

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TERRİER IRKI KÖPEĞİN NORMAL VE TÜMÖRLÜ MEME DOKUSUNDA
EKSPRESE OLAN GENLERİN EST (EXPRESSED SEQUENCE TAGS)
KÜTÜPHANESİNİN OLUŞTURULMASI VE KARŞILAŞTIRILMASI**

BURÇİN TELLİOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. NEHİR ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK**

İSTANBUL, 2012

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TERRİER IRKI KÖPEĞİN NORMAL VE TÜMÖRLÜ MEME DOKUSUNDA
EKSPRESE OLAN GENLERİN EST (EXPRESSED SEQUENCE TAGS)
KÜTÜPHANESİNİN OLUŞTURULMASI VE KARŞILAŞTIRILMASI**

Burçin TELLİOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 18/06/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Şener AKINCI

Marmara Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün **2010-01-07-KAP01** numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın her basamağında benden yardımlarını esirgemeyen, deneylerin yürütülmesi sırasında sabır ve hoşgörü ile bana destek olan çok değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. **Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK'e**,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda yardımcı olan, bilgisini paylaştan Sayın Yrd. Doç. Dr. **Şenay VURAL KORKUT'a**

Dokuların alınması sırasında ilgisini benden esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Bölümü Araştırma Görevlisi Sayın **Funda Yıldız'a** ,

Biyoinformatik analizlerde bana vaktini ayıran ve yardımcı olan Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın **Doç. Dr. Uğur SEZERMAN'a** ve Araştırma Görevlisi Sayın **Cem MEYDAN'a**,

Beni bu günlere getiren, bana inanan, mutluluk kaynaklarım olan canım annem **Şükran TELLİOĞLU** ve biricik babam **Mustafa TELLİOĞLU'na**,

En büyük destekçilerim canım anneannem **Beşire GEYİK** ve çok saygıdeğer dedem **Musa GEYİK'e**,

Her daim yanımda olan, bana moral veren ve beni yalnız bırakmayan canım arkadaşlarım, meleklerim **Feray YILDIZ'a**, **Burçak GÖKMEN'e** ve **Nermin GÖVCE'ye**,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardıma koşan **Zehra ÖMEROĞLU'na**, **Munise YURTSEVER'e**, **Beste TACAL'a**,

Tez süresince her daim yanımda olan ve nazımı çeken saygıdeğer arkadaşlarım **Çağdaş ŞEKER'e** ve **Evren YURDAKUL'a**,

Tez çalışmam boyunca benimle ilgilenen ve sorularını esirgemeyen sevgili öğrencilerime,

Buraya isimlerini yazmasam dahi bana destek olan, bana anlayışla yaklaşan ve güven veren tüm herkese,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2012

Burçin TELLİOĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1 Literatür Özeti.....	1
1.1 Kanser nedir?	1
1.2 Kanser Genetiği.....	2
1.3 Kanserde Onkogen Aktivasyonu	3
1.4 Köpeklerde Meme Bezi.....	4
1.5 Köpeklerde Meme Kanseri.....	4
1.6 CMTs için risk faktörleri.....	6
1.7 Model organizma olarak köpekler.....	9
1.8 İnsanda meme kanseri.....	10
1.9 Meme Kanserinin Moleküler Biyolojisi.....	12
1.10 cDNA kütüphaneleri.....	17
1.11 EST (Expressed sequence tags).....	18
1.12 GenBank ve NCBI.....	19
2 Tezin Amacı.....	19
3 Hipotez.....	20

BÖLÜM 2

MATERYAL VE METOD	21
2.1 Materyal	21
2.1.1 Hayvan Materyali	21
2.1.2 Kullanılan Kitler	21
2.2 Metod	21
2.2.1 RNA İzolasyonu	21
2.2.2 mRNA İzolasyonu	22
2.2.3 cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması	23
2.2.4 Kütüphanenin Karakterizasyonu	25
2.2.5 Kütüphanelerin dizin analizine gönderilmesi	26
2.3 Programlar	26
2.3.1 Phred ve Phrap	26
2.3.2 VecScreen	27
2.3.3 CAP3	27
2.3.4 BEAP	27
2.3.5 BLAST2GO	28
2.4 BLAST yöntemiyle fonksiyonların belirlenmesi	28

BÖLÜM 3

BULGULAR..	29
3.1 Normal Meme Dokusundan Elde Edilen cDNA Kütüphanelerinin Karakterizasyon Sonuçları	29
3.2 Tümörlü Meme Dokusundan Elde Edilen cDNA Kütüphanelerinin Karakterizasyon Sonuçları	30
3.3 Biyoinformatik Analizleri	32
3.3.1 EST' lerin Hazırlanması ve Contig Oluşturulması	32
3.3.2 Blast Analizleri	34
3.3.2.1 Normal Meme Dokusu EST ve Contiglerin BLAST Analizi Sonuçları	38
3.3.2.2 Tümörlü Meme Dokusu EST ve Contiglerin BLAST Analizi Sonuçları	50

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER	65
4.1 EST BLAST Analizleri	65
4.1.1 Tümörlü Meme Dokusu BLAST Analizleri	65
4.1.2 Normal Meme Dokusu BLAST Analizleri	72

KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	86

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
g	Gram
kb	Kilobaz
l	Litre
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
bp	Baz çifti
%	Yüzde oranı

KISALTMA LİSTESİ

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTN	Search nucleotide databases using a nucleotide query
BLASTX	Search protein databases using a translated nucleotide query
Bsp1407I	Restriksiyon enzimi
CAP3	EST birleştirme programı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
cDNA	Komplementer DNA
dNTP	Deoksiribonükleozit trifosfat
EDTA	Etilen Di Amin Tetra Asetik Asit
EST	Anlatımı yapılan dizi işaretleri (Expressed Sequences Tags)
GO	Gene Ontology
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Merkezi
pH	Ortam Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
mRNA	Mesajcı RNA
RNaz	Ribonükleaz
RPM	Devir/ dakika
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
CMTs	Köpek meme tümörleri
MMPs	Matrix metalloproteinazlar

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. 1	Sporadik ve kalıtsal kanserde iki vuruş hipotezi 2
Şekil 1. 2	Kadınlarda ve dişi köpeklerde yaşa bağlı meme tümörü risk oranı..... 12
Şekil 1. 3	<i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i> genlerinin kromozomlarda bulundukları bölgeler 13
Şekil 1. 4	<i>p53</i> geninin mutasyonu sonucu kanser gelişimi 15
Şekil 2. 1	cDNA kütüphanesinin oluşturulma aşamaları..... 24
Şekil 3. 1	Normal meme dokusu plazmid DNA'ların jelde görünümü 30
Şekil 3. 2	Tümörlü meme dokusu plazmid DNA'ların jelde görünümü 31
Şekil 3. 3	BEAP programında CAP3 ile hazırlanan normal meme dokusuna ait contig 7'nin grafiği ve contigi meydana getiren EST'lerin örtüşme şekli 33
Şekil 3. 4	CAP3 programı ile edilen normal meme dokusuna ait 9. contigin NCBI web sitesinde yapılan BLASTN analizi 36
Şekil 3. 5	BLAST2GO programı ile yapılan dizi benzerlik sorgulaması 37
Şekil 3. 6	Normal meme dokusuna ait EST'lerin GenBank'taki organizmalara benzerlik oranı..... 43
Şekil 3. 7	Normal meme dokusuna ait contiglerin BLASTN sonuçlarına göre GenBank'ta bulunan organizmalarla olan benzerliği 47
Şekil 3. 8	Normal meme dokusuna ait contiglerin BLASTX sonuçlarına göre GenBank'ta bulunan organizmalarla olan benzerliği 50
Şekil 3. 9	Tümörlü meme dokusuna ait EST'lerin Genbank'taki organizmalara benzerlik oranı..... 57
Şekil 3. 10	Tümörlü meme dokusuna ait contiglerin BLASTN sonuçlarına göre GenBank'ta bulunan organizmalarla olan benzerliği 60
Şekil 3. 11	Tümörlü meme dokusuna ait contiglerin BLASTX sonuçlarına göre GenBank'ta bulunan organizmalarla olan benzerliği 63
Şekil 3. 12	Normal ve tümörlü meme dokularında en fazla homolojiyi gösteren ilk 4 organizmanın yüzde değerleri ve karşılaştırılması..... 64

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3. 1	Normal ve tümörlü meme dokularına ait EST'lerin uzunluk değerleri..... 32
Çizelge 3. 2	CAP3 programı ile elde edilen değerler..... 33
Çizelge 3. 3	Phrap programı ile elde edilen contiglerin sayıları..... 34
Çizelge 3. 4	Genlerin BLASTN analizlerine göre %80 ve üzerinde homoloji gösteren EST'lerdeki bulunma sayısı ve oranı 38
Çizelge 3. 5	Normal meme dokusuna ait contiglerin BLASTN analizi sonuçları 44
Çizelge 3. 6	Normal meme dokusuna ait, CAP3 programı ile oluşturulan contiglerin bp uzunlukları ve oluşturduğu EST sayısı 46
Çizelge 3. 7	Normal meme dokusuna ait contiglerin BLASTX analizi sonuçları 48
Çizelge 3. 8	Genlerin BLASTN analizlerine göre %80 ve üzerinde homoloji gösteren EST'lerdeki bulunma sayısı ve oranı 51
Çizelge 3. 9	Tümörlü meme dokusuna ait ,CAP3 programı ile oluşturulan contiglerin bp uzunlukları ve oluşturdukları EST sayıları 56
Çizelge 3. 10	Tümörlü meme dokusuna ait contiglerin BLASTN analizi sonuçları 58
Çizelge 3. 11	Tümörlü meme dokusuna ait contiglerin BLASTX analizi 61
Çizelge 4.1	Homolojisi bulunan genler, oranları, EST sayıları-1.....67
Çizelge 4.2	Homolojisi bulunan genler, oranları, EST sayıları-2.....69
Çizelge 4.3	Homolojisi bulunan genler, oranları, EST sayıları-3.....70
Çizelge 4.4	Homolojisi bulunan genler, oranları, EST sayıları-4.....70
Çizelge 4.5	Normal dokuda homolojisi bulunan genler, oranları, EST sayıları.....74

**TERRIER IRKI KÖPEĞİN NORMAL VE TÜMÖRLÜ MEME DOKUSUNDA
EKSPRES OLAN GENLERİN EST (EXPRESSED SEQUENCE TAGS)
KÜTÜPHANESİNİN OLUŞTURULMASI VE KARŞILAŞTIRILMASI**

Burçin TELLİOĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Meme bezi tümörleri köpeklerde çok sık rastlanan tümörlerdir. Dişi köpeklerde gözlenen tüm neoplastik olguların hemen hemen %50'sini meme tümörleri oluşturmaktadır. Köpeklerde meme tümörü oluşumundan sorumlu genler ve oluşum mekanizması ile ilgili veriler oldukça kısıtlıdır. Meme kanseri oluşumunda insan ve köpeklerdeki patogenetik mekanizmaların karşılaştırılması ve köpek meme tümörlerinin insan meme kanseri için uygun bir biyomodel olup olamayacağı hipotezi de son yıllarda birçok komparatif çalışmanın konusu olmuştur.

Bu çalışmada meme dokusu örnekleri, biyopsi yöntemi ile sağlıklı Terrier köpeğin normal meme dokusundan ve neoplastik dokusu olan aynı ırktan başka bir köpekten alınmıştır. Dokulardan RNA ve mRNA izolasyonu yapılarak iki ayrı cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Kurulan cDNA kütüphanelerinden tesadüfi seçilen 2304 klon örneklerinin dizin analizleri yapılarak köpek meme dokusu için EST koleksiyonu oluşturulmuştur. Phrap/Phred, BEAP ve CAP3 programları ile biyoinformatik analizleri yapılarak BLAST yöntemi ile daha önce köpek ve insanlar için yayınlanmış genler birbiri ile karşılaştırılmış, meme patogenezi üzerine etkisi olan genler tanımlanmıştır. Bu çalışmadaki sonuçların, köpeklerin fonksiyonel genom araştırmalarında önemli bir kaynak teşkil edeceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Terrier ırkı köpek, Meme Kanseri, EST, cDNA kütüphanesi

ABSTRACT

CONSTRUCTION AND COMPARISON OF EST (EXPRESSED SEQUENCE TAGS) LIBRARY FOR EXPRESSED GENES IN NORMAL AND TUMORAL MAMMARY GLAND TISSUE OF THE TERRIER DOG

Burçin TELLİOĞLU

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Mammary gland tumor is the main tumor in the dog that frequently concurred. Approximately %50 of the neoplastic cases in female dogs are the mammary gland tumors. Data on genes that are involved in tumorigenesis and mechanism of tumor development are insufficient. Comparative studies have been conducted in order to see if tumorigenesis studies in dog could be a model for human mammary gland tumors.

In this study, mammary tissue samples were collected from both normal mammary tissue of a healthy Terrier dog and neoplastic mammary tissue of a sick dog. From the tissues, total RNA and mRNA were isolated for construction of two different cDNA libraries. Total 2304 colonies which are randomly selected from the two libraries were sequenced for developing a dog mammary gland ESTs collection. Phred/Phrap, BEAP and CAP3 programmes were used for bioinformatic analysis. Putative functions of all unique sequences were designed by gene homology based on BLAST. Genes of the human and dog are compared and investigated the effect of these genes on mammary pathogenesis with BLAST method. The results of this study are very valuable resource for functional genome studies of the dogs.

Key words: Terrier Dog, Breast Cancer, EST, cDNA library

1. Literatür Özeti

1.1 Kanser Nedir?

Kanser, DNA’da meydana gelen bir hasar sonucunda hücrelerin kontrolsüz ve anormal bir şekilde çoğalmasıdır. Vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde üreyerek (malign), komşu dokuları işgal etmesi (invazyon) ile oluşmaktadır. Kaynağını aldığı organdan daha uzak bir bölgeye lenf yolu ya da kan yolu ile yayılmasına metastaz denir [1]. Kanserde iyi huylu tümörlere benign adı verilir, komşu bölgelere yayılmazlar ve sınırları bellidir; kötü huylu tümörler ise malign olup, organlara ve dokulara yayılırlar .

Kanser kemik, kas gibi mezenkimal dokulardan kaynaklanıyor ise sarkoma; bağırsak mukozası, bronşlar ya da meme duktusları gibi epitelyal dokudan kaynaklanıyorsa karsinoma ismini alır. Kemik iliği, lenfatik sistem ve periferik kan boyunca yayılan lösemi ve lenfoma, hemapoetik ve lenfoid malignansilerdir.

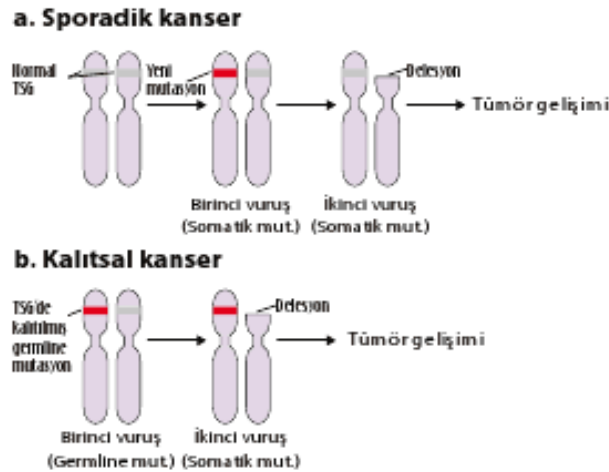
Kanserin genetik ile bağlantılı olabileceği 20. yüzyılın başlarında düşünülmüştür. Buna bağlı olarak mutasyonların gen ifadesini değiştirmesi tüm kanserlerin ortak özelliği olarak bilinmektedir. Kanser hücrelerindeki mutasyonların çoğu somatik hücrelerde olduğundan, burada meydana gelen değişimler gelecek nesillere aktarılamaz. Ancak eşey hücrelerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılır (tüm kanser vakalarının %1 -2’sinde görülür) [2], [3], [4].

Kanser hücrelerinin çeşitli özellikleri vardır. Bunlardan bazıları, bölünebilmek için dış uyaranlara gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayan sinyallere karşı duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarması, hücre kültürlerinde kontakt inhibisyonundan kaçabilme ve metastaz yapabilme şeklindedir [5].

1.2 Kanser genetiği

Kanser oluşumu çok aşamalı bir süreçtir ve bu süreçte bazı genlerin mutasyona uğraması gerekmektedir. Yapılan araştırmalar kanser oluşumu için tümör süpresör genlerinde ve proto-onkogenlerde bir dizi mutasyonun oluşması gerektiğini kanıtlamaktadır [3], [5]. Tümör baskılayıcı genler, hücre çoğalmasında negatif yönde görev alırlar. Bu genlerin amacı tümör oluşumunu önlemek değil, hücre döngüsünü kontrol altında tutmaktır [1], [5]. Son 25 yılda yaklaşık 20 tümör baskılayıcı gen bulunmuştur [1]. Onkogenler ise aşırı aktivitelerinden dolayı hücrenin kanserleşmesine neden olurlar. Genin mutasyonlu olmayan versiyonlarına göre, genetik olarak daha baskın genlerdir.

Kanser genetiğinde 2 tip mutasyon bulunur. Bunlardan biri kalıtsal kansere neden olan germline mutasyondur ve bu mutasyonu taşıyan bireyler, mutasyonu gelecek nesillere aktarmaktadırlar. Somatik mutasyon ise, somatik hücrelerde ortaya çıkar ve bu mutasyonlar gelecek nesillere aktarılmaz, sporadik kanser gelişiminde etkindir.



Şekil 1.1 Sporadik ve kalıtsal kanserde iki vuruş hipotezi (Çefle [5])

Knudson'ın iki vuruş hipotezine göre kalıtsal kanserde, vuruşlardan birinin doğuştan olması gerekir, diğer kopyanın kaybı ile tümör gelişimi başlar. Sporadik kanserde ise doğum sonrası hücrede arka arkaya iki vuruş olması ile birlikte kanser gelişimi başlamaktadır.

Kanser genetiğindeki önemli kavramlardan biri de apoptozis adı verilen programlı hücre ölümüdür ve birçok gen ile ilişkili aktif bir sistemdir. Nekroz ya da bir kaza sonrasında meydana gelen ölümlerden de bu yönü ile ayrılmaktadır. Apoptozis kararı hücre tarafından verilir. Apoptozisin anlaşılması, kanser hastalıklarının tedavisinde umut vermektedir. Apoptozisi arttıran (proto-onkogenler) *p53*, *MYC*, *Bax*, *Bcl-XL* ve apoptozisi azaltan (tümör süpresör genler) *Bcl-XL*, *Bcl-2*, *Mc11* genleri üzerinde halen çalışılmaktadır [6], [7].

1.3 Kanserde onkogen aktivasyonu

Proto-onkogenler, normal hücre gelişmesi için aktive olup onkogenleri oluştururlar, normal hücre büyümesini ve bölünmesini uyaran proteinleri şifrelerler [3]. Onkogen kansere neden olarak belirlenen ilk genidir ve aşırı aktiviteden dolayı hücrenin kanserleşmesine sebep olur.

Onkogenlerin aktivasyonuna neden olan mekanizmalar; nokta mutasyonları, kromozomal yeniden düzenlemeler ve gen amplifikasyonu şeklindedir. Nokta mutasyonu DNA'nın nükleotid dizisinde oluşur ve gelecek nesillere aktarılır.

