancer. *New England journal of medicine*, 344 (4), 276-285.

Crona, J., Gustavsson, T., Norlén, O., Edfeldt, K., Åkerström, T., Westin, G., Hellman, P., Björklund, P., Ståhlberg, P., 2015, Somatic mutations and genetic heterogeneity at the CDKN1B locus in small intestinal neuroendocrine tumors, *Annals of surgical oncology*, 22 (3), 1428-1435.

Cusan, M., Mungo, G., De Marco Zompit, M., Segatto, I., Belletti, B., Baldassarre, G., 2018, Landscape of CDKN1B mutations in luminal breast cancer and other hormone-driven human tumors, *Frontiers in endocrinology*, 9, 393.

Davis, B.W. ve Ostrander, E.A., 2014, Domestic dogs and cancer research: a breed-based genomics approach, *ILAR journal*, 55 (1), 59-68.

de los Monteros, A.E., Millán, M.Y., Ramirez, G.A., Ordas, J., Reymundo, C., De Las Mulas, J.M., 2005, Expression of maspin in mammary gland tumors of the dog, *Veterinary pathology*, 42 (3), 250-257.

de Los Monteros, A.E., Millán, M. Y., Ordás, J., Carrasco, L., Reymundo, C., Martín de Las Mulas, J., 2002, Immunolocalization of the smooth muscle-specific protein calponin in complex and mixed tumors of the mammary gland of the dog: assessment of the morphogenetic role of the myoepithelium, *Veterinary pathology*, 39 (2), 247-256.

Deininger, P., 1999, Genetic instability in cancer: Caretaker and gatekeeper genes, *Ochsner journal*, 1 (4), 206-209.

Denicourt, C. ve Dowdy, S.F., 2004, Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors, *Genes & development*, 18 (8), 851-855.

Destexhe, E., Lespagnard, L., Degeyter, M., Heymann, R., Coignoul, F., 1993, Immunohistochemical identification of myoepithelial, epithelial, and connective tissue cells in canine mammary tumors, *Veterinary pathology*, 30 (2), 146-154.

- Devarathnam, J., Suresh Kumar, R.V., Bharathi, S., Anand Kumar, A., 2021, Epidemiological studies of canine mammary gland tumors, *The pharma innovation journal*, 10 (7), 13-17.
- Doré, M., Lanthier, I., Sirois, J., 2003, Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors, *Veterinary pathology*, 40 (2), 207-212.
- Dreijerink, K.M., Mulder, K.W., Winkler, G.S., Höppener, J.W., Lips, C.J., Timmers, H. T.M., 2006, Menin links estrogen receptor activation to histone H3K4 trimethylation. *Cancer research*, 66 (9), 4929-4935.
- Driver, K.E., Song, H., Lesueur, F., Ahmed, S., Barbosa-Morais, N.L., Tyrer, J. P., Ponder, B.A.J., Easton, D.F., Pharoah, P.D.P., Dunning, A.M., 2008, Association of single-nucleotide polymorphisms in the cell cycle genes with breast cancer in the British population, *Carcinogenesis*, 29 (2), 333-341.
- Dyson, H.J. ve Wright, P.E., 2005, Intrinsically unstructured proteins and their functions, *Nature reviews molecular cell biology*, 6 (3), 197-208.
- Easton, D.F., Pooley, K.A., Dunning, A.M., Pharoah, P.D., Thompson, D., Ballinger, D.G., ... & Ponder, B.A., 2007, Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci, *Nature*, 447 (7148), 1087-1093.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1993, WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell*, 75 (4), 817-825.
- Eng, C., 2003, PTEN: one gene, many syndromes, *Human mutation*, 22 (3), 183–98.
- Enginler, S.O., Akış, I., Toydemir, T.S.F., Oztabak, K., Haktanir, D., Gündüz, M.C., Kırşan, I., Fırat, I., 2014, Genetic variations of BRCA1 and BRCA2 genes in dogs with mammary tumours, *Veterinary research communications*, 38 (1), 21-27.
- Evans, H.E., Lahunta, A., 2012, *The urogenital system*, Miller's anatomy of the dog, 4. Baskı, Bölüm 9, Saunders, U.S.A., ISBN: 978-143770812-7, 398-401.
- Fero, M.L., Randel, E., Gurley, K.E., Roberts, J.M., Kemp, C.J., 1998, The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression, *Nature*, 396 (6707), 177-180.
- Fero, M.L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C.E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L.H., Broudy, V., Perlmutter, R.M., Kaushansky, K., Roberts, J.M., 1996, A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27Kip1-deficient mice, *Cell*, 85 (5), 733-744.
- Ferrando, A.A., Balbín, M., Pendás, A.M., Vizoso, F., Velasco, G., López-Otín, C., 1996, Mutational analysis of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in primary breast carcinomas, *Human genetics*, 97 (1), 91-94.
- Ferreira, E., Bertagnolli, A.C., Cavalcanti, M.F., Schmitt, F.C., Cassali, G.D., 2009, The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours, *Veterinary and comparative oncology*, 7 (4), 230-235.
- Ferreira, E., Bregunci, G.C., Schmitt, F.C., Cassali, G.D., 2003, Protocol for the anatomopathological examination of canine mammary tumors, *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, 55, 105-109.

Figueiredo, J.C., Knight, J.A., Cho, S., Savas, S., Onay, U.V., Briollais, L., Goodwin, P.J., McLaughlin, J.R., Andrulis, I.L., Ozcelik, H., 2007, Polymorphisms cMyc-N11S and p27-V109G and breast cancer risk and prognosis, *BMC cancer*, 7 (1), 1-8.

Fiore, R.D., D'Anneo, A., Tesoriere, G., Vento, R., 2013, RB1 in cancer: Different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis, *Journal of cellular physiology*, 228 (8), 1676-1687.

Fish, E.J., Irizarry, K.J., DeInnocentes, P., Ellis, C.J., Prasad, N., Moss, A.G., Curt Bird, R., 2018, Malignant canine mammary epithelial cells shed exosomes containing differentially expressed microRNA that regulate oncogenic networks, *BMC cancer*, 18 (1), 1-20.