Gen amplifikasyonu proto-onkogenin aşırı ifadesi ile oluşmaktadır. Onkogeneze boyunca, DNA segmenti çoğalır ve amplifikasyona uğrar. Çoğalan DNA segmentindeki bir proto-onkogenin yüzlerce kopyası genoma eklenebilir. Meme kanseri de dahil olmak üzere birçok tümörün başlamasında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar [5]. Örneğin, meme kanserinde *ERBB2* (*HER2/neu*) onkogeninin amplifikasyonu ve fazla ekspresyonu, primer insan meme tümörlerinin %10-34'ünde görülmektedir [8].

Son bulgular, meme kanserinde *ERBB2*'nin 17q12-q21 amplifikasyonu tarafından aktive edilen tek gen olmadığını ileri sürer. *ERBB2* ile *THRA/ERBA1*, *RARA*, *TOP2A*, *GRB7*, *MLN50*, *MLN51*, *MLN62/TRAFA4*, *MLN64* ve *PPARBP* genlerinin koamplifikasyonu rapor edilmiştir. cDNA mikroarray ile yapılan meme kanseri çalışmaları bu farklı gen grupları ile *ERBB2*'ye yakın ekspresyonları tanımlamıştır [8], [9].

1.4 Köpeklerde meme bezi

Meme bezleri, süt kanalları boyunca gelişir. Köpeklerde genelde 5 çift süt bezi bulunur. Süt bezleri modifiye olmuş ter bezleridir. Tubuloalveolar bezlerin bileşimidir ve loblara bölünmüştür. Meme bezleri parenkimadan, stromadan, kanallardan, damarlardan ve sinirlerden meydana gelir. Her meme bezinin, küçük lenf damarları ağı bulunmaktadır [10].

1.5 Köpeklerde Meme Kanseri

Meme kanseri, dişi köpeklerde en çok rastlanan kanser tipidir. Dişi köpeklerdeki tüm tümörlerin %40'ını CMTs (Canine Mammary Tumors) oluşturur. Köpeklerde ve insanlarda meme kanseri kompleks olup çok faktörlüdür. Genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle oluşmaktadır [11], [12]. Bu güne kadar köpek meme kanseri hücre grupları ekspresyon profili histolojik olarak tam anlamıyla karakterize edilmemiştir.

Köpeklerde tümör invazyonunun fiziksel süreci, bölgesel mikroçevre ile hücreli ilişkisinin kesilmesi şeklindedir. Çevreyi saran matriksin degradasyonu ve hücreli hareket de bu durumu izleyen olaylardır [13]. Nekroz, türev kaybı, hücreli ve çekirdeksel polimorfizm, yüksek mitotik içerik, yüksek mikrodamar yoğunluğu ve aralıklı bazal membranlar köpeklerdeki malignant tümörlerin tipik özellikleridir [14]. Misdorp (2002), köpek meme tümörlerinin %50'sinin malignant olduğunu söylemektedir. Ayrıca MacEwen ve Withrow (1996), köpeklerde malignant CMTs'lerin çoğunu karsinomaların oluşturduğunu, %52'sinin ise sarkomalardan meydana geldiğini bulmuşlardır. Langenbarch (1998), sarkomaların %75'inin, karsinomaların ise %30'unun

metastaza neden olduğunu ve lenf düğümlerine yayıldığını belirtmektedir. Sonrasında farklı ve uzak organlara yayıldığını, buna ek olarak “anaplastic” karsinomaların köpeklerde en agresif ve malignant meme tümörü tipi olduğunu vurgulamaktadır [15]. Köpek meme bezlerinde sarkoma diğer canlı türlerine göre daha sık görülmektedir ve bunun nedeni tam anlamıyla bilinmemektedir. Köpeklerdeki en yaygın karsinomalar “solid karsinomalar” olup bunu “adenokarsinoma” izler.

Misdorp (1999), meme tümörlerinin çoğunlukla orta yaş ve ileri yaşlardaki dişi köpekleri etkilediğini belirtmektedir

Yapılan bir araştırmada, 9 dişi köpekte malignant meme tümöründe, adipoz dokudaki çevresel içerik belirlenmiştir. Yapılan incelemeye göre tespit edilen bu içerik pyrethroidler; allethrin, cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin ve tetramethrin olarak belirlenmiştir [16].

Dişi köpeklerin kısırlaştırılmamaları durumunda meme kanseri oluşturma riskinin %24 oranında arttığı ve kısırlaştırıldıklarında riskin %24’ten %0,05’e düştüğü gözlenmiştir. Kısırlaştırma köpekleri meme tümörü oluşumuna karşı kısmen korumaktadır [17], [18], [19], [20]. Kısırlaştırılan köpeklerde meme kanseri geliştirme riski, kısırlaştırma yaşına bağlı olarak değişmektedir. 2 yaşından sonra beklenen etki kaybolmaktadır. Kısır kadınlarda meme kanseri nadir görülmektedir. Eğer kısırlık 35 yaş sonrasında olur ise, risk 1/3 oranında azalır [21]. İnsanlarda, düşük doğurganlık durumu ve ilk doğumda ilerlemiş yaşta olunması, meme kanseri riskini arttırır. Köpeklerde ise gebelik dönemi, erken yaşta doğum ve CMTs’nin ortaya çıkması arasında bir korelasyon bulunamamıştır [22]. CMTs gelişiminde yalancı gebelik etkisi halen tartışmalıdır. CMTs tarafından etkilenen 267 dişi köpeğin üzerinde yapılan bir çalışmada, CMTs başlangıcında yalancı hamileliğin hiçbir etkisinin olmadığını göstermiştir [23].

CMTs insidansı ABD ve Batı Avrupa gibi belirli bölgelerde düşer. Bunun nedeni erken yaşta yumurtalığın alınmasıdır (8 haftalıktan 7-12 ay yaş aralığına kadar). Aksine İskandinavya ve İspanya gibi bölgelerde CMTs insidansı çok daha yüksektir çünkü önleyici olarak kısırlaştırma rutin olarak yerine getirilmez [24]. CMTs insidansı köpek

ırkları arasında farklılık gösterir, genetik risk faktörlerinin etkisi de bu durumu desteklemektedir. Bazı ırkların CMTs insidansı daha yüksektir. Rapor edilen, yüksek risk içeren ırklar; Boxer, English Springer Spaniel, Poodle, Cocker Spaniel, Fox Terrier ve English Setter şeklindedir [11].

Köpek meme kanseri üzerinde yapılan çalışmalarda Wnt, hücre döngüsü, sitokin/Rho-GTPase, alternatif tamamlayıcı ve integrin sinyal yollarının moleküler düzeyde insan meme kanseriyle benzerlik gösterdiği bulunmuştur [17]. 1960'dan beri köpeklerdeki spontane neoplazmlar üzerinde yapılan çalışmalar, köpeklerin insan için doğal model olduğunu ve önemini gösterir [20]. Dişi köpeklerdeki tümörlerin epidemiyolojik ve klinik karakteristik davranışları, kadınlardaki meme karsinomalarıyla benzerlik gösterir. Bu yüzden dişi köpekler, karsinogenezin çeşitli yönlerden anlaşılması, her iki tür için de harika bir modeldir [16].

Çoğu gen ailesi için, özellikle de kanserle ilişik olanlarda, insan ve köpek gen sekanslarının yakınlığı fareninkinden daha çok benzerdir [25]. Memeli karsinomalarında *ERBB2* ve *TP53* genlerinin bozulmuş ekspresyonlarının her iki türde de yakın olduğu gözlenmiştir [25], [26]. Onkogenlerdeki benzer mutasyonlar, insanda ve köpeklerde farklı kanser türleriyle sonuçlanabileceğini de göstermiştir [25].

Köpek meme tümörlerinin erkek köpeklerde görülme sıklığı %0-2,7 olarak tespit edilmiştir ancak temel olarak dişi köpeklerde oluşmaktadır [27].

1.6 CMTs için risk faktörleri

Meme kanseri etiyolojisi çok komplekstir ve tam olarak anlaşılamamıştır. Çeşitli genetik, diyetik, çevresel ve karsinogenik durum tümör oluşmasına neden olur [17].

Meme kanseri fenotipinin başlaması ve ilerlemesi birçok adımdan oluşur. Hücre büyümesinde, farklılaşmasında ve hücre ölümlerinde yer alan, meme kanserindeki kritik genlerde amplifikasyonlar, delesyonlar ve yeniden düzenlemeler gözlenmiştir [28].

CMTs gelişiminde etkili olan faktörlerden en önemlileri yaş, beslenme, genetik eğilim, hormonlar, büyüme faktörleri, siklooksijenaz-2 ekspresyonu ve beslenme düzeni olarak sıralanabilir [22].

Bazı prognostik faktörler, insanlarda ve köpeklerde benzerdir. Bunlar klinik evresi, tümör büyüklüğü, histolojik tipi ve derecesidir [19], [29].

Köpeklerde teşhis edilen kanser oranı her sene artmaktadır. İyi beslenme, aşı kampanyaları, koruyucu ve terapik ilaç uygulamaları kanser durumlarında önem arz etmektedir [20].

1. Yaş

Köpek meme tümörleri çoğunlukla orta yaşlarda ve yaşlı köpeklerde görülür [30]. Yapılan son çalışmalara göre, benign tümörlü köpeklerin ortalama yaşı 8,5 iken malignant tümörlü köpeklerin ortalama yaşı 9,5 olarak bulunmuştur. 5 yaşından önce ise malignant tümörlerin görülme olasılığı düşüktür [31].

2. Irklar ve genetik eğilim

MacEwen ve Withrow (1996), bazı köpek ırklarından kaniş, İngiliz Spanyeli, Britanya Spanyeli, Cocker Spanyel, Alman çoban köpeği, Yorkshire Terrier köpeklerinin, meme kanseri oluşum riskinde bir artış görüldüğünü açıklamaktadırlar. Bu ırkların genetik anlamda kansere yakalanma riski yüksektir. Ayrıca *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki kalıcı mutasyonlar, insan meme kanserini geliştirdiği gibi köpek ırklarında da kansere neden olmaktadır.

3. Hormonlar ve büyüme faktörleri

Hem köpeklerde hem de insanlarda, meme tümörleri hormonlar tarafından kontrol edilir ve insan meme kanseri ile CMTs arasındaki hormona bağlı kanser gelişiminde benzerlik bulunabilir [32].

Dişi köpeklerde olduğu gibi kadınlarda da, fizyolojik koşullar altında, normal memeli dokusu gelişimi, ovaryum steroidleri tarafından stimüle edilir [33]. GH (growth hormone), memeli karsinogenezi sürecinde ilk adım olarak proliferasyonu stimüle ettiği

tahmin edilir [5]. MacEwen (1982), Rutteman (1988) ve Gerald (2000), dişi köpeklerdeki ovaryum steroidlerinin etkisinin, çoğunlukla memeli dokusunda eksprese olan reseptörler tarafından gerçekleştiğini belirtmektedir. Progesteron ve östrojen reseptörleri (PR ve ER), hem normal hem de neoplazmaya ait dokularda bulunmaktadır. Malignant tümörlerle benign tümörler karşılaştırıldığında, benign tümörlerdeki ER miktarının daha fazla olduğu görülmektedir.

ER ve PR ekspresyonlarının azalması, daha kötü prognoz ile ilişkilendirilir. Milanta (2005), ER ve PR ekspresyon kaybı ve daha da ilerleyen prognoz durumu arasında önemli bir korelasyon olmadığını bulmuştur. Buna ek olarak Kumaraguruparan (2006), artan ER ekspresyonunu, benign ve malignant tümörlerde tespit etmiştir.

Meme kanserli kadınlardaki klinik tepkiler, ER modülatörlerle (tamoxifen gibi) yapılan terapi sonrası, sadece ER eksprese eden tümörlerle karşılaştırıldığında hem ER hem de PR eksprese eden tümörü olan hastalarda gözle görülür bir iyileşme gözlenmiştir. Bu gözlemler hem ER hem de PR ekspresyonunu inceleyen veteriner ilaçları için çok kullanışlı prognostik faktörlerdir. İnsan ilaçlarının tersine ER ve PR ekspresyonu rutin olarak köpek meme tümörlerinde değerlendirilmez [34].

Üreme döngüsüyle ilgili endokrin hormonlarının rolü de önemlidir. Yapay menapozun kadınlardaki meme kanseri riskini azalttığı ispatlanmıştır, dişi köpeklerin ovariyohisterektomisi de bu türde bir riski azaltabilir. Ovariyohisterektomi, erken yaşam evrelerinde köpek meme tümörü riskini %99,5'ten fazla oranda düşürmektedir [35], [36].

4. Siklooksijenaz-2 (Cox-2)

Siklooksijenazlar (COX), prostaglandin (PG) biyosentezinde hız sınırlayıcı enzimler olarak bilinirler [37]. Siklooksijenazlardan Cox-2, insan meme kanserinde tümör gelişiminde ve ilerlemesinde yer alır. Son çalışmalar Cox-1 ve Cox-2'nin köpek meme tümörlerinde ekspres olduklarını göstermiştir. Cox-1 çoğu dokuda eksprese olur ve normal fizyolojik fonksiyonların regülasyonunda önemli bir rol oynar. Cox-2 normal hücrelerde bulunmaz fakat büyüme faktörleri, inflamatuvar cevaplar, tümör

promotorları ve onkogenler tarafından indüklenir. Yapılan bir çalışmaya bağlı olarak, Cox-2'nin %56-100'ünün overekspresyonu tümörlü hücrelerde bulunmuştur. Lavallo'nun (2009) çalışmasına göre yüksek Cox-2 ekspresyonu olan köpeklerde hayatta kalma süresi daha kısadır. Buna karşın bazı araştırmacılar, normal meme dokusunda Cox-2 ekspresyonu bulamazken, bazıları bulmuştur [37], [38], [39], [40], [41].

5. Beslenme düzeni

Birçok çalışma, çeşitli beslenme düzenleri ve insan meme kanseri oluşma riskinde obezitenin etkisini değerlendirmiştir. Obezite ve yüksek yağ oranlı beslenme düzeni, kadınlardaki meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkilidir. 9-12 aylık zayıf köpeklerde ise CMTs oluşumu riski düşüktür [20], [42], [43].

Son araştırmalar, obezitenin kadınlarda meme kanseri gelişiminde risk faktörü olduğunu gösterir. Perez Alenza (1988), 188 köpek ile yapmış olduğu bir çalışmada, yüksek oranda tüketilen kırmızı etin (özellikle sığır ve domuz) ve tavuk etinin CMTs ve meme bezi displazi gelişiminde risk faktörleri olduğunu göstermiştir.

1.7 Model organizma olarak köpekler

Son yıllarda, köpek genomunun sekansının (%99'u tamamlanmıştır) belirlenmesiyle birlikte, insan genomuyla göstermiş olduğu benzerlik, köpeği kanser araştırmaları için ilgi çeken ve aranan bir model yapmıştır [25]. Karşılaştırmalı histolojik analizler intratümörel (hücre-hücre) heterojenliği, insan meme tümörlerinde gözlenmiştir ve bunlar köpek tümörlerinin kökeninde de bulunmaktadır [25], [44]. Köpeklerle yapılan bazı çalışmalar, köpek meme karsinomalarının kadınlardakine yüzdelik oran açısından yakın östrojen reseptörlerinin olduğunu göstermiştir. Araştırmalar, anti-östrojen tamoxifenin, anti-tümörel etkisinin kadınlarda olduğu gibi köpeklerde de bulunduğunu kanıtlar [20], [45].

Köpek meme bezi karsinomaları, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından öngörülen doğal modellerdir. İnsan ve köpek meme bezi karsinomalarının sınıflandırılma planları farklı olmasına rağmen, histolojik betimleri çok yakındır. Prognostik faktörleri olan

tümör boyutu, lenf düğümü, metastazı, histolojik ve nükleer dereceleri benzerdir [20].

Köpeklerin vücut ebatının genişliği ve diğer laboratuvar hayvanlarına oranla daha saf oluşu, buna ek olarak insanlarda olduğu gibi genetik çeşitlilik sağlaması köpeklerle ilgili araştırmalarda önemlidir [25], [44].

Köpekler farelerden farklı olarak, insanlarla ortak çevreyi paylaşırlar, aynı karsinojenlere maruz kalırlar ve insanlardaki meme kanseri gelişimi için önemli örnek olurlar [44]. Ev hayvanlarındaki malignant tümörler, insan kanserine, kemirgen hayvanlardaki tümörlerden, hücre kinetiği ve boyutu açısından daha yakındır.

Köpeklerle çalışmanın olası dezavantajı ise spesifik bir zaman periyodu içinde, gereken minimum sayıdaki vakanın, bir çalışma için biriktirilmesi, bekleme süresi gerektirmesidir.

Bazı kanser türlerinin hayvanlardaki insidansı, insanlardakinden daha yüksektir. Bu hayvanlardaki malignant tümörler, insanlardaki malignant tümörlerden daha hızlı gelişirler. Bu durum ortalama yaşam süresi ile ilgilidir ve daha fazla araştırma yapılabilme olanağı sağlar [25], [44]. Köpeklerde meme tümörü, kadınlarda olduğu gibi, daha yaşlı gruplarda ortaya çıkar [20].

İnflamatuvar meme kanseri (IMC), meme karsinomasının özel bir tipidir ve literatürde limitli bilgi bulunmaktadır. Misdorp (1999), nadir görülen, bölgesel, agresif, hızlı bir şekilde ilerleyen ve yüksek metastatik kanser olan IMC'nin, köpekleri ve insanları etkilediğini bulmuştur. [46], [47], [48] .

1.8 İnsanda meme kanseri

Meme kanseri, kadınlardaki en yaygın kanser tipi olup, kadınlarda görülen tüm kanserlerin %23'ünü kapsar [17], [28], [49]. Meme bezi, hipofizyel ve üreme hormonları için hedef organlardan birisidir ve bu nedenle üreme sistemindeki diğer organlara göre beş kat daha fazla tümör oluşumuna yatkın olduğu, üreme hormonlarının ve reseptörlerinin bu duruma önemli etkisi olduğu varsayılmaktadır [50].

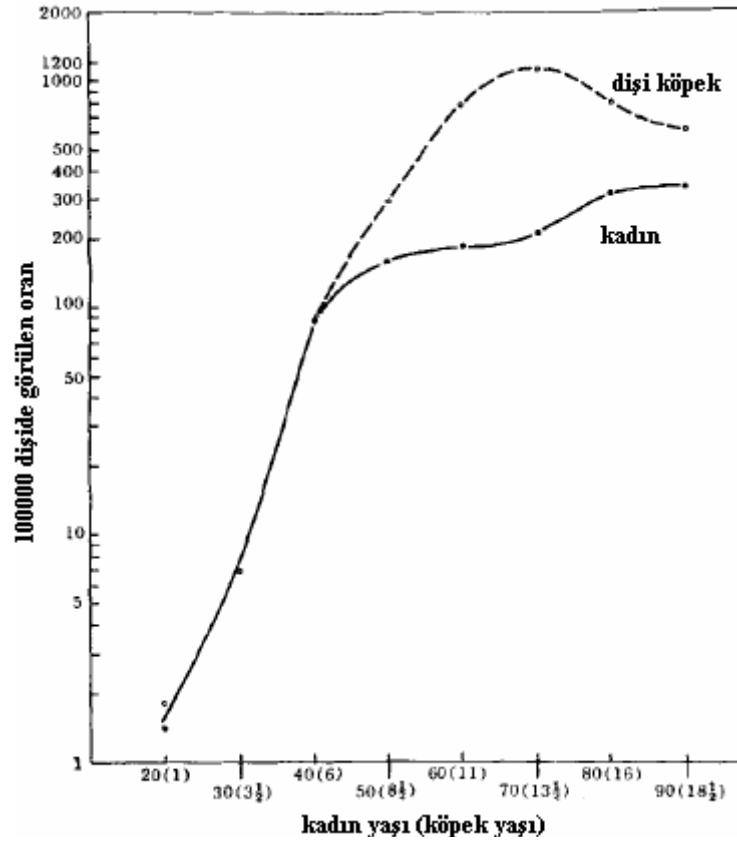
Yapılan bir araştırmaya göre; östrojen reseptörlerinin, progesteron reseptörleri ile bulunup bulunmaması, kadınlardaki meme kanserinin prognostik faktörüdür. Hormon bağımlı tümörlerin (kadınlardaki meme karsinomalarının %60-70'i), bu reseptörü olmayanlardan daha fazla prognozu vardır [20], [45]. Ayrıca kadınlarda teşhis edilen meme kanserlerinin %70'inde östrojen reseptör alpha (Estrogen Receptor Alpha) ekspresyonu görülmüştür. ER-alpha için en yaygın tedavi tamoxifen gibi selektif östrojen reseptör modülatörü (SERMs) kullanımı görülür [51].

Kadınlarda meme kanseri, Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da sık görülmektedir. Güney Amerika ve Güney Avrupa'da ortalama bir insidans varken, Asya ve Avrupa ülkelerinde düşük insidans bulunmaktadır [20]. Asya'da geleneksel beslenme düzeninde soya kullanımı batıdan daha fazladır. Soyaya özgü kimyasalların meme kanserinde koruyucu etkisi olduğu yönünde araştırmalar vardır. Bu nedenle Asya'da yaşayan kadınlarda görülen meme kanseri oranı, batıya oranla düşüktür şeklinde yorum yapılmaktadır [52].

Amerika'da her yıl 180.000 kişi bu hastalığa yakalanmaktadır. Meme kanseri her yıl 43.000 kadının yaşamını yitirmesine neden olmaktadır. Kadınlar arasında akciğer kanserinden sonra kanser ölümlerinin 2. sırada gelenidir [2], [3]. 2008 yılında 458.000 ölüm söz konusu olmuştur. 35 yaşından önce meme kanseri gelişimi riski ise düşüktür.

İnsan memesinde sarkoma sık görülmemektedir, tüm birincil malignant tümörlerinin %1'inden az görülür [15], [53], [54], [55]. Ayrıca malignant meme bezi tümörlerinin epitel dokudan kaynaklandığı bilinmektedir.

Dişi köpeklerle ve insan standardına göre yaş düzenlemesi yapıldığında, her iki türde de hastalık oranı kadınlardaki doğal menapoz yaşına kadar aynı şekilde artmaktadır. Bu zamandan sonra, artış şekli insan için azalır ancak dişi köpeklerdeki artış genç yaşlarda olduğu gibi aynı ekspanansiyel değerde devam eder (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 Kadınlarda ve dişi köpeklerde yaşa bağlı meme tümörü risk oranı (Schneider, 1970)

1.9 Meme Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Meme kanserinin genetik açıdan bilinmesi çok önemlidir. Meme kanserinde yer alan genlerin tanımlanması, hastalığın moleküler düzeyde anlaşılması yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini de beraberinde getirmektedir.

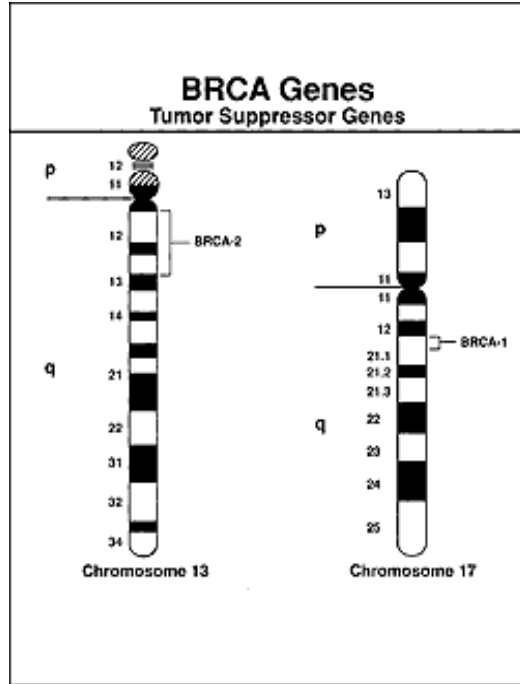
DNA mikroarray teknolojisi, çok sayıda meme tümörü çalışmalarında kullanılmıştır [17]. Köpeklerde ise şimdiye kadar gen ekspresyonu profili belgelenmemiş, az sayıda köpek meme tümörü hücre gruplarının moleküler düzeydeki karakterizasyonu yapılmıştır. Buna ek olarak ana sinyal yollarını tanımlayan bir çalışma bulunmamaktadır [17].

Uzun yıllar süren araştırmalar, meme kanseri vakalarının %10-15'inin ailesel olduğunu göstermektedir.

1. *BRCA1* ve *BRCA2* genleri

1994 ve 1995 yıllarında meme kanserine yol açan 2 önemli gen bulunmuştur. BRCA “BReast CAncer” kelimesinden türemiş olan bu genlerdeki mutasyonların meme kanseri gelişim riskini arttırdığı kanıtlanmıştır. Bu genlerin tümör süpresör gen oldukları düşünülmektedir. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin hücre içindeki rollerini kanıtlamak çok güçtür. Ancak bazı varsayımlar görevlerinin DNA onarımı şeklinde olduğu yönündedir [2], [3].

BRCA1 17. kromozomun uzun kolunda, *BRCA2* geni ise 13. kromozomda yer almaktadır [1]. Bu genlerin mutasyonlarının meme kanseri olgularının yaklaşık %30’undan sorumlu olduğu düşünülmektedir [56]. Ayrıca *BRCA2* geni erkeklerde meme kanserine neden olabilir.



Şekil 1.3 *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin kromozomlarda bulundukları bölgeler

Meme kanseri kalıtsal ya da sporadik olabilir. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki germline mutasyonları ailevi meme kanseri gelişimiyle bağlantılıdır [28]. Sık görülen yüksek

penetrans gösteren, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlar meme ve ovaryum kanserlerinin %5-10'undan sorumludur [11], [57]. *BRCA1* için 1600, *BRCA2* için 1800'den fazla farklı mutasyon, polimorfizm ve varyant rapor edilmiştir [57]. Mutant bir *BRCA1* geni taşıyan bir kadında meme kanseri gelişme riski %85'tir ve bu kadınların yumurtalık kanseri gelişimi riski de çok yüksek olacaktır. Mutant allel taşımayan kadınlarda bu risk %12'dir [2]. *BRCA2* mutasyonları tüm ailesel meme kanseri riskinin üçte ikisinden sorumludur [2]. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin protein ürünleri hasara uğramış DNA'nın tamirini sağlar. Yapılan çalışmalara göre RAD51 isimli proteinle genomik stabiliteden sorumlu tümör süpresör genleri olan *BRCA1/2* 'nin kodladıkları proteinlerin DNA kırıklıklarını tamir ettikleri görülmüştür [5].

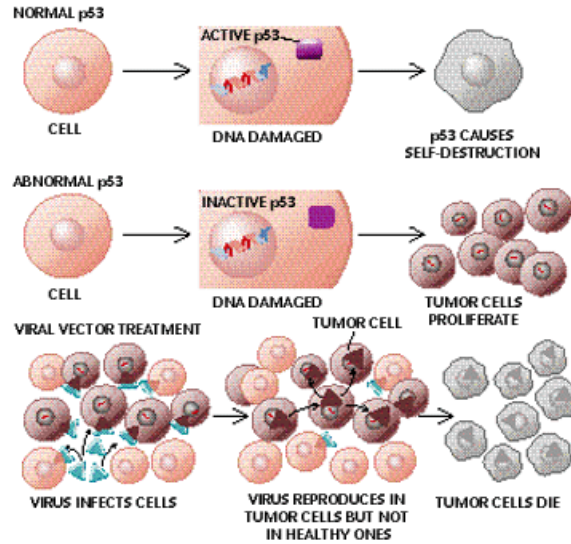
Köpek *BRCA1* geninin, 14. intronunda polimorfizm görülmektedir [15].

Köpek meme tümörleri (CMTs), insan meme tümörleri için model olmuş ve malign gen ekspresyon profilleri örtüşmüştür. *BRCA* mutasyonları ve steroid reseptör ekspresyonları insan ve köpek meme tümörlerinde büyük ölçüde farklılık gösterir. CMT karsinogenezindeki moleküler mekanizmanın karakterizasyonu, hem köpek hem de insan hastalıklarında önemli bir modeldir [58].

2. *p53* Tümör-Baskılayıcı geni

Protein ürünü 53.000 dalton moleküler ağırlığında olmasından dolayı *p53* geni olarak isimlendirilmiştir. "Genomun koruyucu meleği" olarak da bilinen bu gen DNA tamirini gerçekleştirmektedir [3]. *p53* geni mutasyonu, insanda çeşitli kanser türlerinin gelişmesine neden olur [59].

p53 geni çok iyi derecede korunmaktadır. Bu genin ürünlerinin fonksiyonu, hücre döngüsünde kendisini gösterir ve hücrenin G1'den S fazına geçişini kontrol eder [66], [60]. Ayrıca meme dokusunun östrojen ve progesteron ile stimülasyonu, *p53* aracılığıyla apoptozis olayının artmasına neden olur [61].



Şekil 1.4 *p53* geninin mutasyonu sonucu kanser gelişimi

Yapılan bir araştırmada, *p53* geninin 4, 5, 6 ve 7. ekzonlarında mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar meme kanseri gelişimine sebep olur. Aynı çalışmada, insan ve köpek *p53* genleri arasında %81 oranında gen homolojisi rapor edilmiştir [60].

Köpek “*p53* coding exons”, insan genindekiyle çok yakınlık göstermekte ve gen ürünleri birbirine çok benzemektedir.

Yapılan çalışmalar, *p53* mutasyonlarının meme tümörigenezinde, hem köpekte hem de insanda yakın davranışlar sergilediğini kanıtlamaktadır. Buna rağmen köpek neoplazmalarındaki bu genin mutasyonu ile ilgili limitli sayıda veri bulunmaktadır.

3. Meme kanserine neden olan diğer genler ve hücresel olaylar

Malignant tümör hücrelerinin invazyonu ve metastazı kompleks, çok aşamalı bir süreç olup, başlangıçtaki olaylar, ekstraselüler matriksin (ECM) yarılması ve bazal membranın invazyonu şeklindedir. Kanserli bölgenin bağ dokudaki fibroblastları, proliferasyonu ve karsinoma hücrelerinin invazyonunu arttırabilir [62], [63]. Çeşitli ECM moleküllerinin, proteazların, sitokinlerin salgılanmasını anjiyogenez (damar gelişimi) yoluyla indükler. Buradaki proteazlar matriks metalloproteinazlar (MMPs) olarak bilinirler, ECM proteoglikan componentlerini ve proteinlerini hidrolizler. Fizyolojik şartlar altında, MMPs’ler çeşitli hücreler ve dokular tarafından ekspres olurlar. MMPs çeşitli patolojik

süreçlerde yer alır. ECM bozulmasını hızlandırdıkları düşünülür ki bu da tümör invazyonu ve metastaz ile ilişkilendirilir [18], [62].

Deneylerde bilim insanları *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *EGFR*, *ESR1*, *HER2*, *PTEN*, *STK11* ve *TP53* gibi genlerin sekanslarını dikkate almışlar ve incelemeler yapmışlardır. Bunlardan en çok çalışılan risk genleri *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *CHEK2* ve *ATM*'dir. DNA hasar tanınması ve tamir yollarında yer alan proteinler için gerekli tüm kodlar bu genlerde bulunmaktadır [64], [65]. Yapılan bir araştırmadaki sonuçlar *ERBB2*'nin ve diğer birkaç genin, meme kanserinde 17q12-q21 amplifikasyonu ile doğrudan aktive olduğunu kanıtlar [8].

IL6, *IL8* ve *IL1B* gibi interlökin genler MCF10CA1a hücre kümelerinde daha yüksek seviyelerde ekspresyona uğrarlar. Ekstraselüler matrikste bulunan çoğu gen (*COL6A1*, *KRT7*, *FBN1*, *MMP2*, *MUC1* ve *FN1*) MCF10CA1a'da daha yüksek düzeylerde ekspres olurlar [28].

TP53 genindeki germline mutasyonlar, çeşitli kanser türlerinin oluşma riskini arttırmaktadır. *ATM*'de nadir de olsa görülen mutasyonlar, taşıyıcılarda bulunan meme kanseri riskini yaklaşık olarak ikiye katlamaktadır. *CHEK2*, meme kanserindeki düşük penetrans tümör süpresör geni gibi hareket eder [66], [67]. Germline *PTEN* mutasyonları insanlardaki meme malignansı ile ilişkilendirilmektedir [11]. *PTEN* germline mutasyonu, 10. kromozomun 10q23 bölgesindedir ve meme kanserine neden olur [6]. *TP53* mutasyonları, insan kanserlerinde sık görülmektedir. Sporadik meme kanserinde *BRCA1*'deki mutasyonla bağlantılıdır. Bu mutasyonun görülme oranı sporadik meme kanseri vakalarında %25'tir [60].

MMP ailesi üyelerinden MMP-13'ün insan kanserindeki önemi kanıtlanmıştır. MMP-13 tümör gelişimini ve progresyonunu artırır [18].

GRB7, SH2-domain içeren sinyal proteindir ve büyüme faktörü reseptörü olan tirozin kinaz üyesidir. *GRB7*'nin overekspresyonu, hücre göçünde ve invazyonunda önemli rol oynar [8].

BDKRB2 geninin meme hücrelerindeki mitozu indüklediği ve kanser ilerlemesini arttırdığı bilinir [28].

Yapılan bir araştırma sonucunda *CDH1*' in down-regülasyonu (bir hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerin azalması) görülmüştür. Bu genin deregülasyonu öncelikle meme kanserinde ve diğer tip kanserlerde gözlenmiştir [28]. Spontane ölümsüzleşen MCF10A hücre kümeleri tümör formasyonu ve invazyonu gibi karakteristik özellikler göstermez. MCF10A hücreleri, c-Ha-Ras ile birlikte premalignant MCF10AT1 hücre kümelerini oluşturmak üzere dönüştürülür. MCF10AT1 ve MCF10CA1a hücreleri, malignant meme kanseri hücre tipinin tüm karakteristik özelliklerini gösterir [28].

Hem köpek hem de insan tümörlerinde up-regülasyona uğrayan genlerden *ELK3*, MAPK aktivasyonunda önemli bir rol oynar ve meme kanseri hücrelerinde azalan mRNA ekspresyonu olarak gözlenir [68].

İnsülinin aksine, insan ve köpek meme tümörü lizatlarında artan IGF1 ekspresyonunun meme karsinogenezinde yer aldığı varsayılmaktadır. Buna ek olarak IGF1R'nin artan ekspresyonu insan meme kanserinde rapor edilmiştir [69], [70].

1.10 cDNA Kütüphaneleri

cDNA kütüphaneleri karşılaştırmalı genom çalışmalarında gen dizilerini çözmek ve genlerin fonksiyonlarını bulmak için kullanılmaktadır. cDNA çalışmaları, büyük bir genomda sadece genlerin kodlandığı bölgelere ulaşmayı kolaylaştıran bir yöntem olduğundan önem arz etmektedir.

cDNA kütüphaneleri, bir hücreden ya da dokudan izole edilen mRNA'dan sentezlenen cDNA kopyalarının klonlanmasıyla elde edilir. cDNA, hücredeki mRNA'dan revers transkriptaz enzimi ile oluşturulur. Çekirdekten ayrılıp sitoplazmaya ulaşan mRNA'nın karşılığı olarak oluşturulan DNA zinciri cDNA (complementary DNA) olarak isimlendirilir. mRNA'lar tek iplikli yapılarından ötürü laboratuvar ortamında çok çabuk degrade olabilirler. mRNA molekülleri ile çalışmak zor olduğu için DNA karşılığı olan çift zincirli ve kararlı cDNA adı verilen komplementer DNA'ya çevrilir ve bu şekilde kullanılır

[71].

cDNA kütüphaneleri aktif olan genler hakkında bilgi vermektedir. cDNA'lar olgun mRNA'dan sentezlendiklerinden intron, promotor bölgesi ve regülatör içermezler. Böylece genomik DNA kütüphanelerinden, genomun sadece transkripsiyona uğrayan ekson bölgelerini içermesiyle ayrılırlar [72]. Çift zincirli cDNA sentezi için önce mRNA kalıbı üzerinden revers transkriptaz enzimi ile tek zincirli DNA sentezi gerçekleşir. Ardından DNA kalıbı uzaklaştırılır, üretilen ilk DNA zincir kalıp olarak kullanılır ve ikinci DNA zincirinin oluşması sağlanır. Son aşamada ise DNA'ya bağlı *E. Coli* DNA polimeraz I gibi polimerazlar kullanılır [73]. Farklı yöntemlerle oluşturulan bu cDNA'lardan oluşturulan kütüphanelerden nükleotit dizi bilgisinin çözülmesi ile EST (Expressed Sequenced Tags) oluşturulur. Bunun amacı tüm bir organizma ya da organizmaların istenilen hücreleri, dokuları, organları için özgün olarak anlatımı yapılan genlerin belirlenmesidir.

1.11 EST (Expressed Sequences Tags)

Günümüzde genom dizilerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Genom çalışmalarıyla, genlerin ne zaman, nasıl ve ne şekilde aktif olduklarının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Çünkü genlerin çalışma mekanizmaları anlaşılırsa, hastalık durumlarında bu genlerin nasıl tepki verecekleri de bulunabilir. cDNA klonlarına ait dizi bilgileri bilgisayar ortamına aktarılır ve EST'ler (eksprese olmuş dizi bilgiler) oluşturulur.

EST'ler dizin analizi sonucu elde edilen genom parçaları olup bilinmeyen genlerin tanımlanıp yerlerinin tespit edilmesinde kullanılır. Gen ekspresyonu ve regülasyonu ile ilgili bilgilerin toplanması, genom haritalarının oluşturulması konusunda kısa sürede bilgi sağlar ve ekonomiktir. EST projelerini gerçekleştirmek için rRNA, tRNA ve mRNA içeren RNA izole edilir ve ardından hücrenin ya da dokunun bütün aktif genlerini temsil eden mRNA çıkarılır. mRNA total RNA'nın %3'ü olup kararsızdır. Revers transkriptaz enzimi ile daha kararlı bir molekül olan cDNA'ya çevrilip vektör olarak kullanılan

plazmidlerin içinde klonlanması gerçekleştirilir ve cDNA kütüphanesi oluşturulur. Bu kütüphaneler sekanslanarak nükleotid sekansları biyoinformatik yöntemlerle analiz edilir. EST'lerin olması gereken minimum uzunlukları, nükleotid sayıları belirlenir ve böylece kalitesi kontrol edilir. Ardından bakteri ve vektör kontaminasyonu sekanslardan uzaklaştırılır [74].

Genom boyutları organizmalar arasında farklılık göstermektedir ve genellikle genomun büyük bir kısmı gen kodlanmayan bölgelerden oluşmaktadır. Bu yüzden genomik dizilerden genlerin tespiti zor olmaktadır. Ham EST dizilerinde bulunan adaptörün, vektörün, düşük değerli dizilerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Böylece veriler daha iyi incelenmek üzere temizlenir. Bu temizleme için PHRED, CROSS-MATCH, Vecscreen gibi programlar kullanılabilir. Fragment birleştirmek için de PHRAP ve CAP3 gibi programlar bulunmaktadır. Bu programların ardından elde edilen sonuçların GenBank veritabanında BLAST analizleri yapılmaktadır.