Futreal, P.A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J.C., Wooster, R., Stratton, M.R., 2001, Cancer and genomics, *Nature*, 409, 850-852.

Gama, A., Alves, A., Gartner, F., Schmitt, F., 2003, p63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues, *Veterinary pathology*, 40 (4), 412-420.

García-Osta, A., Dong, J., Moreno-Aliaga, M.J., Ramirez, M.J., 2022, p27, The Cell Cycle and Alzheimer's Disease, *International journal of molecular sciences*, 23 (3), 1211.

Geçkil, H., 2017, Haftanın poster: Hücre döngüsü ve kanser, <https://bilimblogum.wordpress.com/2017/03/10/haftanin-posteri-hucre-dongusu-ve-kanser/>, [Ziyaret tarihi: 10 Mart 2017].

Genuth, S.M., 1998, *The reproductive glands*, Physiology, 4.Baskı, In: Berne, R.M., Levy, M.N. (ed.), Mosby, Inc., St. Louis, 965–1013.

Gil, J., Peters, G., 2003, Regulation of the INK4b–ARF–INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all, *Nature*, 7, 667-677.

Giles, R.C., Kwapien, R.P., Geil, R.G., Casey, H.W., 1978, Mammary nodules in beagle dogs administered investigational oral contraceptive steroids, *Journal of the national cancer institute*, 60 (6), 1351-1364.

Gill, K.S., 1997, *Clinical studies on canine mammary tumours with reference to its surgical and chemotherapeutic management*, Tez (Yüksek lisans), Punjab Agricultural University.

Goebel, K. ve Merner, N.D., 2017, A monograph proposing the use of canine mammary tumours as a model for the study of hereditary breast cancer susceptibility genes in humans, *Veterinary medicine and science*, 3 (2), 51-62.

Goldschmidt, M.H., 1998, Breed related cancers, *The 28th annual canine symposium*, 1998 University of Pennsylvania, Pennsylvania, Bellwether, 20-26.

Goldschmidt, M.H., Pena, L., Zappuli, V., 2017, *Tumors of the mammary gland*, Tumors in domestic animals, 5.baskı, In: Meuten, D.J. (ed.), Wiley blackwell, California, ISBN: 9780813821795, 735-736.

Golias, C.H., Charalabopoulos, A., Charalabopoulos, K., 2004, Cell proliferation and cell cycle control: a mini review, *The international journal of clinical practice*, 58 (12), 1134-1141.

Govender, D., Chetty, R., 2012, Gene of The Month: PTEN, *Journal clinical pathology*, 65 (7), 601-603.

- Gramantieri, L., Fornari, F., Ferracin, M., Veronese, A., Sabbioni, S., Calin, G. A., Grazi, G.L., Croce, C.M., Bolondi, L., Negrini, M., 2009, MicroRNA-221 Targets Bmf in Hepatocellular Carcinoma and Correlates with Tumor Multifocality miR-221 Targets Bmf in HCC, *Clinical cancer research*, 15 (16), 5073-5081.
- Gray, M., Meehan, J., Martínez-Pérez, C., Kay, C., Turnbull, A. K., Morrison, L. R., Pang, L.Y., Argyle, D., 2020, Naturally-occurring canine mammary tumors as a translational model for human breast cancer, *Frontiers in oncology*, 10, 617.
- Gupta, K., Sood, N.K., Uppal, S.K., Mohindroo, J., Mahajan, S., Raghunath, M., Singh, K., 2012, Epidemiological studies on canine mammary tumour and its relevance for breast cancer studies, *IOSR journal of pharmacy*, 2 (2), 322-333.
- Gupta, P., 2008, *Diagnosis of canine mammary neoplasms and their management with adjuvant chemotherapy using vincristine, methotrexate and cyclophosphamide*, Tez (Yüksek lisans), Guru Angad Dev Veterinary and Animal Sciences University.
- Gültiken, N. ve Vural, M.R., 2007, The effect of Tarantula cubensis extract applied in pre and postoperative period of canine mammary tumour, *Journal of Istanbul veterinary sciences*, (2), 13-23.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000, The hallmarks of cancer, *Cell*, 100, 57-70.
- Hellmén, E., 2005, Complex mammary tumours in the female dog: a review, *Journal of dairy research*, 72 (S1), 90-97.
- Hilker, R., 2021, *The Transcriptomic Effects of MicroRNA-29b-3p in Porcine Granulosa Cells*, Tez (Doktora), University of Guelph.
- Hirose, Y., Berger, M.S., Pieper, R.O., 2001, Abrogation of the Chk1 mediated (G2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells, *Cancer research*, 61 (15), 5843-9.
- Hochegger, H., Takeda, S., Hunt, T., 2008, Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?, *Nature reviews molecular cell biology*, 9 (11), 910-916.
- Hoekstra, M.F., 1997, Responses to DNA damage and regulation of cell cycle checkpoints by the ATM protein kinase family, *Elsevier*, 7 (2), 170-175.
- Hsu, W.L., Huang, Y. H., Chang, T.J., Wong, M.L., Chang, S.C., 2010, Single nucleotide variation in exon 11 of canine BRCA2 in healthy and cancerous mammary tissue, *The veterinary journal*, 184 (3), 351-356.
- Ishida, N., Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., 2000, Phosphorylation at serine 10, a major phosphorylation site of p27Kip1, increases its protein stability, *Journal of biological chemistry*, 275 (33), 25146-25154.
- IBM Corp. Released 2011. *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0*. Armonk, NY: IBM Corp.
- Itoh, T., Uchida, K., Ishikawa, K., Kushima, K., Kushima, E., Tamada, H., Moritake, T., Nakao, H., Shii, H., 2005, Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: Differences between small-breed dogs and other, *Journal of veterinary medical science*, 67 (3), 345-347.

Jackson, J.R., Gilmartin, A., Imburgia, C., Winkler, J.D., Marshall, L.A., Roshak, A., 2000, An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (Chk1) abrogates cell-cycle arrest caused by DNA damage, *Cancer research*, 60 (3), 566-72.

Jain, V., 2006, *Studies on management of canine mammary neoplasms by adjuvant chemotherapy using combination of Doxorubicin and Cyclophosphamide*, Tez (Yüksek lisans), Guru Angad Dev Veterinary and Animal Sciences University.

Jia, Z.M., Liu, Y., Cui, S.Y., 2014, Lack of association between cyclin-dependent kinase inhibitor 1B rs2066827 polymorphism and breast cancer susceptibility, *Tumor biology*, 35 (6), 5527-5531.

Joshi, P.A., Jackson, H.W., Beristain, A.G., Di Grappa, M.A., Mote, P.A., Clarke, C.L., Sringl, J., Waterhouse, P.D., Khokha, R., 2010, Progesterone induces adult mammary stem cell expansion, *Nature*, 465 (7299), 803-807.

Kanwal, R., Gupta, S., 2012, Epigenetic modifications in cancer, *Clinical genetics*, 81, 303-311

Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P., 1990, Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B, *The EMBO journal*, 9 (5), 1603-1614.

Kawamata, N., Morosetti, R., Miller, C.W., Park, D., Spirin, K.S., Nakamaki, T., Takeuchi, S., Hatta, Y., Simpson, J., Wilczynski, S., Lee, Y.Y., Bartram, C.R., Koeffler, H.P., 1995, Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies, *Cancer research*, 55(11), 2266-2269.

Kawauchi, T., 2014, Cdk5 regulates multiple cellular events in neural development, function and disease, *Development, growth & differentiation*, 56 (5), 335-348.

Kim, H.W., Ju, J.H., Shin, J.I., Seung, B.J., Sur, J.H., 2017, Differential and correlated expressions of p16/p21/p27/p38 in mammary gland tumors of aged dogs, *Journal of veterinary science*, 18 (4), 479-485.

Kim, J., Jonasch, E., Alexander, A., Short, J.D., Cai, S., Wen, S., Tsavachidou, D., Tamboli, P., Czerniak, B.A., Do, K.A., Wu, K.J., Marlow, L.A., Wood, C.G., Copland, J.A., Walker, C.L., 2009, Cytoplasmic sequestration of p27 via AKT phosphorylation in renal cell carcinoma, *Clinical cancer research*, 15 (1), 81-90.

Kiyokawa, H., Kineman, R. D., Manova-Todorova, K.O., Soares, V.C., Hoffman, E.S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A.C., Frohman, L.A., Koff, A., 1996, Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27Kip1, *Cell*, 85 (5), 721-732.

Klopfleisch, R., Schütze, M., Gruber, A.D., 2010, Loss of p27 expression in canine mammary tumors and their metastases, *Research in veterinary science*, 88 (2), 300-303.

Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladino, M.A., Killian, D.J., 2018a, *Genes, chromosomes, and heredity*, Concept of genetics, Bölüm 1 (2), Pearson, New Jersey, ISBN: 9780134604718, 14-35.

Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladino, M.A., Killian, D.J., 2018b, *Genetic analysis of organisms and population*, Concept of genetics, Bölüm 5 (24), Pearson, New Jersey, ISBN: 9780134604718, 579-599.

Köktürk, N., Kırıçoğlu, C.E., Öztürk, C., 2003, Akciğer kanseri moleküler biyolojisi, *Solunum*, 5 (3), 127-138.

Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C., 2015, *General pathology*, Robins and Cotran pathologic basis of disease, 9. Baskı, Bölüm 1, Elsevier, Philadelphia, ISBN: 978-1-4557-2613-4, 15-16.

Lamote, I., Meyer, E., Massart-Leen, A.M., Burvenich, C., 2004, Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution, *Science direct*, 69, 145-159.

Lana, S.E., Rutteman, G.R., Withrow, S.J., 2006, *Tumors Of The Mamary Gland*, Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, In: Withrow, S.J., Vail, D.M. (ed.), 4.Baskı, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 619-636.

Landa, I., Montero-Conde, C., Malanga, D., De Gisi, S., Pita, G., Leandro-Garcia, L.J., Inglada-Perez, L., Leton, R., De Marco, C., Rodriguez-Antona, C., Viglietto, G., Robledo, M., 2010, Allelic variant at- 79 (C> T) in CDKN1B (p27Kip1) confers an increased risk of thyroid cancer and alters mRNA levels, *Endocrine-related cancer*, 17 (2), 317-328.

Langenbach, A., McManus, P.M., Hendrick, M.J., Shofer, F.S., Sorenmo, K.U., 2001, Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors, *Journal of the American veterinary medical association*, 218 (9), 1424-1428.

Larrea, M.D., Wander, S.A., Slingerland, J., 2009, p27 as Jekyll and Hyde: regulation of cell cycle and cell motility, *Cell cycle*, 8 (21), 3455-3461.

Lee, K.H., Hwang, H.J., Noh, H.J., Shin, T.J., Cho, J.Y., 2019, Somatic mutation of PIK3CA (H1047R) is a common driver mutation hotspot in canine mammary tumors as well as human breast cancers, *Cancers*, 11 (12), 2006.

Leivonen, M., Nordling, S., Lundin, J., von Boguslawski, K., Haglund, C., 2001, p27 expression correlates with short-term, but not with long-term prognosis in breast cancer, *Breast cancer research and treatment*, 67 (1), 15-22.

Li, J., Zhao, L., He, X., Yang, T., Yang, K., 2014, MiR-21 inhibits c-Ski signaling to promote the proliferation of rat vascular smooth muscle cells, *Cellular signalling*, 26 (4), 724-729.

Li, Y., Wang, H., Tao, K., Xiao, Q., Huang, Z., Zhong, L., Cao, W., Wen, J., Feng, W., 2013, miR-29b suppresses CML cell proliferation and induces apoptosis via regulation of BCR/ABL1 protein, *Experimental cell research*, 319 (8), 1094-1101.