1.12 GenBank ve NCBI

GenBank; EMBL, EBI (Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü) ve DDBJ işbirliğiyle Ulusal Biyoteknoloji Enformasyon Merkezi'nde (NCBI) oluşturulmuştur. GenBank farklı organizmaların DNA nükleotid dizilerini ve protein aminoasit dizilerini içeren bir dizi arşivi şeklinde düşünülebilir. NCBI; GenBank araştırmacılarının doğrudan göndermiş oldukları dizi bilgileri ile oluşturmaktadır. Dizi incelendikten sonra erişim numarası (Accession Number) alınıp, genel kullanıma sunulur. NCBI, Web'e dayalı en önemli biyolojik veritabanı olup içeriğinde birçok genom dizisi, makaleler ve Moleküler Biyoloji dalındaki kitapları bulunmaktadır.

2. Tezin Amacı

Bu araştırmada, Terrier ırkı iki farklı köpeğin normal ve tümörlü meme dokusundan alınan örneklerden önce RNA izolasyonu sonra mRNA ayrımı yapılarak cDNA kütüphanesi oluşturulacaktır. Elde edilen EST'ler biyoinformatik analizlere tabi tutulacaktır. BLAST yöntemi ile daha önce insan ve köpek patogenezisinde rol aldığı

bilinen genlerle çalışmamızda kullanılan örnekler, birbiri ile karşılaştırılarak meme tümör dokusunda eksprese olan genlerin profili analiz edilecektir. Buna ek olarak Terrier cinsi için daha önce belirlenmemiş genlerin varlığı gösterilecektir.

3. Hipotez

Son yıllarda hayvanlarda ve insanlarda meme kanseri vakalarına çok sık rastlanmaktadır. Kanserın moleküler biyolojisini çözmek için birçok araştırma yürütölmektedir. Köpek meme tümörlerinin oluşumu ve gelişiminin arkasındaki patogenetik mekanizma bugüne kadar net olarak açıklanamamıştır.

Meme tümörü oluşumu mekanizmasında rol oynayan genlerin açığa çıkarılarak, bu genlerin meme kanseri prognozu değeriendirilmesi için kullanılması, meme kanseri çalışmalarında temel olarak kullanılabilir. Meme kanseri oluşumunda, insanlardaki ve köpeklerdeki patogenetik mekanizmaların karşılaştırılması ve ortak noktaların belirlenerek köpek meme tümörlerinin insan meme kanseri için uygun bir biyomodel olup olmayacağının belirlenmesi, bu hastalığın daha iyi anlaşılması için önem arz eder.

MATERYAL VE METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1 Hayvan Materyali

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'nden alınan Terrier ırkı köpeklerin meme dokuları kullanılmıştır. Sağlıklı ve tümörlü meme dokuları, biyopsi yöntemi ile sağlıklı ve meme kanserine yakalanmış iki farklı Terrier ırkı köpekten alınmıştır.

2.1.2 Kullanılan Kitler

RNA izolasyonu için RNeasy kiti (Qiagen), mRNA izolasyonu için Oligotex mRNA (Qiagen), cDNA kütüphanesi oluşturmak için CloneMiner cDNA Library Construction Kit (Invitrogen) kullanıldı.

2.2 METOD

2.2.1 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için Qiagen RNeasy kiti kullanıldı. Terrier ırkı köpeklerin sağlıklı ve tümörlü meme dokusu hücreleri deney yapılana dek -80°C'de muhafaza edildi. Her iki

dokudan da ayrı ayrı RNA izolasyonu yapıldı. Dokular tartıldı, sağlıklı meme dokusu 1,311 g, tümörlü dokuları ise 1,056 g olarak belirlendi. Her iki doku da ayrı ayrı, sıvı azotla havanda bir miktar parçalandı. Sonra dokulara Lysis Reagent ilave edilerek rotor-stator tipindeki MICCRA-D-1 marka homojenizatörle homojenize edildi. Bu parçalama işlemi hem sağlıklı dokular hem de tümörlü dokular için ayrı ayrı yapıldı. Nükleoprotein komplekslerinin çözülmesi için homojenatlar oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. 200 µl kloroform eklenerek faz ayrımı için ön hazırlık yapıldı. Homojenat oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildikten sonra 4 °C’de 12.000 devirde 15 dakika santrifüjlendi. Örnekler 3 faza ayrıldı. RNA’nın bulunduğu üstteki renksiz kısım başka bir tüpe alınarak üzerine aynı hacimde %70 etanol eklendi ve vortekslendi. Çıkarılan yeni tüplere yerleştirilen spin kolonlara aktarılan örnekler 15 saniye 10.000 devirde oda sıcaklığında santrifüj edildi ve sonrasında süpernatant atıldı. Bu işlem iki kere tekrar edildi. Kolonlara 700 µl Buffer RW1 eklendi ve 15 saniye 10.000 devirde santrifüjlendi. Tekrar spin kolonlar üzerine 500 µl Buffer RPE eklendi ve 15 saniye 10.000 devirde santrifüjlendi. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi. Kolonlar yeni tüplere alınarak üzerlerine RNase free water eklendi ve elüsyon için 1 dakika 10.000 devirde santrifüjlendi. İzole edilen RNA’nın tamamının elüe olması için bu işlem tekrarlandı.

2.2.2 mRNA izolasyonu

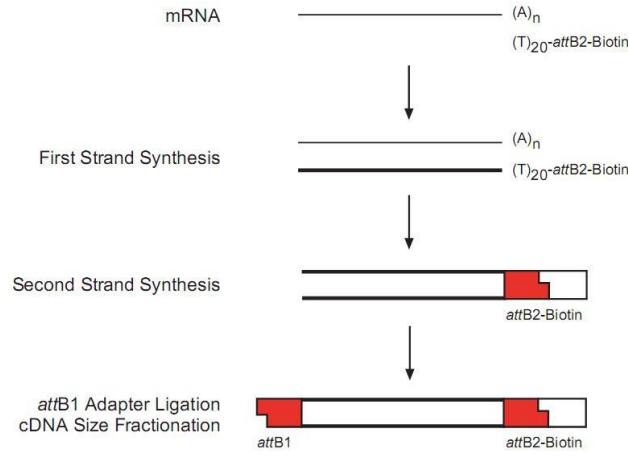
mRNA izolasyonu için Oligotex mRNA Spin Column (Qiagen) kiti kullanıldı. Tümörlü ve sağlıklı dokuların üçer tüpünde de RNA miktarı yaklaşık 0,25 mg olduğu düşünüldü ve kit protokolüne göre örnekler 250 µl’ye RNase-free water ile tamamlandı ve 250 µl Buffer OBB ve 15 µl Oligotex Suspension eklenip pipetle karıştırıldı. Örnekler 3 dakika 70 °C’de su banyosunda inkübe edilerek RNA’nın sekonder yapılarının yıkılması sağlandı. Oligotex’in oligodT30 ve mRNA’nın polyA kuyruğu mRNA’nın polyA kuyruğu arasında hibridizasyonun gerçekleşmesi için örnekler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. 2 dakika 13.000 rpm’de santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. mRNA pelleti 400 µl OW2 ile karıştırıldı ve kolona uygulanarak 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi. Bu işlem bir kere daha tekrarlandı ve kolonlar yeni tüplere aktararak 70°C’deki Buffer

OEB, ilk olarak 50 µl, ikinci olarak da 20 µl şeklinde kolona uygulandı ve pipet yardımıyla karıştırıldı. 13.000 rpm'de 1 dakika mRNA elüe edildi.

2.2.3 cDNA kütüphanesinin oluşturulması

Başlangıç materyali olarak tümörlü ve sağlıklı meme dokularından elde edilen mRNA'lar ile Invitrogen CloneMiner kiti kullanılarak iki farklı kütüphane oluşturuldu. İlk olarak primer reaksiyonu için mRNA'nın bulunduğu tüpe 1 µl Biotin- attB2-Oligo(dT) primer ve 1 µl 10 nM dNTP eklendi ve pipetle karıştırıldı. 65°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra 45°C'de 2 dakika soğutuldu. İlk zincir reaksiyonu için 4 µl 5X First Strand Buffer, 2 µl 0.1 M DTT eklenerek karıştırıldı. 45°C'de 2 dakika inkübe edildi. Böylece primer mRNA'nın polyA kuyruğuna hibridize olması sağlandı. 1 µl SuperScript II Revers Transcriptase enzimi eklendi ve mRNA'nın kalıp olarak kullanıldığı cDNA'nın ilk zincir sentezi için 45 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İkinci zincir reaksiyonu için 92 µl DEPC, 30 µl 5X Second Strand Buffer, 3 µl 10 nM dNTPs, 1 µl *E.coli* DNA Ligaz, 4 µl *E.coli* DNA polimeraz I, 1 µl *E.coli* Rnase H eklendi ve karıştırıldı. 16°C'de 2 saat bekletilerek *E.coli* DNA polimeraz I'in birinci cDNA zincirini kullanarak ikinci zinciri sentezlemesi sağlandı. Kör ucun oluşturulması için 2 µl T4 DNA Polimeraz eklenip karıştırıldıktan sonra 16 °C'de 5 dakika bırakıldı. Daha sonra reaksiyonu durdurmak için 10 µl 0.5 M EDTA ilave edildi. 160 µl fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) örneklerle eklenip elle çalkalandı. Oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Üstteki renksiz faz başka bir tüpe alındı. cDNA'ları çöktürmek için 1 µl Glikojen (20 µg/ µl), 80 µl 7,5 M NH₄OAc, 600 µl %100 etanol eklendi ve -80°C'de 10 dakika bekletildi. 4°C'ye ayarlanmış 14.000 rpm'de 25 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atılıp kalan cDNA pelleti yıkanması için üzerine %70 etanol eklendi ve 4 °C'de 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tekrar atılıp yıkama işlemi tekrarlandı. Süpernatant atıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında cDNA pelleti kurutuldu. Pelletin üzerine 18 µl DEPC eklenip pipetle karıştırıldı. Çift zincirli cDNA'nın 5' ucuna attB1 adaptörünün ligasyonu için 10 µl 5X Adaptör Buffer, 10 µl attB1 Adaptör, 7 µl 0.1 M DTT, 5 µl T4 DNA Ligaz eklendi. Pipet hafifçe karıştırıldıktan sonra ligasyonun gerçekleşmesi için 16 °C'de

24 saat inkübe edildi. Ligasyonu durdurmak için tüp 70°C'de 10 dakika bırakıldı.



Şekil 2.1 cDNA kütüphanesinin oluşturulma aşamaları

Kolon kromatografisi için kolonların içindeki %20'lik etanolün tamamı damlatılarak kolonların yıkanması sağlandı ve 0.8 ml TEN buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.1 mM EDTA; 25 mM NaCl) kolona ilave edilip damlaların hacmi ve damlalar arası geçen zaman hesaplandı. Fraksiyon için tüpler hazırlandı ve 100 µl TEN bufferla beraber inaktive edilmiş cDNA kolona uygulandı. Fraksiyon hacmi 600 µl'yi buluncaya kadar TEN buffer eklenmeye devam edildi. Böylece kalan adaptörler kolon kromatografi ile ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Fraksiyonun toplandığı ilk birkaç tüpte büyük boyutlu cDNA fragmentleri diğer tüplerde de küçük boyutlu cDNA fragmentleri olduğu düşünüldüğünden bu tüpler iki şekilde biraraya getirilerek işlemlere devam edildi. cDNA'ları çöktürmek için 1 µl Glikojen (20 µg/ µl), cDNA hacminin yarısı 7,5 M NH₄OAc, cDNA hacminin 2,5 katı %100 etanol eklenip 80°C'de 10 dakika bekletildi. 4°C, 14.000 rpm'de 25 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atılıp kalan cDNA pelleti yıkanması için üzerine %70 etanol eklendi ve 4°C, 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi. Süpernatant tekrar atıldı ve yıkama işlemi tekrarlandı. Süpernatant atıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletilerek cDNA pelleti kurutuldu. Pelletin üzerine 4.5 µl TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH:8; 0.1 mM EDTA) eklenip pipetle karıştırıldı. BP rekombinasyonu için cDNA'ya 1 µl pDONR 222 (250 ng/ µl), 5X BP Clonase Reaction buffer, 3 µl BP Clonase

enzimi eklendi ve pipetlendi. Vektör ve cDNA'nın birleştirilmesi için 25°C'de 20 saat bekletildi. Örnek alındı, BP Colonase enzimini inaktif etmek için 2 µl Proteinaz K eklenip sırasıyla 37 °C'de 15 dakika, sonra 75°C'de 10 dakika bekletildi. Rekombinant cDNA'nın çökmesi için tekrar etanol çöktürmesi yapıldı ve 9 µl TE buffer eklendi. Vektör-cDNA, elektroporasyon işlemi için 1.5 µl'lik hacimlerde olacak biçimde tüplere ayrıldı. Her birinin üzerine 50 µl -80°C'de bekletilen E.coli DH10B kompetent hücrelerden eklendi ve CellJect Duo kullanılarak elektroporasyon yönteminden yararlanarak vektör-cDNA konakçı hücre içine alındı. Elde edilen cDNA klonları S.O.C mediumda 1 saat 37°C'de inkübe edildi ve üzerlerine freezing media eklenerek -80°C dolabında muhafaza edildi.

2.2.4 Kütüphanenin Karakterizasyonu

Elde edilen kütüphanelerden LB agar medium üzerinde bulaştırılan koloniler rastgele seçildi ve 70 µl S.O.B eklenen 384 kuyucuk içeren petrilere tek tek alındı. Üzerlerine 18 µl S.O.B freezing media eklendi ve -80°C'de saklandı.

Normal ve tümörlü klonlardan alkali lizis yöntemi ile plazmid DNA izole edildi. Kanamisin içeren sıvı LB'ye bulaştırılan klonlar tüm gece çalkalanacak şekilde 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ependorf tüplere alınıp 4°C'de 7000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi. Hücrelerin çökmesi sağlandıktan sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Kalan hücre pelleti üzerine 100 µl (5 ml 1M glukoz, 2,5 ml 1M Tris HCl, 2 ml 0.5 EDTA, dH₂O) eklendikten sonra kuvvetli bir şekilde vortekslendi. 1 µl RNaz ilave edildi ve 2 dakika buz üzerinde bekletildi. 200 ml (20 ml 1 m NaOH, 10 ml %10 SDS, dH₂O) eklendi, 2 dakika buz üzerinde bekletildi. 200 ml (20 ml 1 m NaOH, 10 ml %10 SDS, dH₂O) eklendi, tüpler karıştırıldı. Buz üzerinde 5 dakika bekletildi. Tekrar 150 ml (60 ml 5 M Potasyum asetat, 11,5 ml Glicial Asetik asit, 28,5 ml dH₂O) ilave edilerek vorteksle karıştırıldı. 4 dakika buz üzerinde bekletildi. 4°C'de 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant yeni ependorf tüplere alındı ve süpernatantın yarı hacmi kadar fenol, yarı hacmi kadar kloroform eklenip vortekslendi. +4°C'de 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi. Üstte kalan faz yeni tüplere alındı ve hacminin 1/10'u kadar 3 M Na-asetat, 2 katı kadar %100 etanol eklendi, ardından -20°C'de 1 saat bekletildi. +4°C'de

13.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Kalan pelletler üzerine %70 etanol eklendi ve +4 °C'de 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi ve üst faz atıldı. Alkol uçurulduktan sonra bütün tüplerde bulunan pelletlerin üzerine TE buffer eklenerek pipetle karıştırıldı. İnsört DNA varlığını belirlemek için %1 agaroz jel üzerinde 90 V'da 1 saat yürütüldü. İnsört büyüklüğünü belirlemek için DNA'lar Bsp1407I restriksiyon enzimi ile kesildi. Bunun için her µl DNA'ya 2 µl (1 hacim Bsp1470I, 3 hacim 10X Buffer Tango) eklenerek +37°C'de bir gece inkübe edildi. %1 lik agaroz jel üzerinde 90 V'da 1 saat yürütüldü.

2.2.5 Kütüphanelerin Dizin Analizine Gönderilmesi

Dizin analizine gönderilmek üzere, insört büyüklükleri ve kaliteleri tayin edilen 384 kuyucuktan oluşan, 3'ü normal diğer 3'ü tümörlü meme dokusuna ait toplam 6 plate dizin analizi için Arizona Eyalet Üniversitesi'ne gönderildi. Dizin analizleri ABI'da yapılarak, fasta formatında bize yollandı.

2.3 Programlar

2.3.1 Phred ve Phrap

Vektör dizilerinin uzaklaştırılması ve örtüşen dizilerin belirlenip birleştirilmesi (fragment assembly) gibi işlemler Phred ve Phrap adı verilen unix paket programları ile gerçekleştirildi. Programlar CYGWIN programı kullanılarak çalıştırılmıştır. Phred, EST analizinde kullanılır, vektör ve adaptör diziler ile düşük değerli diziler bu program ile uzaklaştırılır. Phrap programı da örtüşen dizilerin belirlenip birleştirilmesi işlemini sağlar. Phrap programının içinde "cross_match" adı verilen ek bir program bulunmaktadır. Bu program phred programı ile atılamayan vektörleri uzaklaştırır [75].

Dizin analizinden elde edilen FASTA formatındaki klonlardan düşük değerli olanlar Phred programı ile çıkarıldı ve ardından Phrap uygulanarak, çalışmada kullanılan vektör dizisi, cross-match uygulamasıyla EST dizilerinden silindi.

Bu çalışmada Phrap programı yerine daha güvenilir olduğu için CAP3 programı sonuçları tercih edilmiştir.

2.3.2 VecScreen

Bu program NCBI tarafından geliştirilmiştir ve EST dizilerinden vektör ya da adaptör gibi istenmeyen dizilerin uzaklaştırılıp uzaklaştırılmadığını kontrol etmek için kullanılan bir sistemdir. Dizi içerisinde kontaminasyon olması durumunda vektör dizisinin yerini ve karakterizasyonunu belirler [76].

2.3.3 CAP3

Phrap programının alternatifi olan CAP3, ön işleme aşaması gerçekleştirilmiş olan EST dizilerinin fragment eşleştirme işlemini yapar. Bu program CAP programının üçüncü nesli olduğundan CAP3 ismini almıştır. CAP3 programı Phrap programına göre daha güvenilir olup kullanımı daha kolaydır [77].

Phred ve Cross-match programları ile fragment birleştirme işlemine hazır hale getirilen normal ve tümörlü meme dokularına ait EST'lere CAP3 ve Phrap programları uygulandı, contigler oluşturuldu.

2.3.4 BEAP

CAP3 ve Phrap programları ile elde edilen contig dizilerinin kontrolü BEAP programı ile yapılmıştır. Bu programı oluşturan contiglerin EST içeriklerini ve bu EST'lerin örtüştüğü yerleri gösterir. Koltes ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu program CAP3 ve Phrap programları ile uyumludur.

Koltes ve arkadaşları (2009) tarafından geliştirilen bu program phrap ve CAP3 programları ile oluşturulan contig dizilerinin kontrolünde kullanılır. CAP3 programı ile oluşturulan “.ace” uzantılı dosyayı input olarak kullanır. Contiglerdeki örtüşen dizileri örtüştükleri yerleri ile birlikte gösterir [78].

2.3.5 BLAST2GO

BLAST2GO fonksiyonel analiz çalışmaları, gen ve protein dizilerinin analizini yapmak için kullanılan kapsamlı bir biyoinformatik aracıdır. Çalışmamızda elde edilen contig dizilerinin fonksiyonları hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak için kullanılmıştır.