Lindblad-Toh, K., Wade, C.M., Mikkelsen, T.S., Karlsson, E.K., Jaffe, D.B., Kamal, M., Clamp, M., Chang, J.L., Kulbokas, E.J., Zody, M.C., Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, R.K., Ostrander, E.A., Ponting, C.P., Galibert, F., Smith, D.R., deJong, P.J., Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, C.W., Cook, A., Cuff, J., Daly, M.J., DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, K.P., Parker, H.G., Pollinger, J.P., Searle, S.M.J., Sutter, N.B., Thomas, R., Webber, C., Broad Sequencing Platform members, Lander, E.S., 2005, Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog, *Nature*, 438, 803-819.

Loar, A.S., 1996, *Diseases of the Mammary Glands*, Handbook of Small Animal Practice, In: Morgan, R.V. (ed.), 2.Baskı, New York Churchill Livingstone, 675- 685.

- Longuini, V.C., Lourenço, D.M., Sekiya, T., Meirelles, O., Goncalves, T.D., Coutinho, F. L., Francisco, G., Osaki, L.H., Chammas, R., Alves, V.A.F., Siqueira, S.A.C., Schlesinger, D., Naslavsky, M.S., Zatz, M., Duarte, Y.A.O., Lebrão, M.L., Gama, P., Lee, M., Molatore, S., Pereira, M.A.A., Jallad, R.S., Bronstein, M.D., Cunha-Neto, M.B., Liberman, B., Fragoso, M.C.B.V., Toledo, S.P.A., Pellegata, N.S., Toledo, R.A., 2014, Association between the p27 rs2066827 variant and tumor multiplicity in patients harboring MEN1 germline mutations, *European journal of endocrinology*, 171 (3), 335-342.
- Lu, Y., Gao, K., Zhang, M., Zhou, A., Zhou, X., Guan, Z., Shi, X., Ge, S., 2015, Genetic association between CDKN1B rs2066827 polymorphism and susceptibility to cancer, *Medicine*, 94 (46), 1-7.
- Łukasik, P., Baranowska-Bosiacka, I., Kulczycka, K., Gutowska, I., 2021a, Inhibitors of cyclin-dependent kinases: Types and their mechanism of action, *International journal of molecular sciences*, 22 (6), 2806.
- Łukasik, P., Załuski, M., Gutowska, I., 2021b, Cyclin-dependent kinases (CDK) and their role in diseases development—Review, *International journal of molecular sciences*, 22 (6), 2935.
- Lutful Kabir, F.M., Alvarez, C.E., Bird, R.C., 2015, Canine mammary carcinomas: a comparative analysis of altered gene expression, *Veterinary sciences*, 3 (1), 1.
- Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Funk, C.R., Mani, S.K., Hughes, A.R., Montgomery, C.A., Shyamala, G., Conneely, O.M., O'Malley, B.W., 1995, Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities, *Genes & development*, 9 (18), 2266-2278.
- Lydon, J.P., Ge, G., Kittrell, F.S., Medina, D., O'Malley, B.W., 1999, Murine mammary gland carcinogenesis is critically dependent on progesterone receptor function, *Cancer research*, 59 (17), 4276-4284.
- Ma, H., Jin, G., Hu, Z., Zhai, X., Chen, W., Wang, S., Wang, X., Qin, J., Gao, J., Liu, J., Wang, X., Wei, Q., Shen, H., 2006, Variant genotypes of CDKN1A and CDKN1B are associated with an increased risk of breast cancer in Chinese women, *International journal of cancer*, 119 (9), 2173-2178.
- Macri, E., Loda, M., 1998, Role of p27 in prostate carcinogenesis, *Cancer and metastasis reviews*, 17 (4), 337-344.
- Mal, A., Poon, R.Y., Howe, P.H., Toyoshima, H., Hunter, T., Harter, M.L., 1996, Inactivation of p27Kip1 by the viral E1A oncoprotein in TGFβ-treated cells, *Nature*, 380 (6571), 262-265.
- Marchesi, M.C., Manuali, E., Pacifico, E., Ferri, C., Romagnoli, M., Mangili, V., Fruganti, G., 2010, Cancer antigen 15/3: possible diagnostic use in veterinary clinical oncology. Preliminary study, *Veterinary research communications*, 34 (1), 103-106.
- Martin, P.M., Cotard, M., Mialot, J.P., André, F., Raynaud, J.P., 1984, Animal models for hormone-dependent human breast cancer, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 12 (1), 13-17.
- Matthews, H.K., Bertoli, C., de Bruin, R.A., 2022, Cell cycle control in cancer, *Nature reviews molecular cell biology*, 23 (1), 74-88.
- McKay, L.K., White, J.P., 2021, The AMPK/p27Kip1 pathway as a novel target to promote autophagy and resilience in aged cells, *Cells*, 10 (6), 1430.

- Meijers-Heijboer, H., Van den Ouweland, A., Klijn, J., Wasielewski, M., de Snoo, A., Oldenburg, R., ... & Sodha, N., 2002, Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2* 1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations, *Nature genetics*, 31 (1), 55-59.
- Meijers-Heijboer, H., Wasielewski, M., Wagner, A., Hollestelle, A., Elstrodt, F., van den Bos, R., ... & Schutte, M., 2003, The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype, *The American journal of human genetics*, 72 (5), 1308-1314.
- Melin, M., Rivera, P., Arendt, M., Elvers, I., Murén, E., Gustafson, U., Starkey, M., Borge, K.S., Lingaas, F., Haggström, J., Saellström, S., Rönnerberg, H., Lindblad-Toh, K., 2016, Genome-wide analysis identifies germ-line risk factors associated with canine mammary tumours, *PLoS genetics*, 12 (5), e1006029.
- Mester, J.L., Moore, R.A., Eng, C., 2013, PTEN germline mutations in patients initially tested for other hereditary cancer syndromes: would use of risk assessment tools reduce genetic testing?, *The oncologist*, 18 (10), 1083–1090.
- Miele, L., 2004, *Analysis of cyclins and cyclin-dependent kinases*, Cell cycle control and dysregulation protocols, In: Giordano, A. (ed.), Romano, G. (ed.), Bölüm 1, Humana press, New Jersey, E-ISBN: 1-59259-822-6, 3-23.
- Milella, M., Falcone, I., Conciatori, F., Incani, U.C., Curatolo, A.D., Inzerilli, N., Nuzzo, C.M.A., Vaccaro, V., Vari, S., Cognetti, F., Ciuffreda, L., 2015, PTEN: multiple functions in human malignant tumors, *Frontiers in oncology*, 5 (24), 1-14.
- Millanta, F., Calandrella, M., Bari, G., Niccolini, M., Vannozzi, I., Poli, A., 2005, Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues, *Research in veterinary science*, 79 (3), 225-232.
- Misdorp, W., 2002, *Tumors of the Mammary Gland*, Tumors in Domestic Animals, In: Meuten, D.J. (ed.), 4. Baskı, Iowa: Iowa State Press, 575-606.
- Mol, J.A., Van Garderen, E., Rutteman, G.R., Rijnberk, A., 1996, New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary gland of dogs, cats and humans, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 57 (1-2), 67-71.
- Mote, P.A., Bartow, S., Tran, N., Clarke, C.L., 2002, Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis, *Breast cancer research and treatment*, 72 (2), 163-172.
- Moulton, J.E., Taylor, D.O.N., Dorn, C.R., Andersen, A.C., 1970, Canine mammary tumors, *Pathologia veterinaria*, 7 (4), 289-320.
- Mulac-Jericevic, B., Lydon, J.P., DeMayo, F.J., Conneely, O.M., 2003, Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform, *Proceedings of the national academy of sciences*, 100 (17), 9744-9749.
- Mulac-Jericevic, B., Mullinax, R.A., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., Conneely, O.M., 2000, Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform, *Science*, 289 (5485), 1751-1754.

- Nakayama, K.I., Nakayama, K., 2006, Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer, *Nature reviews cancer*, 6 (5), 369-381.
- Namagerdi, A., d'Angelo, D., Ciani, F., Iannuzzi, C. A., Napolitano, F., Avallone, L., Laurentiis, M., Giordano, A., 2020, Triple-Negative Breast Cancer Comparison With Canine Mammary Tumors From Light Microscopy to Molecular Pathology, *Frontiers in oncology*, 10, 563779.
- Nayyar, A., 2002, *Evaluation of Vinblastine and Mitomycin in conjugation with surgery in canine mammary neoplasms*, Tez (Yüksek lisans), Punjab Agricultural University.
- Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., Sánchez, M.A., Flores, J.M., Castanõ, M., 2000, Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance, *Veterinary pathology*, 37 (3), 239-247.
- Nojadeh, J.F., Sharif, S.B., Sakhinia, E., 2018, Microsatellite instability in colorectal cancer, *Experimental and clinical sciences journal*, 17, 159-168.
- Novosad, C.A., 2003, Principles of treatment for mammary gland tumors, *Topics in companion animal medicine*, 18 (2), 107-109.
- Onay, V.Ü., Briollais, L., Knight, J.A., Shi, E., Wang, Y., Wells, S., Li, H., Rajendram, I., Andrulis, I.L., Ozcelik, H., 2006, SNP-SNP interactions in breast cancer susceptibility, *BMC cancer*, 6 (1), 1-16.
- Owen, L.N., 1991, Identifying and treating cancer in geriatric dogs, *Veterinary medicine*, 86, 55-66.
- Öztabak, K.Ö., 2017, Hayvanlarda genom bilgisi, İstanbul Üniversitesi yayınları: 5242 - Veteriner Fakültesi yayınları: 32, İstanbul, ISBN: 978-605-07-0639-0.
- Palta, M.K., 2000, *Clinical studies on multimodality in the management of canine mammary neoplasm*, Tez (Yüksek lisans), Punjab Agricultural University.
- Pardee, A.B., 1989, G1 events and regulation of cell proliferation, *Science*, 246 (4930), 603-8.
- Park, J.S., Withers, S.S., Modiano, J.F., Kent, M.S., Chen, M., Luna, J.I., Culp, W.T.N., Sparger, E.E., Rebhun, R.B., Monjazebe, A.M., Murphy, W.J., Canter, R.J., 2016, Canine cancer immunotherapy studies: linking mouse and human, *Journal for immunotherapy of cancer*, 4 (1), 1-11.
- Pazarbaşı, A., Kasap, M., 2003, Kanser genetiği, *Dergipark*, 12 (4), 328-340.
- Pelengaris, S., Kahn, M., 2006a, *DNA Replication and the Cell Cycle*, The molecular biology of cancer, In: Pelengaris, S. ve Khan, M. (ed.), Bölüm 4, Blackwell, United Kingdom, 88-119.
- Pelengaris, S., Kahn, M., 2006b, *Oncogenes*, The molecular biology of cancer, In: Pelengaris, S. ve Khan, M. (ed.), Bölüm 6, Blackwell, United Kingdom, 158-219.
- Pellegata, N.S., Quintanilla-Martinez, L., Siggelkow, H., Samson, E., Bink, K., Höfler, H., Fend, F., Graw, J., Atkinson, M.J., 2006, Germ-line mutations in p27 Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans, *Proceedings of the ational academy of sciences*, 103 (42), 15558-15563.

Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, h., Akslen, L.A., Fluge, O., Peramenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D., 2000, Molecular portraits of human breast tumours, *Nature*, 406 (6797), 747-752.

Petersen, O.W., Høyer, P.E., Van Deurs, B., 1987, Frequency and distribution of estrogen receptor-positive cells in normal, nonlactating human breast tissue, *Cancer research*, 47 (21), 5748-5751.

Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M., Koff, A., 1994, p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest, *Genes & development*, 8 (1), 9-22.

Polyak, K., 2006, The p27Kip1 tumor suppressor gene: still a suspect or proven guilty?, *Cancer cell*, 10 (5), 352-354.