2.4 BLAST Yöntemi ile Fonksiyonların Belirlenmesi

NCBI veri tabanı üzerinden kullanılan dizi bilgisi benzerlik sorgulamasıdır. NCBI BLAST programlarıyla diziler arasındaki benzerlikler bulunur ve olası fonksiyonlar tahmin edilir.

Elde ettiğimiz EST'ler için BLASTN analizi tek tek yapıldı. Otomatik olarak BLASTN analizini yapan BLAST2GO programı da kullanılarak çalışma desteklendi.

CAP3 programı ile oluşturulan contigler için BLASTN (nükleotid veritabanı araştırması), BLASTX (protein veritabanı araştırması) analizleri tek tek yapıldı. EST'lerin, contiglerin veritabanında kayıtlı olan dizilerle karşılaştırılması ile fonksiyonları hakkında tahmin yürütüldü [79].

3.1 Normal Meme Dokusundan Elde Edilen cDNA Kütüphanelerinin Karakterizasyon Sonuçları

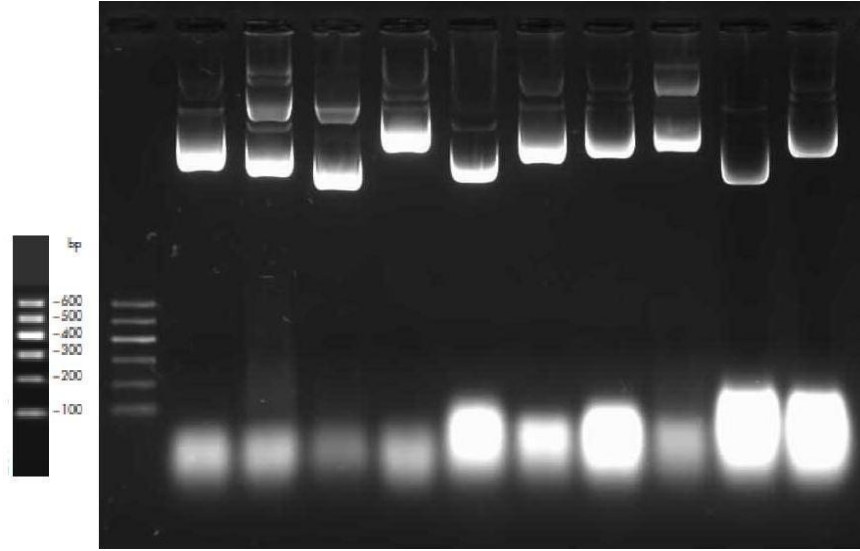
CloneMiner kiti ile normal ve tümörlü meme dokularına ait mRNA'dan oluşturulan cDNA kütüphanesi başarılı bir şekilde yapılmıştır. Bu cDNA kütüphanelerinin oluşturduğu klonların insört büyüklükleri ve nonrekombinant klon sayılarının belirlenebilmesi için kütüphanelerin karakterizasyonu yapılmıştır.

Normal meme dokusu cDNA kütüphanesinin yapılan titrasyon analizi ile klon sayısı $6,2 \times 10^4$ olarak belirlendi.

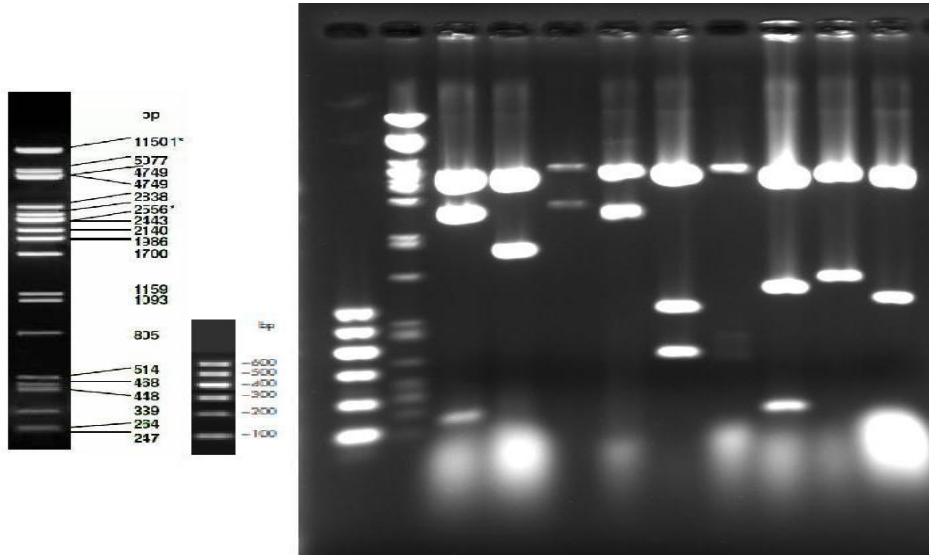
Normal meme dokusuna ait cDNA kütüphanesinden rastgele seçilmiş 48 klondan alkali lizis yöntemi ile plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmid DNA'lardan 7 tanesi nonrekombinanttır (%14,5'i nonrekombinant klon). Bsp1407I restriksiyon enzimi ile yapılan kesimlerin sonucunda insört büyüklüğü 380 baz çifti ile 1800 baz çifti arasında olup ortalama insört DNA büyüklüğü 0,845 kb olarak bulunmuştur.

Normal meme dokusu kütüphanesinden seçilen 1152 adet klon EST oluşturmak üzere dizin analizine gönderildi.

A)



B)

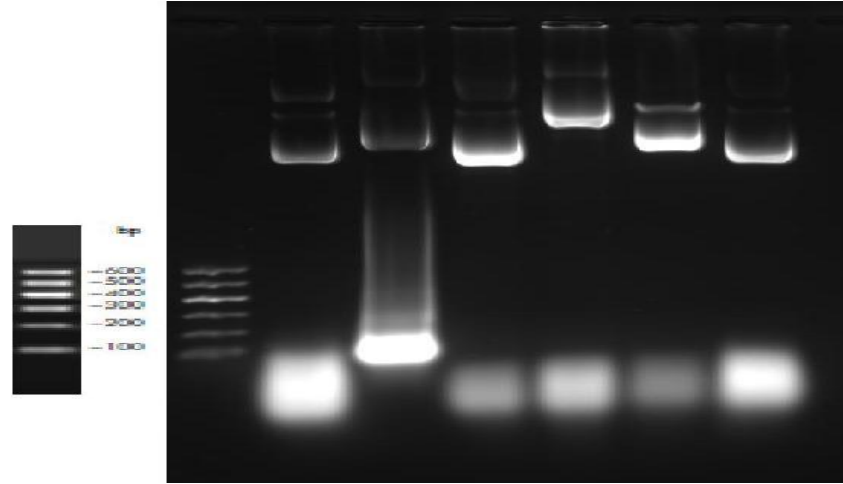


Şekil 3.1 Normal meme dokusu plazmid DNA'ların jelde görünümü A) Alkali lizis yöntemiyle plazmid DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA'lar B) Plazmid DNA'ların Bsp1407I restriksiyon enzimiyle kesimi

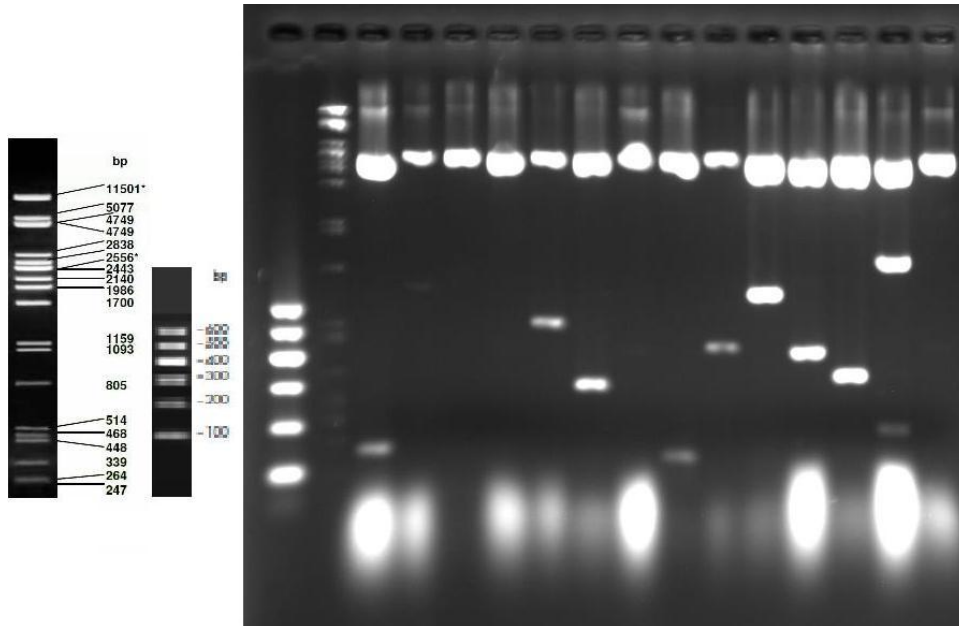
3.2 Tümörlü Meme Dokusundan Elde Edilen cDNA Kütüphanelerinin Karakterizasyon Sonuçları

Tümörlü meme dokusundan oluşturulan cDNA kütüphanesi yapılan titrasyon analizi ile $12,6 \times 10^4$ olarak belirlendi. Tümörlü cDNA kütüphanesine ait rastgele seçilmiş 48

klondan alkali lizis yöntemi ile plazmid DNA izolasyonu yapılmış ve bu plazmid DNA'lardan 12 tanesi nonrekombinant olarak belirlenmiştir (%25'i nonrekombinant klon). Plazmid DNA'lar Bsp1407I restriksiyon enzimiyle kesilerek insört DNA büyüklükleri 250 ile 1700 baz çifti arasında belirlendi. Ortalama insört DNA büyüklüğü 0,64 kb olarak hesaplandı. A)



B)



Şekil 3.2 Tümörlü meme dokusu plazmid DNA'ların jelde görünümü A) Alkali lizis yöntemiyle plazmid DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA'lar B) Plazmid DNA'ların Bsp1407I restriksiyon enzimiyle kesimi

3.3 Biyoinformatik Analizler

3.3.1 EST'lerin Hazırlanması ve Contig Oluşturulması

Dizin analizine 3'ü normal, 3'ü de tümörlü meme dokusuna ait 384'lük platelerden toplam 6 adet gönderildi. Dizin analizi sonucu, hazır olarak gelen FASTA formatındaki EST'lerden düşük kaliteli olanlar belirlendi ve çıkarıldı. Normal meme dokusuna ait 1118 EST ve tümörlü meme dokusuna ait 1150 EST için analizler yapıldı.

Phrap programında bulunan Cross-match programı ile vektör ve adaptör dizi kontaminasyonunu önlemek için EST'lerde bulunan vektör ve adaptör dizileri uzaklaştırıldı. EST'lerde vektör ve adaptör dizi kalıntısı olmadığından emin olmak için VecScreen programı kullanıldı.

EST dizilerinin özellikleri BLASTN analizi sonuçlarına göre incelendiğinde normal meme dokusuna ait en kısa EST'nin 432 bp, en uzun EST'nin ise 3715 bp olduğu görülmüştür. Normal meme dokusu EST'lerin ortalama bp uzunluğu 1225,83 olarak bulunmuştur. Tümörlü meme dokusu BLASTN sonuçlarına göre incelendiğinde en kısa EST dizisinin 124 bp, en uzun EST dizisinin 3646 bp, ortalama bp uzunluğunun ise 1265,16 bp olduğu hesaplanmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Normal ve tümörlü meme dokularına ait EST'lerin uzunluk değerleri

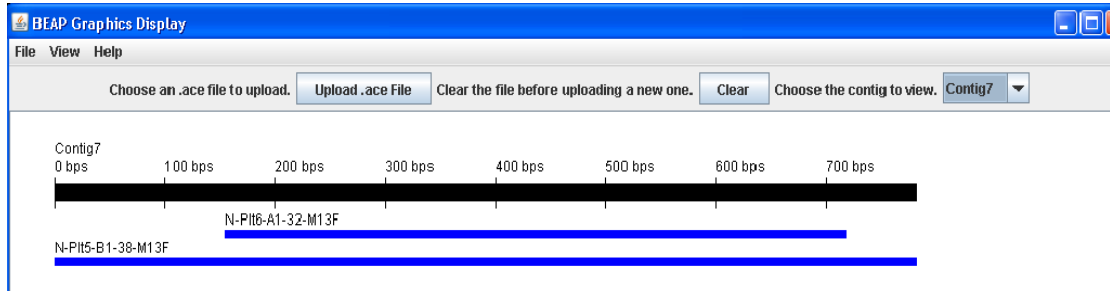
	EST Sayısı	En kısa EST (bp)	En uzun EST (bp)	Ortalama EST (bp)
Normal meme dokusu EST	1118	432	3715	1225,83
Tümörlü meme dokusu EST	1150	124	3646	1265,16

Vektör uzaklaştırma işlemi sonrasında EST fragmentlerinin CAP3 programı ile eşleştirme işlemi yapıldı. Bu program sayesinde EST'lerin birbirleriyle örtüşen kısımları belirlendi ve contig adı verilen birleşmiş diziler oluşturuldu. Ayrıca CAP3 programı ile contig oluşturmayan singlet (singleton) denilen bir dizi ile örtüşmeyen tek kalan diziler belirlendi. Normal meme dokusuna ait contiglerin sayısı 21 iken tümörlü meme dokusuna ait contig sayısı 24 olarak elde edildi. Normal meme dokusuna ait singlet sayısı 1102 iken tümörlü meme dokusuna ait singlet sayısı 1101'dir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 CAP3 programı ile elde edilen değerler

	Normal Meme Dokusu	Tümörlü meme dokusu
EST Sayısı	1118	1150
Contig Sayısı	21	24
Singlet Sayısı	1102	1101
En uzun Contig	1870	1527
En kısa Contig	510	582

CAP3 programı ile contigler oluşturulurken, BEAP programı hatalı örtüşmelerin ortaya çıkarılması için kullanıldı. CAP3 ile oluşturulan contigler BEAP programı ile kontrol edildi. Böylece contig dizilerini hangi EST dizilerinin oluşturduğu, EST'lerin örtüşme şekilleri BEAP programı ile tespit edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 BEAP programında CAP3 ile hazırlanan normal meme dokusuna ait contig 7'nin grafiği ve contigi meydana getiren EST'lerin örtüşme şekli

Bir başka contig oluşturma işlemini gerçekleştiren Phrap programı da kullanılarak örtüşen dizilerin belirlenip birleştirilmesi sağlandı. Phrap bir fragment eşleme programıdır ve çalışmamızda bu programla elde edilen contig sayısının CAP3 ile elde

edilen contig sayısından daha fazla olduğu belirlenmiştir. Phrap programına göre normal meme dokusuna ait contig sayısı 135 iken tümörlü meme dokusuna ait contig sayısı 175 olarak bulunmuştur (Çizelge 3.3).

CAP3 programının daha güvenilir olması nedeniyle çalışmamızda CAP3 programı ile oluşturulan contig dizileri kullanılmıştır.

Çizelge 3.3 Phrap programı ile elde edilen contiglerin sayıları

	Normal Meme Dokusu	Tümörlü Meme Dokusu
EST Sayısı	1118	1150
Contig Sayısı	135	175

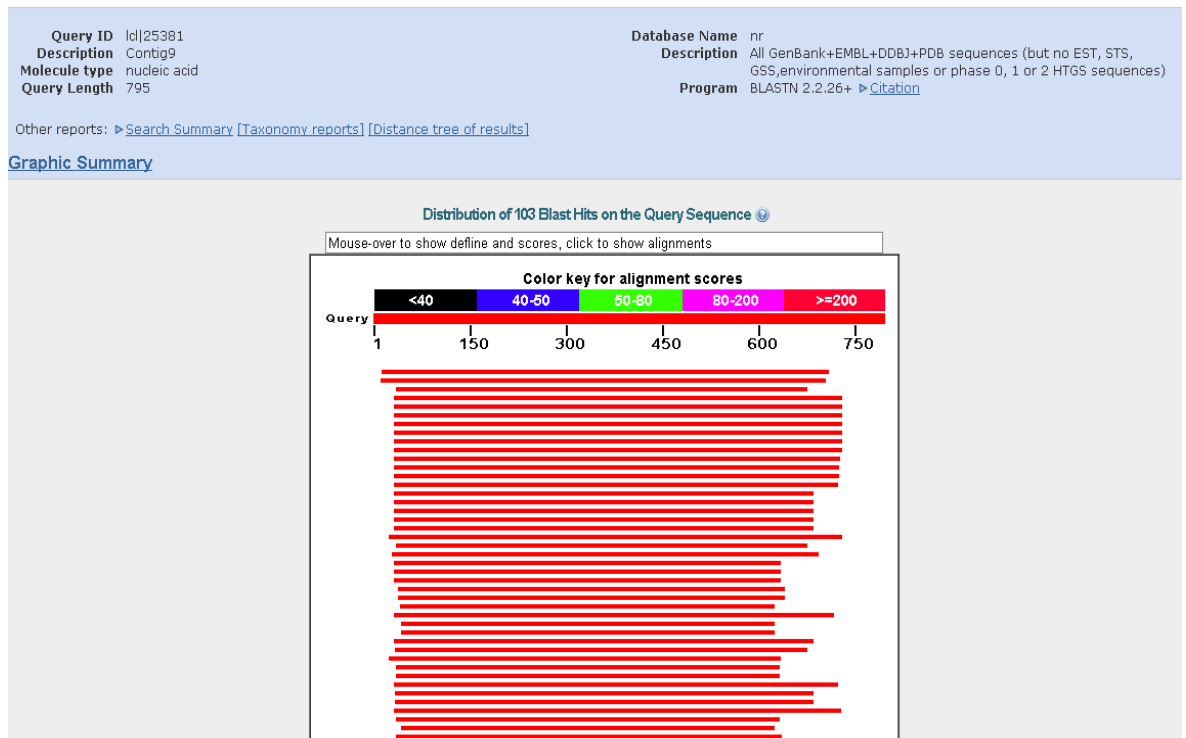
3.3.2 Blast Analizleri

GenBank veritabanında bulunan dizilere olan benzerliklerinin belirlenmesi ve olası fonksiyonlarının tahmin edilebilmesi için elde edilen EST ve contig dizileri BLAST programı ile incelendi. BLAST programı ile farklı organizmalarla olan benzerlikleri karşılaştırılabilir, böylece olası gen fonksiyonları bu yöntemle tahmin edilebilir. En çok kullanılan dizi benzerlik sorgulamasıdır.

NCBI web sitesinden yapılan BLASTN analizleri değerlendirilirken sonuç sayfasının 3 bölümden oluştuğu ve ilk bölümün EST dizisinin özelliği hakkındaki bilgilerden meydana geldiği görülür. İkinci bölüm, incelenen dizi ile benzerlik gösteren sekansları ve bu sekansların analiz sonuçlarını verir. Analiz sonuçlarında; veritabanındaki dizilerin tanınmasını sağlayan ve her dizi için farklı numaralar olan “Accession number”, benzerlik gösteren dizinin fonksiyonuna ve ait olduğu organizmaya ait bilgi “Description”, karşılaştırılan dizilerin bir pozisyonda aynı nükleotide sahip olma şansı olarak nitelendirilen “E-value”, karşılaştırılan dizilerin uzunluk anlamında ne derece birbirlerini kapsadıkları “Query Coverage”, birbirleri arasında benzerlik tespit edilen diziler arasındaki homolojinin derecesi “Maximum Identity” olarak belirtilir. Üçüncü bölümde ise benzerlikleri verilen dizilerin karşılaştırmalı olarak nükleotit düzeyinde benzerliklerini verir.

BLASTN ve BLASTX adı verilen veritabanı benzerlik araştırması, CAP3 programı ile elde edilen contigler için tek tek yapıldı. Bu çalışmada, normal ve tümörlü meme dokusuna ait EST dizilerinin BLASTN analizlerinde ve elde edilen contig dizilerinin BLASTN ve BLASTX analizlerinde veritabanındaki yüksek oranda benzerlik gösterenlerden muhtemel fonksiyon değerlendirilmesi yapılmıştır.

2268 EST dizisi için nükleotid veritabanı benzerlik araştırması olan BLASTN analizi tek tek yapıldı. Şekil 3.4 'te görüldüğü gibi normal meme dokusuna ait CAP3 programından elde edilen 9. Contigin NCBI web sitesinde BLASTN analizi sonucu incelendiğinde aşağıdaki veriler bulunmuştur.



A) Contig 9 ile benzeşen veritabanındaki nükleotid dizilerinin grafiksel gösterimi

Descriptions							
Legend for links to other resources: U UniGene E GEO G Gene S Structure M Map Viewer B PubChem BioAssay							
Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
XM_533590.3	PREDICTED: Canis lupus familiaris ribosomal protein S9 (RPS9)	1252	1252	87%	0.0	100%	GM
XM_002927959.1	PREDICTED: Ailuropoda melanoleuca 40S ribosomal protein S9	962	962	86%	0.0	91%	GM
HQ318015.1	Ailuropoda melanoleuca ribosomal protein S9 (RPS9) mRNA, c	881	881	80%	0.0	91%	
BC021072.1	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2961640, **** WARNING: c	875	875	87%	0.0	88%	M
BC007410.2	Homo sapiens ribosomal protein S9, mRNA (cDNA clone MGC: 875	875	875	87%	0.0	88%	UEGM
BC007434.2	Homo sapiens ribosomal protein S9, mRNA (cDNA clone MGC: 875	875	875	87%	0.0	88%	UEGM
NM_001013.3	Homo sapiens ribosomal protein S9 (RPS9), mRNA	875	875	87%	0.0	88%	UEGM
BC020462.1	Homo sapiens ribosomal protein S9, mRNA (cDNA clone IMAG 875	875	875	87%	0.0	88%	UEGM
XM_001082895.2	PREDICTED: Macaca mulatta ribosomal protein S9 (RPS9), m 870	870	870	87%	0.0	88%	UEGM
BC096756.1	Homo sapiens ribosomal protein S9, mRNA (cDNA clone MGC: 870	870	870	87%	0.0	88%	UEGM
BC007857.2	Homo sapiens ribosomal protein S9, mRNA (cDNA clone MGC: 868	868	868	87%	0.0	88%	UEGM
BC068055.1	Homo sapiens ribosomal protein S9, mRNA (cDNA clone MGC: 866	866	866	87%	0.0	88%	UEGM
BC071940.1	Homo sapiens ribosomal protein S9, mRNA (cDNA clone MGC: 866	866	866	87%	0.0	88%	UEGM
BC008082.1	Homo sapiens ribosomal protein S9, mRNA (cDNA clone MGC: 861	861	861	86%	0.0	88%	UEGM
XM_001174951.2	PREDICTED: Pan troglodytes ribosomal protein S9, transcript 848	848	848	82%	0.0	89%	GM
XM_003316662.1	PREDICTED: Pan troglodytes ribosomal protein S9 (RPS9), m 848	848	848	82%	0.0	89%	GM
XM_003339337.1	PREDICTED: Pan troglodytes ribosomal protein S9 (RPS9), m 848	848	848	82%	0.0	89%	GM
XM_001174942.2	PREDICTED: Pan troglodytes ribosomal protein S9, transcript 848	848	848	82%	0.0	89%	GM
XM_002829733.1	PREDICTED: Pongo abelii 40S ribosomal protein S9-like (LOC1 847	847	847	82%	0.0	89%	GM
AK391892.1	Sus scrofa mRNA, clone: HTMT10031D02, expressed in hypot 843	843	843	88%	0.0	87%	
XM_002762475.1	PREDICTED: Callithrix jacchus 40S ribosomal protein S9-like (843	843	843	80%	0.0	89%	GM
XM_001488024.3	PREDICTED: Equus caballus 40S ribosomal protein S9-like (LC 834	834	834	83%	0.0	88%	GM

B) Contig 9 ile benzeşen veritabanındaki nükleotid dizilerinin sayısal sonuçlarla benzerlik oranlarının listesi

Alignments

☐ Select All [Get selected sequences](#) [Distance tree of results](#)

>[ref|XM_533590.3|](#) **GM** PREDICTED: Canis lupus familiaris ribosomal protein S9 (RPS9), mRNA
Length=702

[GENE ID: 476387 RPS9](#) | ribosomal protein S9 [Canis lupus familiaris]

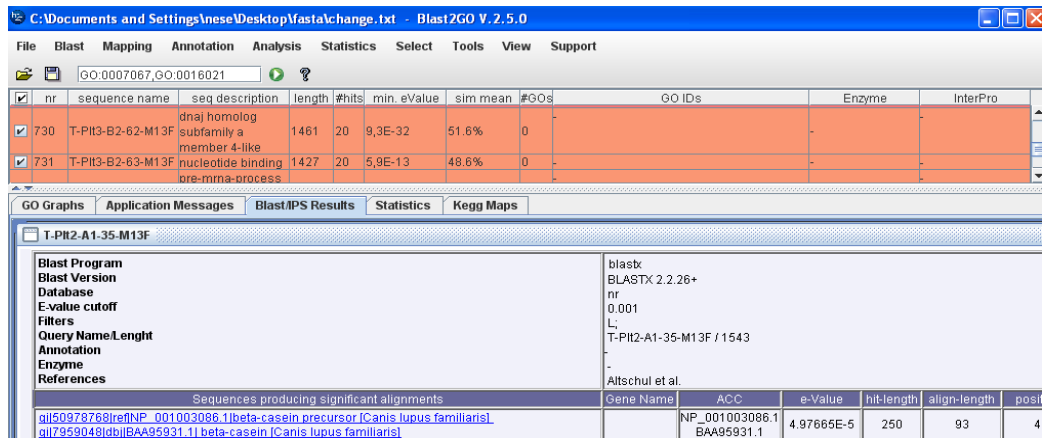
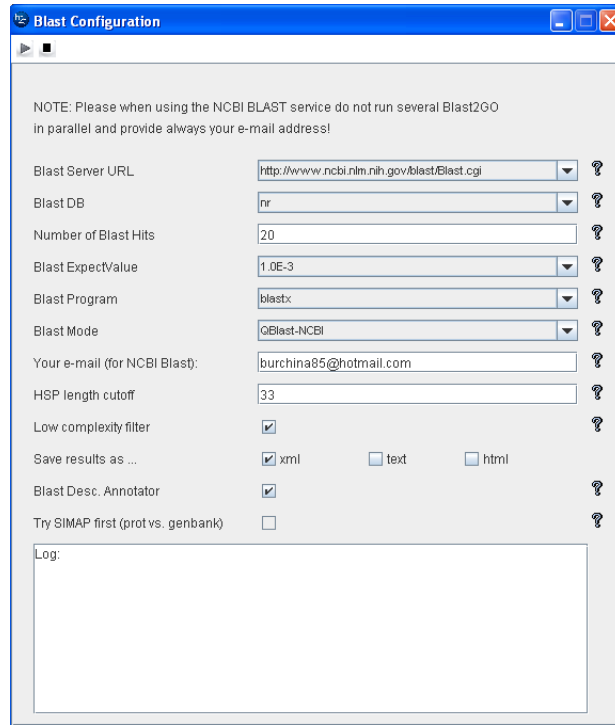
Score = 1252 bits (1388), Expect = 0.0
Identities = 694/694 (100%), Gaps = 0/694 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	16	GGAGCTCACGGCGGACGCGCGGAGCCAACATGCCAGTGGCCCGGAGCTGGGTGTGTCGTA	75
Sbjct	1	GGAGCTCACGGCGGACGCGCGGAGCCAACATGCCAGTGGCCCGGAGCTGGGTGTGTCGTA	60
Query	76	AGACTTATGTGACCCCTCGGAGGCCCTTCGAGAAGTCGCGCCTCGACCAGGAAGTGA	135
Sbjct	61	AGACTTATGTGACCCCTCGGAGGCCCTTCGAGAAGTCGCGCCTCGACCAGGAAGTGA	120
Query	136	TGATCGGCGAGTACGGGCTCCGGAACAAACGTGAGGCTCTGGAGGGTCAAGTTTACCTGG	195
Sbjct	121	TGATCGGCGAGTACGGGCTCCGGAACAAACGTGAGGCTCTGGAGGGTCAAGTTTACCTGG	180
Query	196	CCAAGATCCGCAAGGCCGCCCGGGAGCTGCTGACGCTGGACGAAAAGGACCCGCGGCC	255
Sbjct	181	CCAAGATCCGCAAGGCCGCCCGGGAGCTGCTGACGCTGGACGAAAAGGACCCGCGGCC	240
Query	256	TGTTCAAGGTAATGCCCTACTGCGCCGACTTGTACGCATCGGGGTGCTGGATGAGGGCA	315
Sbjct	241	TGTTCAAGGTAATGCCCTACTGCGCCGACTTGTACGCATCGGGGTGCTGGATGAGGGCA	300
Query	316	AAATGAAGTTGGATTACATTCTGGGCCTGAAGATCGAGGATTTCTTAGAGAGACGCCTGC	375
Sbjct	301	AAATGAAGTTGGATTACATTCTGGGCCTGAAGATCGAGGATTTCTTAGAGAGACGCCTGC	360

C) Contig 9 ile benzeşen veritabanındaki nükleotid dizilerinden en fazla benzerlik gösteren dizinin 9. contig ile alignmenti (eşleşmesi)

Şekil 3.4 CAP3 programı ile elde edilen normal meme dokusuna ait 9. contigin NCBI web sitesinde yapılan BLASTN analizi

Bu işleme ek olarak BLAST2GO adı verilen otomatik olarak BLAST analizi yapan bir programla da benzerlik araştırması yapıldı (Şekil 3.5). Tek tek yapılan BLAST çalışması ile otomatik olarak BLAST analizi yapan bu programın sonuçları arasında az sayıda da olsa farklılıklar görüldü.



Şekil 3.5 BLAST2GO programı ile yapılan dizi benzerlik sorgulaması

3.3.2.1 Normal Meme Dokusu EST ve Contiglerin BLAST Analizi Sonuçları

Normal meme dokusuna ait EST'lerin tek tek yapılan BLASTN sonuçlarına göre 1118 EST'den 59'u %95 ve üzerinde, 237 tanesi %80 ve üzerinde benzerlik göstermiştir (Çizelge 3.4). %60-79 arasında benzerlik gösteren EST sayısı 371 iken %40-59 arasında benzerlik gösteren EST sayısı 246'dır. %39 ve altında benzerlik gösteren 263'tür. EST'lerden bir tanesinin benzeştiği herhangi bir nükleotid dizisi bulunamamıştır

Çizelge 3.4 Genlerin BLASTN analizlerine göre %80 ve üzerinde homoloji gösteren EST'lerdeki bulunma sayısı ve oranı

%80 ve üzeri homoloji gösterenler	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma sayısı	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma oranı
Ribosomal protein	20	%8,43
Elongation factor (EF)	9	%3,79
Ubiquitin Coiled-coil protein Myosin Growth Factor Keratin	4	%1,68
Selenoprotein Cathepsin Transcription Factor Vimentin Annexin Transmembran protein Kinase anchor protein	3	%1,26
Extracellular matrix protein Kinase anchor protein Cytochrome Zinc finger protein Serine Proteasome subunit alpha	2	%0,84

Çizelge 3.4'ün devamı

%80 ve üzeri homoloji gösterenler	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma sayısı	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma oranı
Casein Beta Casein Cappa Collagen Heat shock protein Actinin Archain Vinculin Catenin GTPase activating protein Metallopeptidase <i>Ras</i> supressor protein Myotilin Calpain Myozenin DNA-binding protein GTP-binding protein Domain binding protein Thymosin Hippocalcin Wings apart like protein	1	%0,42

Çizelge 3.4'ün devamı

%80 ve üzeri homoloji gösterenler	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma sayısı	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma oranı
Serine peptidase inhibitor Septin Histone deacetylase Neuropilin Reticulocalbin Phospholipase-C Enolase Calsequestrin Syntabulin Ribonucleoprotein Neuron specific protein Gelsolin Rap guanine Adaptor-related protein Cyclin-dependent kinase inhibitor Electron-transfer flavoprotein Glumate dehydrogenase Nuclearribonucleoprotein Calcium binding protein Domain binding protein Translocation protein	1	%0,42

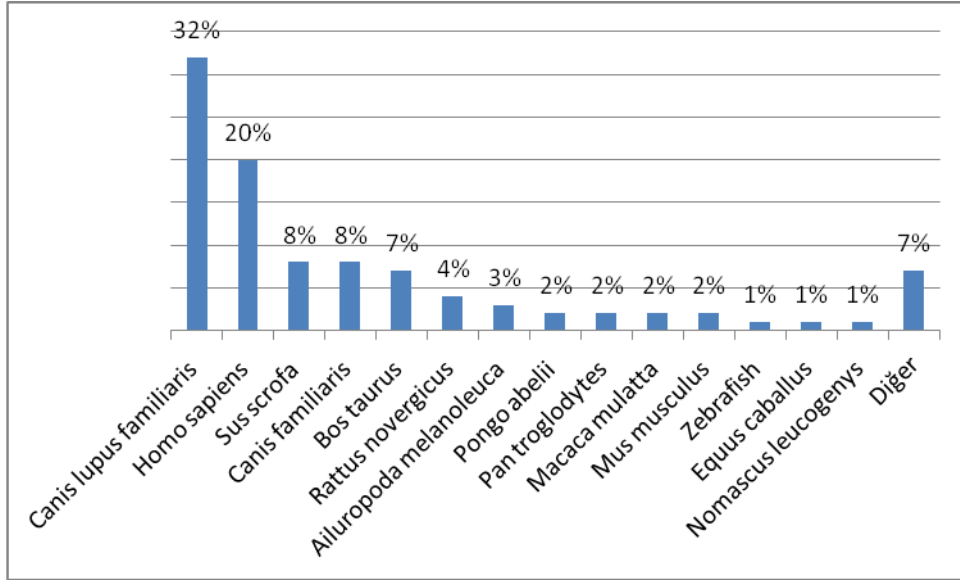
Çizelge 3.4'ün devamı

%80 ve üzeri homoloji gösteren maddeler	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma sayısı	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma oranı
Oxysterol binding protein LANCL1 TENC1 Unactive progesterone receptor Phytanoyl-CoA hydroxylase precursor Immunoglobulin gamma heavy chain Immunoglobulin lambda locus Nucleophosmin Phosphate carrier protein Hormone receptor interactor Adenozin difosfat Interacting protein Prothymosin Ribonuclease inhibitor Acidic ribosomal phosphoprotein Methionine adenosyltransferase II Cytoplasmic dynein Arrestin Sorting nexin Procollagen C	1	%0,42

Çizelge 3.4'te de görüldüğü gibi, %80 ve üzerindeki oranlarda bulunan 237 EST'den en çok homolojiyi gösteren 20 EST (%8,43) ile ribozomların alt birimlerini oluşturan ve protein sentezinde görev alan "ribozomal protein" 'dir. 9 EST (%3,79) protein sentezi sırasında peptid zincirinin uzamasını sağlayan proteinler olan "uzama faktörü (elongation factor, translation, initiation factor)" olarak belirlenmiştir. Aynı şekilde %80 ve üzerinde benzerlik gösteren maddelerden yüksek oranda korunmuş ve proteolizis olayında etkin, nüklear ve sitoplazmik protein olan "ubiquitin" [80], gen ekspresyonu gibi önemli biyolojik fonksiyonlarda yer alan "coiled-coil protein", motor proteinleri ailesinden kasılma faaliyetlerinde görev alan "miyozin" [81], hücrenin büyümesini, farklılaşmasını, çoğalmasını teşvik eden "büyüme faktörü (growth factor)", sert vücut yapılarını oluşturan lifli protein "keratin" %1,68 oranında (4 EST) bulunmaktadır.

%80 ve üzerinde homoloji gösteren genlerin %1,26'sını oluşturan diğer maddeler; hücre iskeletinin yapısında bulunan ara filaman protein olan ve insanda epitelyum hücre migrasyonuna neden olan "vimentin", kalsiyum aracılığıyla fosfolipid membranlara bağlanan hücresel proteinlerden "annexin", proteinlerin parçalanmasında görevli "cathepsin", gen ekspresyonu için gerekli olan "transkripsiyon faktörü (transcription factor) ", membranın bir tarafından diğer tarafına geçen, madde taşıyan, hücreye destek olan "transmembran protein", hücrelerde bulunan "selenoprotein" ve "kinase anchor protein" olarak analiz edilmiştir.

Proteinogenik aminoasitlerden olan "serine", protein transkripsiyonunda görev alan "zinc finger protein", hücreleri destekleyen, hücrenin göçünü ve proliferasyonunu düzenleyen "ECM protein", elektron transferini sağlayan "sitokrom (cytochrome)", "proteasome subunit alpha", "kinaz anchor protein" %0,84 olarak tespit edilmiştir. %0,42 oranında benzerlik gösterenlerin bir kısmı ise Çizelge 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.6 Normal meme dokusuna ait EST'lerin GenBank'taki organizmalara benzerlik oranı

BLASTN analizlerine göre normal meme dokusu EST'lerinin göstermiş olduğu türler çeşitlilik arz eder. 1118 EST'den en çok *Canis lupus familiaris* alt türü benzerlik göstermiştir. Bu analiz sonuçlarından en çok benzeyenler; *Canis lupus familiaris* 353 EST (%32), *Homo sapiens* 215 EST (%20), *Sus scrofa* 90 EST (%8), *Canis familiaris* 85 EST (%8), *Bos taurus* 74 EST (%7), *Rattus novergicus* 45 EST (%4), *Ailuropoda melanoleuca* 34 EST (%3), *Pongo abelii* 27 EST (%2), *Pan troglodytes* 21 EST (%2), *Macaca mulatta* 20 EST (%2), *Mus musculus* 19 EST (%2), *Zebrafish* 17 EST (%1), *Equus caballus* 16 EST (%1), *Nomascus leucogenys* 15 EST (%1) ve %7 EST de diğer organizmalara ait olacak şekildedir.