Porter, P.L., Malone, K.E., Heagerty, P.J., Alexander, G.M., Gatti, L.A., Firpo, E.J., Daling, J.R., Roberts, J.M., 1997, Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients, *Nature medicine*, 3 (2), 222-225.

.

Queiroga, F.L., Perez-Alenza, M.D., Silvan, G., Pena, L., Lopes, C., Illera, J.C., 2005, Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 94 (1-3), 181-187.

Queiroga, F.L., Pérez-Alenza, M.D., Silvan, G., Pena, L., Lopes, C.S., Illera, J.C., 2008, Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17 β -estradiol) in canine mammary tumours, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 110 (1-2), 76-82.

Raposo, T.P., Arias-Pulido, H., Chaher, N., Fiering, S.N., Argyle, D.J., Prada, J., Pires, I., Queiroga, F.L., 2017, Comparative aspects of canine and human inflammatory breast cancer, *In Seminars in Oncology*, 44 (4), 288-300.

Rhei, E., Kang, L., Bogomolny, F., Federici, M.G., Borgen, P.I., Boyd, J., 1997, Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas, *Cancer research*, 57, 3657-3659.

Rivera, P., Melin, M., Biagi, T., Fall, T., Häggström, J., Lindblad-Toh, K., Von Euler, H., 2009, Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2, *Cancer research*, 69 (22), 8770-8774.

Rousseau, J., Têtu, B., Caron, D., Malenfant, P., Cattaruzzi, P., Audette, M., ... & Guérette, B., 2002, RCAS1 is associated with ductal breast cancer progression, *Biochemical and biophysical research communications*, 293 (5), 1544-1549.

Rowell, J.L., McCarthy, D.O., Alvarez, C.E., 2011, Dog models of naturally occurring cancer, *Trends in molecular medicine*, 17 (7), 380-388.

Rutteman, G.R., 1990, Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update, *In Vivo (Athens, Greece)*, 4 (1), 33-40.

- Saba, C.F., Rogers, K.S., Newman, S.J., Mauldin, G.E., Vail, D.M., 2007, Mammary gland tumors in male dogs, *Journal of veterinary internal medicine*, 21 (5), 1056-1059.
- Salas, Y., Márquez, A., Diaz, D., Romero, L., 2015, Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: a growing animal health problem, *PloS one*, 10 (5), e0127381.
- Sandhu, N.S., 1995, *Studies on the surgical and chemotherapy management of canine mammary neoplasms*, Tez (Yüksek lisans), Punjab Agricultural University, Ludhiana, India.
- Schaefer-Okkens, A.C., Ettinger, S.N., Feldman, E.C., 2005, *Estrous cycle and breeding management of the healthy bitch*, Textbook of Veterinary Internal Medicine, Vol II., In: Fathman, L. (ed.), Elsevier Saunders, St-Louis, 1640–1649.
- Schneider, R., Dorn, C.R., Taylor, D.O.N., 1969, Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival, *Journal of the national cancer institute*, 43 (6), 1249-1261.
- Schöndorf, T., Eisele, L., Göhring, U. J., Valter, M. M., Warm, M., Mallmann, P., Becker, M., Fechteler, R., Weisshaar, M.P., Hoopmann, M., 2004, The V109G polymorphism of the p27 gene CDKN1B indicates a worse outcome in node-negative breast cancer patients, *Tumor biology*, 25 (5-6), 306-312.
- Sears, R.C., Nevins, J.R., 2002, Signaling networks that link cell proliferation and cell fate, *Journal of biological chemistry*, 277 (14), 11617- 11620.
- Seo, J.Y., Park, Y.J., Yi, Y.A., Hwang, J.Y., Lee, I.B., Cho, B.H., Son, H.H., Seo, D.G., 2015, Epigenetics: general characteristics and implications for oral health, *Restorative dentistry & endodontics*, 40 (1), 14-22.
- Sha, M., Ye, J., Luan, Z.Y., Guo, T., Wang, B., Huang, J.X., 2015, Celastrol induces cell cycle arrest by MicroRNA-21-mTOR-mediated inhibition p27 protein degradation in gastric cancer, *Cancer cell international*, 15 (1), 1-9.
- Sharma, S.S., Pledger, W.J., 2016, The non-canonical functions of p27Kip1 in normal and tumor biology, *Cell cycle*, 15 (9), 1189-1201.
- Sheaff, R.J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J. M., Clurman, B.E., 1997, Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1, *Genes & development*, 11 (11), 1464-1478.
- Sherr, C.J. ve Roberts, J.M., 1995, Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases, *Genes & development*, 9 (10), 1149-1163.
- Sherr, C.J., Sicinski, P., 2018, *The d-type cyclins: a historical perspective*, D-type cyclins and cancer, In: Hinds, P.W. (ed), Brown, N.E. (ed), Bölüm 1, Springer, Switzerland, ISBN 978-3-319-64449-3, 1-27.
- Sharda, S., 2007, 'Cytopathology of canine mammary gland affections with special reference to mammary gland tumors', Tez (Yüksek lisans), Guru Angad Dev Veterinary and Animal Sciences University.
- Siddhartha, M., 2012, *Tüm hastalıkların şahı*, Domingo, İstanbul.
- Sigerist, H.E., 1932, The historical development of the pathology and therapy of cancer, *Bulletin of the New York academy of medicine*, 8 (11), 642-653.