Normal meme dokusuna ait EST dizilerinin BLAST analizleri dışında EST'lerden CAP3 programıyla elde edilen contiglerin BLASTN ve BLASTX analizleri tek tek yapıldı. Contiglerin BLASTN analizi sonuçları Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5 Normal meme dokusuna ait contiglerin BLASTN analizi sonuçları

Contig Number	Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident
Contig 1	XM_002720500.1	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus gelsolin, transcript variant 4 (LOC100337841), mRNA	73%	0	86%
Contig 2	AM711902.1	Canis lupus lupus complete mitochondrial genome	56%	0	99%
Contig 3	XM_858046.2	PREDICTED: Canis lupus familiaris troponin T type 3 (skeletal, fast), transcript variant 4 (TNNT3), mRNA	60%	0	96%
Contig 4	NG_010157.1	Homo sapiens ribosomal protein S27a pseudogene 16 (RPS27AP16) on chromosome 16	63%	0	90%
Contig 5	BC005391.1	Homo sapiens ribosomal protein SA, mRNA (cDNA clone MGC:12521 IMAGE:3997019), complete cds	69%	0	92%
Contig 6	AL136981.22	Human DNA sequence from clone RP11-526D8 on chromosome 9 Contains the 5' end of the gene for coiled-coil protein (BICD2) (KIAA0699), a novel gene, a eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein) (EEF1D) pseudogene, the gene for a novel KRAB box-containing C2H2 type zinc finger protein, a novel gene, a pseudogene similar to part of sorting nexin associated golgi protein 1 (SNAG1), a novel pseudogene, a melanoma antigen pseudogene and three CpG islands, complete sequence	88%	2,00E-85	72%
Contig 7	BC013016.2	Homo sapiens ribosomal protein L19, mRNA (cDNA clone MGC:4526 IMAGE:3010178), complete cds	90%	0	89%
Contig 8	XM_003432509.1	PREDICTED: Canis lupus familiaris thymosin beta-4-like (LOC100683370), mRNA	59%	0	100%
Contig 9	NG_030525.2	Canis lupus familiaris 60S ribosomal protein L7 pseudogene (LOC480813) on chromosome 21	86%	0	97%
Contig 10	JF342880.1	Canis lupus familiaris haplotype HV1 A167* mitochondrion, partial genome	87%	0	100%

Çizelge 3.5'in devamı

Contig 11	NG_030489.2	Canis lupus familiaris 60S ribosomal protein L10a pseudogene (LOC474656) on chromosome 11	66%	0	99%
Contig 12	BC001748.1	Homo sapiens annexin A2, mRNA (cDNA clone IMAGE:3535154)	31%	3,00E-151	98%
Contig 13	NM_001168402.1	Equus caballus selenoprotein M (SELM), mRNA	62%	0	84%
Contig 14	XR_134421.1	PREDICTED: Canis lupus familiaris uncharacterized LOC100688685 (LOC100688685), miscRNA	45%	0	99%
Contig 15	BC105292.1	Homo sapiens ribosomal protein S15a, mRNA (cDNA clone MGC:111208 IMAGE:6649512), complete cds	95%	0	94%
Contig 16	NM_001003173.1	Canis lupus familiaris metallothionein 1E (MT1E), mRNA >dbj D84397.2 Canis lupus familiaris mRNA for metallothionein-1, complete cds	48%	0	99%
Contig 17	NG_030505.2	Canis lupus familiaris 40S ribosomal protein S6 pseudogene (LOC475434) on chromosome 15	72%	0	96%
Contig 18	NM_001243145.1	Equus caballus vimentin (VIM), mRNA	69%	0	94%
Contig 19	AB209021.1	Homo sapiens mRNA for BM-010 variant protein	72%	0	94%
Contig 20	XM_533061.3	PREDICTED: Canis lupus familiaris protein S100-A11-like (LOC475852), mRNA	63%	0	100%
Contig 21	BC010182.2	Homo sapiens ribosomal protein L28, mRNA (cDNA clone MGC:20328 IMAGE:4301420), complete cds	53%	8,00E-175	88%

BLASTN analizine göre elde edilen 21 contigten 8 tanesi “ribozomal protein” ile benzerlik göstermektedir. Contig 1 aktin bağlayıcı protein olarak bilinen “gelsolin”, contig 2 “mitokondriyal genom”, contig 3 çizgili kasın ince filamalarını düzenleyen ve kasın kasılmasında görev yapan “troponin T” [83], contig 6 “coiled-coil protein”, contig 8 “thymosin beta-4”, contig 10 insan mitokondriyal DNA’nın bölgelerinden olan “haplotype HV1”, contig 12 “annexin”, contig 13 “selenoprotein”, contig 14

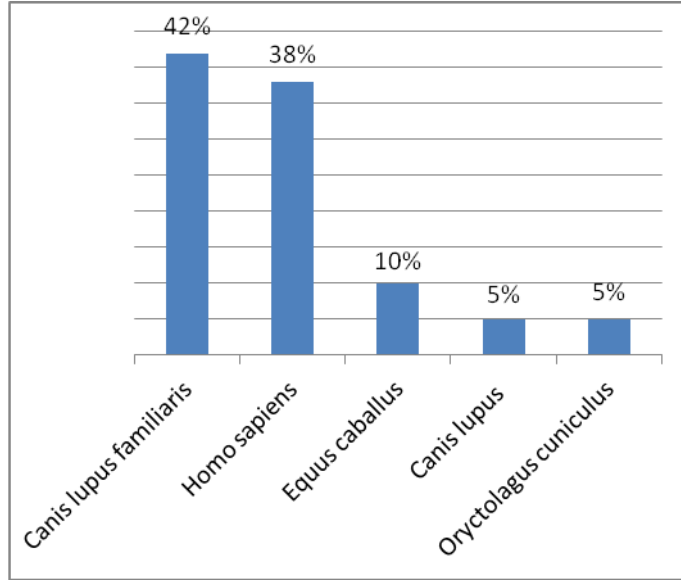
“unchacterized miscRNA”, contig 16 sık rastlanan metalloproteinlerden “metallothionein 1E”, contig 18 “vimentin”, contig 19 “variant protein” olarak kaydedilmiştir.

Çizelge 3.6’da contiglerin bp uzunlukları ve kaç tane EST’den meydana geldikleri gösterilmektedir.

Çizelge 3.6 Normal meme dokusuna ait, CAP3 programı ile oluşturulan contiglerin bp uzunlukları ve oluşturduğu EST sayısı

Contig No	Contig bp	EST sayısı
1	1870	2
2	1359	4
3	1585	2
4	910	2
5	1489	4
6	728	3
7	783	2
8	1059	2
9	971	2
10	920	2
11	1095	2
12	1409	2
13	1114	2
14	1262	4
15	510	2
16	899	2
17	1153	2
18	1379	2
19	998	2
20	884	2
21	934	3

Yapılan BLASTN analizlerine göre normal meme dokusundan elde edilen contiglerin %42’si *Canis lupus familiaris*, %38’i *Homo sapiens*, %10’u *Equus caballus*, %5’i *Canis lupus* ve %5’i *Oryctolagus cuniculus* şeklindedir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 Normal meme dokusuna ait contiglerin BLASTN sonuçlarına göre GenBank'ta bulunan organizmalarla olan benzerliği

Normal meme dokusuna ait contiglerin veri tabanında BLASTX analizi de yapıldı ve böylece protein veritabanlarındaki dizilerin homologları aranarak daha spesifik bilgiler elde edildi (Çizelge 3.7). Contiglerin BLASTX analizi sonuçlarında 7 tane contigin ribozomların alt birimlerini oluşturan “ribozomal protein”, 2 contigin varsayımsal bir protein olan “hypothetical protein” ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Ayrıca 1. contig aktin bağlayıcı proteinlerden olan “gelsolin” ile , 18. contig ara filaman protein olan ve hücre iskeletinin yapısında bulunan “vimentin” ile ve 16. contigin “noradrenaline induced gene” olarak bilinen “HLC” ile benzerliği analiz edilmiştir. Diğer benzerlik gösterenler ise “sitokrom C oksidaz subunit III”, iskelet kasları yapısına katılan “troponin T”, proteolizis olayında görevli “ubiquitin”, “thymosin beta-4” ATP sentezinde görevli enzim “ATP sentaz” şeklindedir.

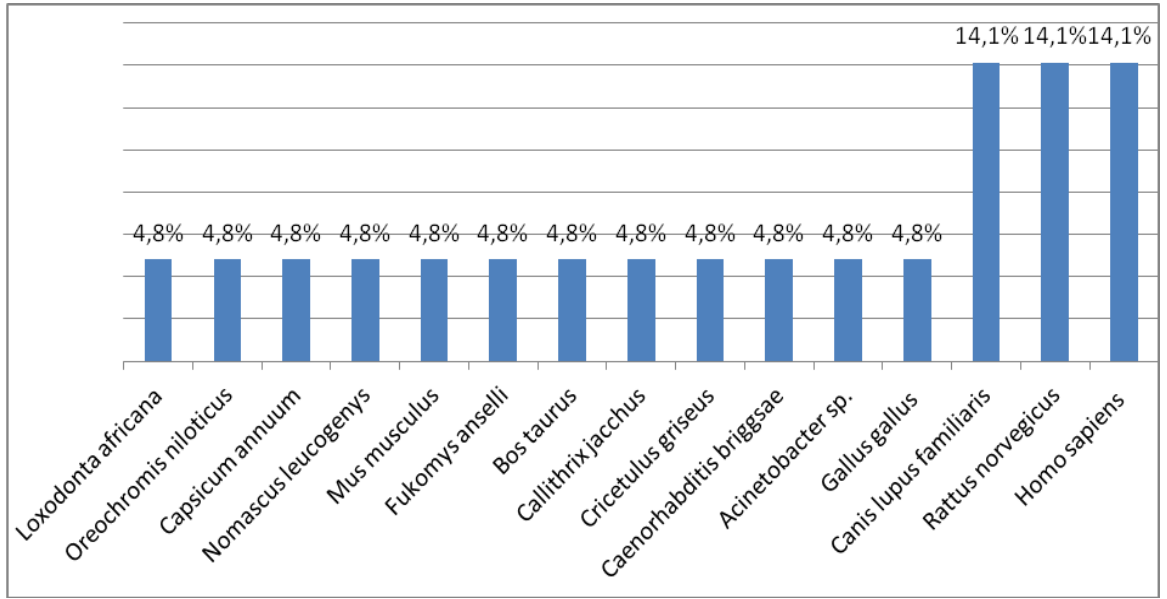
Çizelge 3.7 Normal meme dokusuna ait contiglerin BLASTX analizi sonuçları

Contig Number	Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident
Contig 1	XP_003440148.1	PREDICTED: gelsolin [Oreochromis niloticus]	74%	0	65%
Contig 2	ABY80569.1	cytochrome c oxidase subunit III [Canis lupus familiaris] >gb ACE01575.1 cytochrome c oxidase subunit III [Canis lupus familiaris] >gb ACE02355.1 cytochrome c oxidase subunit III [Canis lupus familiaris]	56%	9,00E-145	92%
Contig 3	BAB92981.1	troponin T fast skeletal muscle type [Bos taurus]	41%	2,00E-78	97%
Contig 4	ABK42077.1	ubiquitin extension protein [Capsicum annuum]	56%	2,00E-66	80%
Contig 5	XP_003260037.1	PREDICTED: 40S ribosomal protein SA-like [Nomascus leucogenys]	62%	0	97%
Contig 6	BAA87885.1	unnamed protein product [Mus musculus]	37%	0.003	37%
Contig 7	BAD96802.1	ribosomal protein L19 variant [Homo sapiens]	54%	6,00E-83	100%
Contig 8	XP_002762666.1	PREDICTED: thymosin beta-4-like isoform 1 [Callithrix jacchus]	18%	2,00E-21	80%
Contig 9	NP_001239156.1	60S ribosomal protein L7 [Canis lupus familiaris]	71%	7,00E-152	100%
Contig 10	ABY79879.1	ATP synthase FO subunit 6 [Canis lupus familiaris]	73%	2,00E-88	94%
Contig 11	EGV96251.1	60S ribosomal protein L10a [Cricetulus griseus]	62%	4,00E-112	86%
Contig 12	BAG60240.1	unnamed protein product [Homo sapiens]	8%	3,00E-16	100%
Contig 13	XP_002635077.1	Hypothetical protein CBG11292 [Caenorhabditis briggsae]	43%	0,51	35%
Contig 14	ZP_09145319.1	hypothetical protein AP8-3_18522, partial [Acinetobacter sp. P8-3-8]	13%	1,2	44%
Contig 15	XP_003642170.1	PREDICTED: 40S ribosomal protein S15a [Gallus gallus]	83%	4,00E-88	92%
Contig 16	AAP32010.1	HLC [Rattus sp.]	19%	2,00E-05	46%

Çizelge 3.7'nin devamı

Contig 17	XP_003407709.1	PREDICTED: 40S ribosomal protein S6-like [Loxodonta africana]	68%	1,00E-142	93%
Contig 18	ADP20549.1	vimentin [Fukomys anselli]	45%	7,00E-134	98%
Contig 19	EAW78327.1	hCG16521, isoform CRA_a [Homo sapiens]	19%	9,00E-11	68%
Contig 20	XP_002728017.1	PREDICTED: protein S100-A11-like [Rattus norvegicus]	48%	2,00E-39	58%
Contig 21	XP_002725071.1	PREDICTED: ribosomal protein L28-like [Rattus norvegicus] >ref XP_001073240.2 PREDICTED: ribosomal protein L28-like [Rattus norvegicus]	46%	1,00E-64	83%

Normal meme dokusu contiglerinin BLASTX analizlerinde, contiglerin *Loxodonta africana*, *Oreochromis niloticus*, *Capsicum annuum*, *Nomascus leucogenys*, *Mus musculus*, *Fukomys anselli*, *Bos taurus*, *Callithrix jacchus*, *Cricetulus griseus*, *Caenorhabditis briggsae*, *Acinetobacter sp.*, *Gallus gallus* türlerine %4,8 oranında ve *Canis lupus familiaris*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens* türlerine %14,1 oranında benzerlik göstermektedir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Normal meme dokusuna ait contiglerin BLASTX sonuçlarına göre GenBank'ta bulunan organizmalarla olan benzerliği

3.3.2.2 Tümörlü meme dokusu EST ve Contiglerin BLAST Analizi

Tümörlü meme dokusuna ait 1150 EST'nin BLASTN analizi yapılmıştır. Bu analize göre veritabanındaki organizmaların bilinen nükleotid dizilerine %95 ve üzerinde benzerlik gösteren 67 EST, %80 ve üzerinde benzerlik gösteren 199 EST bulunmaktadır. %60-79 arasında homoloji gösteren 248 EST, %40-59 arasında 245 EST, %39 ve altında ise 458 EST vardır.

Çizelge 3.8'de genlerin %80 ve üzerinde benzerlik gösteren EST sayıları ve bulunma oranları verilmiştir.

Çizelge 3.8 Genlerin BLASTN analizlerine göre %80 ve üzerinde homoloji gösteren EST'lerdeki bulunma sayısı ve oranı

%80 ve üzeri homoloji gösteren maddeler	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma sayısı	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma oranı
Ribosomal protein	22	11,06%
Casein	8	4,02%
Elongation factor (Traslation, iniation factor)	5	2,51%
Zinc finger protein	4	2,01%
Ubiquitin	3	1,51%
Proteasome Guanine nucleotid binding protein Lipopolysaccharide binding protein Guanosine monophosphate Protein kinase subunit gamma-2 ATP synthase Wilms tumor 1 associated protein Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein BAC clone Cullin	2	1,01%
Immunoglobulin Coiled-coil Homo sapiens lung cancer oncogene 7 Ras p21 protein activator Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme(TACE) Sarcospan (<i>Kras</i> oncogene-associated gene	1	0,50%

Çizelge 3.8'in devamı

%80 ve üzeri homoloji gösteren maddeler	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma sayısı	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma oranı
Leydig cell tumor Clustrin Mammary-serum amyloid Thymopietin Cathepsin Lectin Chemokine Glycogen Catenin (Cadherin) ADAM metallopeptidase Nucleoporin Glutathione peroxidase Zinc transporter Jun gene Multiple epidermal growth factor Tyrosine phosphatase Lactotransferrin Protein phosphatase-2 Lysyl oxidase	1	0,50%

Çizelge 3.8'in devamı

%80 ve üzeri homoloji gösteren maddeler	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma sayısı	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma oranı
Cation-dependent mannose Calmodulin Inositol-trisphosphate-3 Nucleosomal binding protein Transaldolase 1 (TALDO1) Valyl-tRNA synthetase Oxysterol binding protein Mitogen-activated protein kinase UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine Matrix metalloproteinase Mucin 15 Photomorphogenic homolog subunit 2 Butyrylcholinesterase (BCHE) Mitogen-activated kinase GTPase MHC I antigen MHC II NSA2 ribosome biogenesis Transcription factor Latent transforming growth factor beta binding protein 3 Nuclear protein Inhibitor of growth family Glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1)	1	0,50%

Çizelge 3.8'in devamı

%80 ve üzeri homoloji gösteren maddeler	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma sayısı	Genlerin %80 ve üzeri benzeşen EST'lerde bulunma oranı
Junction plakoglobin (JUP) HtrA serine peptidase GBGT1 Pyruvate dehydrogenase kinase Splicing factor proline/glutamine rich ATP-binding cassette G protein-coupled receptor kinase RELT-like protein 1 (RELL1) Activating signal cointegrator Insulin like growth factor (IGF) Haplotype HV1 Speckle type POZ protein F-box protein Aging associated protein Solute carrier Secretory leukocyte peptidase inhibitor Cytochrome C oxidase subunit Aldehyde dehydrogenase 1	1	0,50%

BLASTN analiz sonuçlarına göre tümörlü meme dokusuna ait 1150 EST'den elde edilen verilerde, %80 ve üzerinde homoloji gösteren EST'lerden "ribozomal protein" %11,06 oranında bulunmaktadır, %95 ve üzerinde benzeşen EST'ler ele alındığında bu oran %11,94 olarak hesaplanmıştır. %80 ve üzerinde benzerlik gösteren maddelerden süt proteini olan "kasein" %4,02, translasyon faktörlerinden "uzama faktörü (elongation factor, translation, iniation factor)" %2,51, "zinc finger protein" %2,01, "ubiquitin" %1,51 oranında bulunmaktadır. Her biri %1,01 oranında olmak üzere; gerekli olmayan ya da hasar görmüş proteinlerin degrade olmasını sağlayan "proteozom", sinyal yollarında, protein transdüksiyonu, büyüme regülasyonu ve polipeptid zinciri uzaması gibi hücrel olaylarda görevli "guanin nükleotid bağlayıcı protein", gram negatif bakterileri enfeksiyonlarına immünolojik cevapta etkin "lipopolisakkarid bağlayıcı protein", RNA'da monomer olarak bulunan nükleotid "guanozin monofosfat", hücre içindeki enerji ihtiyacına cevap veren ve mutasyonu Parkinson hastalığı ile bağlantılı olan "protein kinaz subunit gamma-2", hücre için gerekli enerjinin sağlanmasında kullanılan enzim "ATP sentaz", hücrel genlerin transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel regülasyonunda ve çeşitli kanser tiplerinin gelişiminde rol oynayan "Wilms tumor 1 associated protein", ubiquitin ligazların yapısını oluşturan hidrofobik proteinlerden "cullin" ve "heterogeneous nükleoprotein" %80 ve üzerinde homoloji göstermiştir.

Savunma sisteminde görevli "immünoglobulin", gen ekspresyonunda yer alan "coiled-coil", "insan akciğer kanseri onkogeni 7", mutasyonu kansere neden olan "Ras p21 protein aktivatörü", monositlerden salgılanan kanserli hücrelerin yıkımında önemli rol oynayan "tümör nekroz faktör-alpha" ve "sarkospan (*Kras* oncogene-associated gene)", "clustrin", "mammary serum amyloid", "thymopietin", "cathepsin", "lectin", "kemokin", "catenin (cadherin)", "ADAM metallopeptidaz" gibi faktörler %80 ve üzerinde homoloji gösterenler içinde %0,50 oranında bulunmaktadırlar (Çizelge 3.8).