- Silva, A.E.D., Serakides, R., Cassali, G.D., 2004, Hormonal carcinogenesis and hormone dependents neoplasm, *Ciência rural*, 34, 625-633.
- Simoes, B.M., Alferez, D.G., Howell, S.J., Clarke, R.B., 2015, The role of steroid hormones in breast cancer stem cells, *Endocrine-related cancer*, 22 (6), T177-T186.
- Simon, D., Schoenrock, D., Baumgartner, W., Nolte, I., 2006, Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dog with doxorubicin and docetaxel, *Journal of veterinary internal medicine*, 20, 1184-1190.
- Sion-Vardy, N., Freedman, J., Lazarov, I., Bolotin, A., Ariad, S., 2010, p27kip1 Expression in non-small cell lung cancer is not an independent prognostic factor, *Anticancer research*, 30 (9), 3699-3704.
- Sleeckx, N., De Rooster, H., EJ, V. K., Van Ginneken, C., Van Brantegem, L., 2011, Canine mammary tumours, an overview, *Reproduction in domestic animals= Zuchthygiene*, 46 (6), 1112-1131.
- Slingerland, J. ve Pagano, M., 2000, Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer, *Journal of cellular physiology*, 183 (1), 10-17.
- Sontas, B.H., Ozyogurtcu, H., Gurel, A., Ekici, H., 2009, Evaluation of clinical and pathological characteristics of 155 canines with mammary tumours: a retrospective study, *Archivos de medicina*, 41, 53-59.
- Sorenmo, K., 2003, Canine mammary gland tumors, *The veterinary clinics small animal practice*, 33, 573-596.
- Sorenmo, K.U., Shofer, F.S., Goldschmidt, M.H., 2000, Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma, *Journal of veterinary internal medicine*, 14 (3), 266-270.
- Speirs, V., Skliris, G.P., Burdall, S.E., Carder, P.J., 2002, Distinct expression patterns of ER α and ER β in normal human mammary gland, *Journal of clinical pathology*, 55 (5), 371-374.
- Spirin, K.S., Simpson, J.F., Takeuchi, S., Kawamata, N., Miller, C.W., Koeffler, H.P., 1996, p27 kip1 mutation found in breast cancer, *Cancer research*, 56, 2400-2404.
- Spurdle, A.B., Deans, A.J., Duffy, D., Goldgar, D.E., Chen, X., Beesley, J., Easton, D.F., Antoniou, A.C., Peock, S., Cook, M., Nathanson, K.L., Domcheck, S.M., MacArthur, G.A., Chenevix-Trench, G., 2009, No evidence that CDKN1B (p27) polymorphisms modify breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers, *Breast cancer research and treatment*, 115 (2), 307-313.
- Steri, M., Idda, M. L., Whalen, M. B., Orrù, V., 2018, Genetic variants in mRNA untranslated regions, *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 9 (4), e1474.
- Sternlicht, M.D., Kedeshian, P., Shao, Z.M., Safarians, S., Barsky, S.H., 1997, The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor, *Clinical cancer research*, 3 (11), 1949-1958.
- Stone, E.A., 1994, *Mammary gland neoplasia*, Saunders Manual of Small Animal Practice, In : Birchard, S.J., Sherding, R.G. (ed.), W B Saunders Co., Philadelphia, 207-10.
- Stratmann, N., Failing, K., Richter, A., Wehrend, A., 2008, Mammary tumor recurs in bitches after regional mastectomy, *Veterinary surgery*, 37, 82-86.

- Szabo, C.I., Wagner, L.A., Francisco, L.V., Roach, J.C., Argonza, R., King, M.C., Ostrander, E.A., 1996, Human, canine and murine BRCA1 genes: sequence comparison among species, *Human molecular genetics*, 5 (9), 1289-1298.
- Tamura, K., Glen, S., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013, MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0., *Molecular biology and evolution*, 30 (12), 2725-2729.
- Tan, P., Cady, B., Wanner, M., Worland, P., Cukor, B., Magi-Galluzzi, C., Lavin, P., Draetta, G., Pagano, M., Loda, M., 1997, The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a, b) invasive breast carcinomas, *Cancer research*, 57 (7), 1259-1263.
- Thejaswini, G., Kumar, K.A., Prasad, P.E., 2022, A study on Ki67 expression in canine mammary tumors, *The pharma innovation journal*, 11 (6), 801-803.
- Thomas, D.B., 1984, Do hormones cause breast cancer?, *Cancer*, 53 (S3), 595-604.
- Valdivia, G., Alonso-Diez, Á., Pérez-Alenza, D., Peña, L., 2021, From conventional to precision therapy in canine mammary cancer: a comprehensive review, *Frontiers in veterinary science*, 8, 623800.
- Varma, C.G., Teja, A., Lavanya, K., 2021, Assessment of risk factors for incidence of canine mammary tumors, *The pharma innovation journal*, 10 (5), 554-556.
- Vecchione, A., Galetti, T.P., Gardiman, M., Ishii, H., Giarnieri, E., Pagano, F., Gomela, L.G., Croce, C.M., Baffa, R., 2004, Collecting duct carcinoma of the kidney: an immunohistochemical study of 11 cases, *BMC urology*, 4 (1), 1-8.
- Veldhoen, N., Watterson, J., Brash, M., Milner, J., 1999, Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer, *British journal of cancer*, 81 (3), 409-415.
- Vermeulen, K., Bockstaele, D.R.V., Berneman, Z.W., 2003, The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell proliferation*, 36 (3), 113-175.
- Vervoorts, J., Lüscher, B., 2008, Post-translational regulation of the tumor suppressor p27KIP1, *Cellular and molecular life sciences*, 65 (20), 3255-3264.
- Visan, S., Balacescu, O., Berindan-Neagoe, I., Catoi, C., 2016, In vitro comparative models for canine and human breast cancers, *Clujul Medical*, 89 (1), 38.
- Vural, S.A., Aydın, Y., 2001, A survey of canine mammary tumours from 1973 to 1998 in Ankara, *Turkish journal of veterinary and animal sciences*, 25 (3), 233-239.
- Wang, W., Spitz, M.R., Yang, H., Lu, C., Stewart, D.J., Wu, X., 2007, Genetic variants in cell cycle control pathway confer susceptibility to lung cancer, *Clinical cancer research*, 13 (19), 5974-5981.
- Wei, F., Xu, J., Tang, L., Shao, J., Wang, Y., Chen, L., Guan, X., 2012, p27Kip1 V109G polymorphism and cancer risk: a systematic review and meta-analysis, *Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals*, 27 (10), 665-671.
- Welsh, P.L., King, M.C., 2001, BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer, *Human molecular genetics*, 10 (7), 705-713.

Wright, J.C., 1932, Cancer chemotherapy: Past, present, and future-part I, *Journal of the national medical association*, 76 (8), 773-784.

Wu, J., Shen, Z.Z., Lu, J.S., Jiang, M., Han, Q.X., Fontana, J.A., Barsky, S.H., Shao, Z.M., 1999, Prognostic role of p27Kip1 and apoptosis in human breast cancer, *British journal of cancer*, 79 (9), 1572-1578.

Xiang, H., Li, H., Ge, W., Wu, W., Gao, M., Wang, W., Hong, L., Jiang, D., Zhang, C., 2013, Association of CDKN1B gene polymorphisms with susceptibility to breast cancer: a meta-analysis, *Molecular biology reports*, 40 (11), 6371-6377.

Yager, J.D., Davidson, N.E., 2006, Estrogen carcinogenesis in breast cancer, *New England journal of medicine*, 354 (3), 270-282.

Yakobson, E., Shemesh, P., Azizi, E., Winkler, E., Lassam, N., Hogg, D., Brookes, S., Peters, G., Lotem, M., Zlotogorski, A., Landau, M., Safro, M., Shafir, R., Friedman, E., Peretz, H., 2000, Two p16 (CDKN2A) germline mutations in 30 Israeli melanoma families, *European journal of human genetics*, 8 (8), 590-596.

Yang, C., Zhang, P., Ji, Y., Song, M., Wang, S., Liu, Y., 2017, Analysis of canine p27 protein expression in canine mammary gland tumors, *Zhongguo yufang shouyi xuebao/Chinese journal of preventive veterinary medicine*, 39 (6), 481-484.

Yaziji, H., Gown, A.M., Sneige, N., 2000, Detection of stromal invasion in breast cancer: the myoepithelial markers, *Advances in anatomic pathology*, 7 (2), 100-109.

Yıldırım, F., 2004, Köpek meme tümörlerinin farklı boyama yöntemleri (may-grünwald-giemsa ve papanicolaou) ile sitolojik teşhisi ve histopatolojik teşhisle karşılaştırılması, Doktora, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Yokus, B., Ülker D.Ü., 2012, Kanser Biyokimyası, *Dicle üniversitesi veteriner fakültesi dergisi*, 1(2), 7-18.

Yoshida, K., Miki, Y., 2004, Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage, *Cancer science*, 95 (11), 866-871.

Yoshikawa, Y., Morimatsu, M., Ochiai, K., Nagano, M., Yamane, Y., Tomizawa, N., Sasaki, N., Hashizume, K., 2005, Analysis of genetic variations in the exon 27 region of the canine BRCA2 locus, *Journal of veterinary medical science*, 67 (10), 1013-1017.

Yu, J.C., Ding, S.L., Chang, C.H., Kuo, S.H., Chen, S.T., Hsu, G.C., Hou, M.F., Jung, L.Y., Cheng, W.C., Wu, P.E., Shen, C.Y., 2009, Genetic susceptibility to the development and progression of breast cancer associated with polymorphism of cell cycle and ubiquitin ligase genes, *Carcinogenesis*, 30 (9), 1562-1570.

Zatloukal J., Lorenzová J., Tichý F., Necas A., Kecova H., Kohout P., 2005, Breed and Age as Risk Factors for Canine Mammary Tumours, *Acta veterinaria brno*, 74, 103-9.

Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J. W., Jansen-Dürr, P., 1996, Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein, *Oncogene*, 13 (11), 2323-2330.

Zilani, M.N.H., Sarower, M.G., Hossain, A., Rahman, M.M., Uddin, S.J., Hossain, M.G., 2018, Polymorphisms in cell cycle regulator gene p27kip1 and p16ink4a and lung cancer risk in a bangladeshi population, *Pharmacologyonline*, 2, 149-160.

Zou, T. ve Lin, Z., 2021, The involvement of ubiquitination machinery in cell cycle regulation and cancer progression, *International journal of molecular sciences*, 22 (11), 5754.



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KÖPEK MEME KANSERİ ile p27 TÜMÖR SÜPRESÖR GENİ POLİMORFİZMLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ			
ORJİNALLIK RAPORU			
% 10	% 9	% 2	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
BİRİNCİL KAYNAKLAR			
1	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 2	
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1	
3	acikders.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1	
4	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1	
5	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<% 1	
6	libratez.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1	
7	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1	
8	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1	
	hdl.handle.net		

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

- ☒ Etik Kurul izni gerekmektedir.
- ☐ Etik Kurul izni gerekmemektedir.

Gizem ATMACA
(İmza)



İÜC Tarih ve Sayı: 20.03.2018-105419



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı



Sayı :35980450-050.01.04-
Konu :Prof.Dr. Kemal Özdem
ÖZTABAK'a ait Etik Kurul Onayı

Sayın Prof. Dr. Kemal Özdem ÖZTABAK

İlgi :23.02.2018 tarihli proje başvurunuz.

Sorumluluğuma üstlendiğiniz **Doktora Öğrencisi/ Arş. Gör. Gizem ATMACA**'ya ait **"Köpek Meme Kanseri İle p27 Tümör Süpresör Geni Polimorfizmleri Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi"** başlıklı projeniz Etik Kurulumuzun 02.03.2018 tarihli toplantısında görüşülmüş olup, 2018/08 Karar no'lu Etik Kurul Onayı ilişkide gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Fatma Alev KAYMAZ
Başkan

Doğrulamak için: <http://194.27.128.66/emvlon/Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BECNZJ9U9>

Ayrıntılı bilgi için ulaşın : Canan SONMİZTÜRK

Istanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı I.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlığı
nolu oda Avcılar/İSTANBUL
Tel : (212) 473 7070 Faks : (212) 440 03 77
e-posta : hadyek@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr



KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

- ☐ Kurum izni gerekmektedir.
- ☒ Kurum izni gerekmemektedir.

Gizem ATMACA
(İmza)