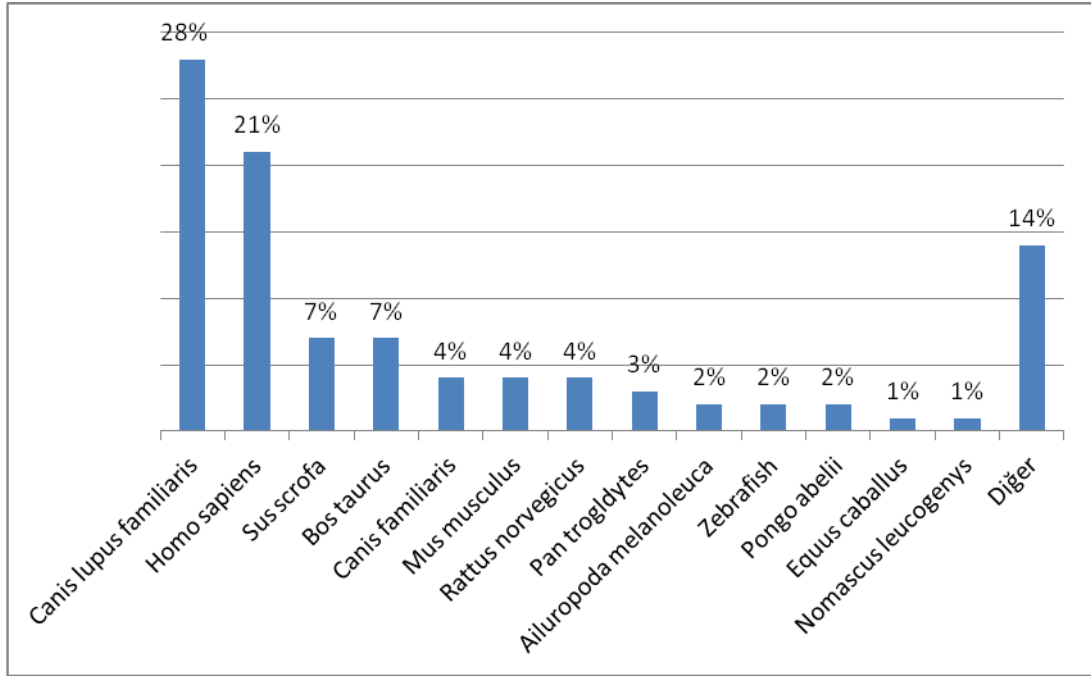
CAP3 programı ile oluşturulan contiglerde hangi EST dizilerinin bulunduğunu ortaya çıkarmak için kullanılan BEAP programı ile EST dizilerinin örtüşme biçimi tespit edildi.

Çizelge 3.9 Tümörlü meme dokusuna ait, CAP3 programı ile oluşturulan contiglerin bp uzunlukları ve oluşturdukları EST sayıları

Contig No	Contig bp	EST sayısı
1	1217	2
2	1446	2
3	962	3
4	1027	2
5	883	2
6	1091	4
7	1067	2
8	1152	2
9	795	2
10	1298	2
11	1232	2
12	982	2
13	655	2
14	1103	2
15	945	2
16	944	2
17	1419	2
18	1522	2
19	1190	2
20	1192	2
21	1182	2
22	582	2
23	1527	2
24	1118	2

Tümörlü meme dokusu EST'lerinin yapılan BLASTN analizlerine göre; 1150 EST'nin %28'i *Canis lupus familiaris*, %21'i *Homo sapiens*, %7'si *Sus scrofa*, %7'si *Bos taurus*, %4'ü *Canis familiaris*, %4'ü *Mus musculus*, %4'ü *Rattus norvegicus*, %3'ü *Pan troglodytes*, %2'si *Ailuropoda melanoleuca*, %2'si *Zebrafish*, %2'si *Pongo abelii*, %1'i *Equus caballus*, %1'i *Nomascus leucogenys* ile benzerlik göstermektedir (Şekil 3.9). Bu analizlerde *Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, *Felis catus* türleri ile benzerlik

gösteren diziler de vardır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9 Tümörlü meme dokusuna ait EST'lerin GenBank'taki organizmalara benzerlik oranı

Tümörlü meme dokusuna ait contiglerin BLASTN analizi sonuçlarına göre contiglerin homoloji gösterdiği fonksiyonlar incelenmiştir. Buna göre contig 1, contig 2, contig 3, contig 4, contig 13, contig 21 “ribozomal protein” ile benzerlik göstermektedir. Contig 5 “BAC clone”, contig 6 “İnsan DNA dizilimi”, contig 7 “protein kinaz”, contig 8 insan mitokondriyal DNA bölgesi olan “haplotype HV1”, contig 10 primer süt proteinlerinden “beta-kasein”, contig 11 immünolojik savunmada görev alan “lipopolisakkarit bağlayıcı protein”, contig 12 hücre yüzey reseptörlerinden gelen eksternal sinyallerin hücre içi moleküllere iletiminde rol oynayan “guanin nükleotid bağlayıcı protein” [81], contig 14 insan cDNA’sı, contig 16 tümör hücreleri tarafından up-regülasyona uğradığında, var olan tümörlerin metastazını arttıran “lysyl oksidaz”, contig 19 insana ait “PAC clone”, contig 20 sinyal molekülü redüktazı “guanozin monofosfat redüktaz 2”, contig 22 “ORF (open reading frame)”, contig 23 farklılaşmış ekspresyonu tümör ilerlemesine neden olabilen “secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI)” ile homoloji gösterir (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10 Tümörlü meme dokusuna ait contiglerin BLASTN analizi sonuçları

Contig Number	Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident
Contig 1	BC104528.1	Bos taurus ribosomal protein L10, mRNA (cDNA clone MGC:128842 IMAGE:8119588), complete cds	61%	0	91%
Contig 2	XR_121754.1	PREDICTED: Nomascus leucogenys 40S ribosomal protein S11-like (LOC100594367), miscRNA	39%	1,00E-174	84%
Contig 3	XM_003265887.1	PREDICTED: Nomascus leucogenys 60S ribosomal protein L32-like (LOC100582831), mRNA	54%	0	89%
Contig 4	BC102491.1	Bos taurus ribosomal protein S27a, mRNA (cDNA clone MGC:127404 IMAGE:7952323), complete cds	53%	0	93%
Contig 5	AC192736.3	Pan troglodytes BAC clone CH251-289D21 from chromosome 17, complete sequence	53%	0	93%
Contig 6	AL354751.7	Human DNA sequence from clone RP11-100G15 on chromosome 9 Contains the 5' end of the SPTLC1 gene for serine palmitoyltransferase long chain base subunit 1, a pseudogene similar to part of ATP synthase 6 (MTATP6), a cytochrome c oxidase III (MTCO3) pseudogene, pseudogenes for NADH dehydrogenases 3, 4 and 4L (MTND3, MTND4L, MTND4), a protein tyrosine phosphatase pseudogene, a novel gene (LOC158314), two novel genes, part of a novel gene and a CpG island, complete sequence	83%	0	77%
Contig 7	XM_532769.3	PREDICTED: Canis lupus familiaris protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit (PRKAG2), mRNA	81%	0	97%
Contig 8	JF342906.1	Canis lupus familiaris haplotype HV1 A26 mitochondrion, partial genome	57%	0	100%
Contig 9	AK391892.1	Sus scrofa mRNA, clone: HTMT10031D02, expressed in hypothalamus	88%	0	87%

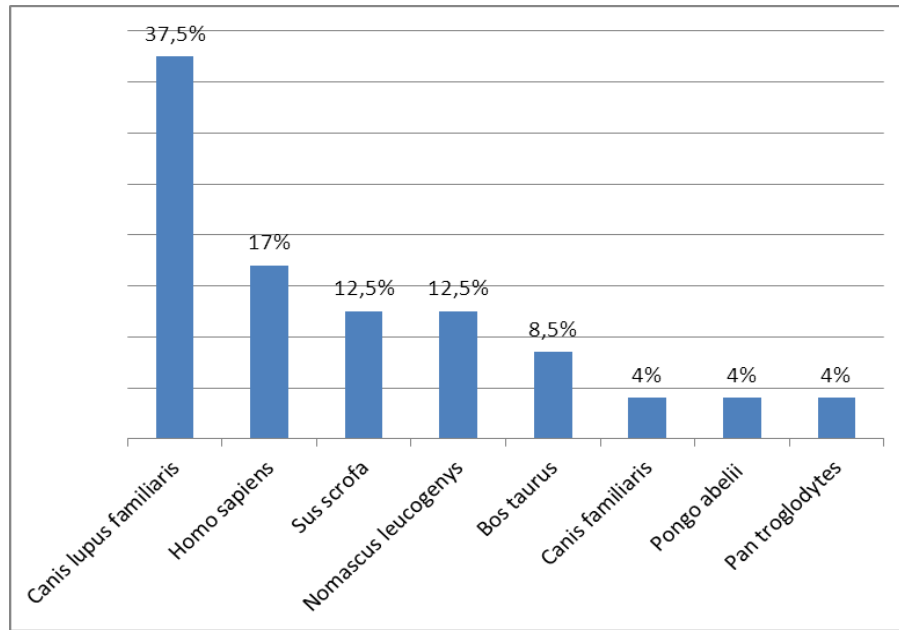
Çizelge 3.10'un devamı

Contig 10	NM_001003086.1	Canis lupus familiaris casein beta (CSN2), mRNA >dbj AB035080.1 Canis lupus familiaris mRNA for beta-casein, complete cds	93%	0	94%
Contig 11	XM_542993.3	PREDICTED: Canis lupus familiaris lipopolysaccharide binding protein (LBP), mRNA	94%	0	95%
Contig 12	XM_003432798.1	PREDICTED: Canis lupus familiaris guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar) (GNL3), mRNA	94%	0	99%
Contig 13	XM_003267561.1	PREDICTED: Nomascus leucogenys 40S ribosomal protein S20-like, transcript variant 1 (LOC100587409), mRNA	78%	2,00E-175	87%
Contig 14	AL137652.1	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434A2014 (from clone DKFZp434A2014)	50%	2,00E-169	84%
Contig 15	AC190116.3	Canis familiaris chromosome 31, clone XX-443F3, complete sequence	51%	0	96%
Contig 16	XM_002815820.1	PREDICTED: Pongo abelii lysyl oxidase, transcript variant 2 (LOX), mRNA	56%	2,00E-99	76%
Contig 17	AC026783.5	Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2129A22, complete sequence	81%	0	83%
Contig 18	AK392242.1	Sus scrofa mRNA, clone: HTMT10059G10, expressed in hypothalamus	62%	0	91%
Contig 19	AC005189.2	Homo sapiens PAC clone RP5-905J8 from 7p11.2-p21, complete sequence	36%	7,00E-25	79%
Contig 20	XM_845034.2	PREDICTED: Canis lupus familiaris guanosine monophosphate reductase 2, transcript variant 3 (GMPR2), mRNA	98%	0	97%
Contig 21	NM_001003100.1	Canis lupus familiaris ribosomal protein L23 (RPL23), mRNA >emb AJ388521.1 Canis familiaris mRNA for Ribosomal protein, L17/L23 (rpL17/L23 gene)	40%	0	99%
Contig 22	XM_003434492.1	PREDICTED: Canis lupus familiaris chromosome 4 open reading frame, human C10orf116 (C4H10orf116), mRNA	60%	7,00E-173	99%

Çizelge 3.10'un devamı

Contig 23	NM_001113171.1	Canis lupus familiaris secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI), mRNA >dbj AB266058.1 Canis lupus familiaris ckpi mRNA for protease inhibitor, complete cds	39%	0	100%
Contig 24	AK393964.1	Sus scrofa mRNA, clone: LVR010009D08, expressed in liver	59%	9,00E-175	82%

Tümörlü meme dokusuna ait contiglerin BLASTN analizlerine göre benzerlik gösterdiği organizmalar tespit edilmiştir. Buna göre contiglerin %37,5'i *Canis lupus familiaris*, %17'si *Homo sapiens*, %12,5'i *Sus scrofa*, %12,5'i *Nomascus leucogenys*, %8,5'i *Bos taurus*, %4'ü *Canis familiaris*, %4'ü *Pongo abelii*, %4'ü *Pan troglodytes* ile homoloji göstermektedir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 Tümörlü meme dokusuna ait contiglerin BLASTN sonuçlarına göre GenBank'ta bulunan organizmalarla olan benzerliği

Yapılan BLASTX analizine göre tümörlü meme dokusuna ait contiglerden contig 1, contig 2, contig 3, contig 5, contig 9, contig 13, contig 18 “ribozomal protein” ile

benzerlik göstermektedir. Contig 7 “5-AMP-activated protein kinase”, contig 8 “sitokrom C oksidaz”, contig 10 “beta-kasein”, contig 11 “lipopolisakkarid bağlayıcı protein”, contig 12 “guanin nükleotid bağlayıcı protein”, contig 14 “hypothetical protein”, contig 15 intraselüler demir depolama proteini “ferritin heavy chain”, contig 19 “endonükleaz/revers transkriptaz”, contig 20 “low quality protein, GMP redüktaz-2”, contig 22 “penisilin-bağlayıcı protein 1A”, contig 23 “antileukoproteinase”, contig 24 “retinal dehidrogenaz 1” şeklinde homoloji göstermektedir (Çizelge 3.11).

Yapılan BLASTX analizinde 2 contigin herhangi bir organizmaya benzerlik göstermediği görülmüştür.

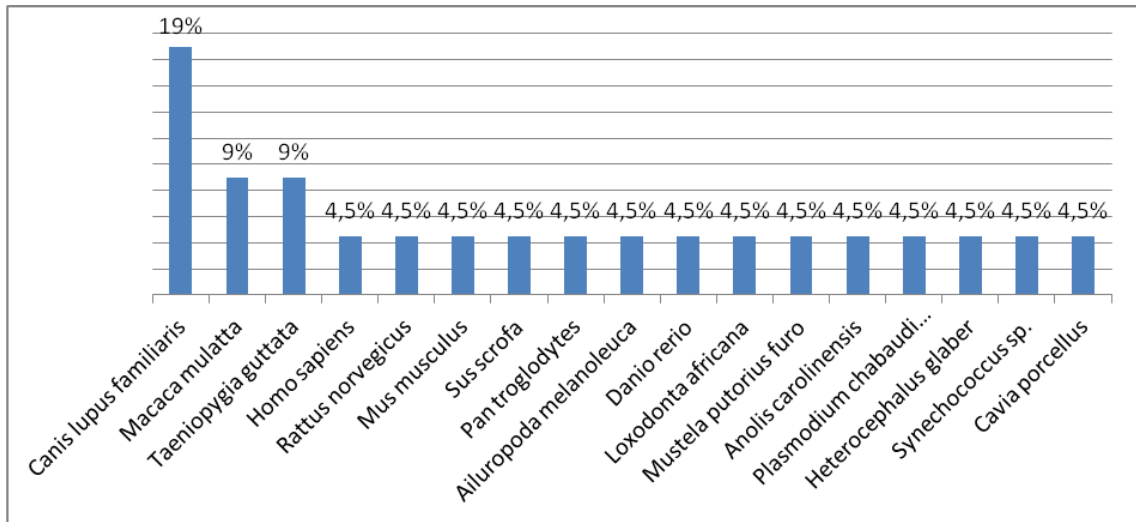
Çizelge 3.11 Tümörlü meme dokusuna ait contiglerin BLASTX analizi

Contig Number	Accession	Description	Query Coverage	E value	Max ident
Contig 1	XP_522844.3	PREDICTED: ribosomal protein L10-like [Pan troglodytes]	53%	2,00E-150	96%
Contig 2	XP_003228716.1	PREDICTED: 40S ribosomal protein S11-like [Anolis carolinensis]	30%	1,00E-89	93%
Contig 3	XP_002925587.1	PREDICTED: 60S ribosomal protein L32-like [Ailuropoda melanoleuca]	51%	1,00E-63	76%
Contig 4	AAH49478.1	Zgc:66168 protein, partial [Danio rerio]	47%	5,00E-81	97%
Contig 5	EDL17115.1	ribosomal protein S15a, isoform CRA_b [Mus musculus]	46%	3,00E-87	98%
Contig 6	-	No similarities found	-	-	-
Contig 7	AES04715.1	5-AMP-activated protein kinase, gamma-2 subunit [Mustela putorius furo]	11%	5,00E-11	90%
Contig 8	ABY80124.1	cytochrome c oxidase subunit II [Canis lupus familiaris]	55%	1,00E-90	90%
Contig 9	NP_001232711.1	putative 40S ribosomal protein S9 [Taeniopygia guttata] >gb ACH43609.1 putative 40S ribosomal protein S9 [Taeniopygia guttata]	66%	2,00E-118	100%

Çizelge 3.11’in devamı

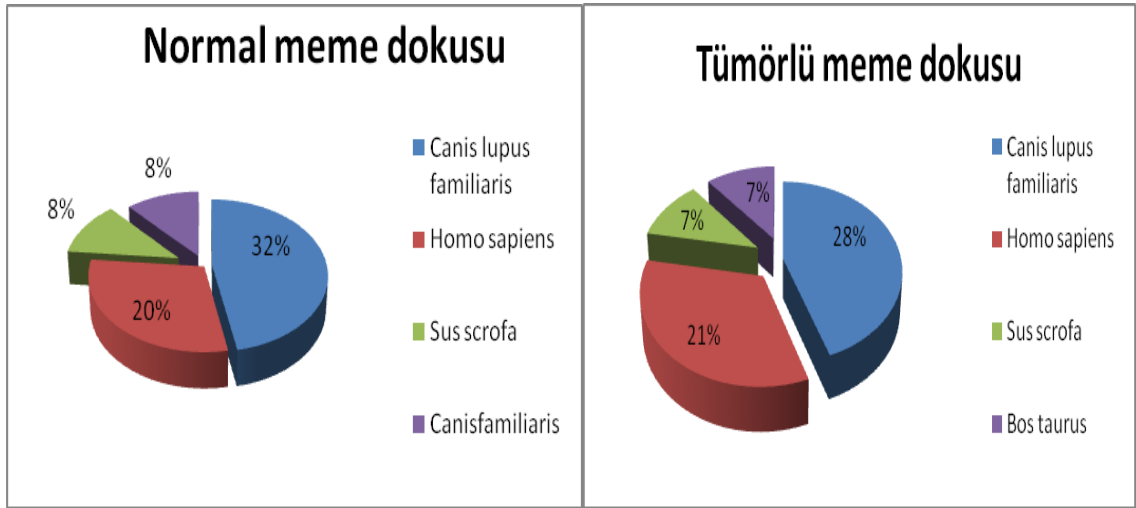
Contig 10	NP_001003086.1	beta-casein precursor [Canis lupus familiaris] >dbj BAA95931.1 beta-casein [Canis lupus familiaris]	47%	2,00E-69	100%
Contig 11	NP_058904.2	lipopolysaccharide-binding protein precursor [Rattus norvegicus] >gb AAI01907.1 Lipopolysaccharide binding protein [Rattus norvegicus] >gb EDL96653.1 rCG32348 [Rattus norvegicus]	88%	1,00E-132	60%
Contig 12	XP_003432846.1	PREDICTED: guanine nucleotide-binding protein-like 3 [Canis lupus familiaris]	80%	4,00E-148	100%
Contig 13	XP_002804158.1	PREDICTED: 40S ribosomal protein S20-like isoform 2 [Macaca mulatta]	60%	1,00E-83	98%
Contig 14	XP_744049.1	hypothetical protein [Plasmodium chabaudi chabaudi] >emb CAH81146.1 conserved hypothetical protein [Plasmodium chabaudi chabaudi]	24%	3,4	31%
Contig 15	EHB03982.1	Ferritin heavy chain [Heterocephalus glaber]	46%	2,00E-54	67%
Contig 16	-	No similarities found	-	-	-
Contig 17	EAW53124.1	hCG2040565 [Homo sapiens]	34%	6,00E-28	75%
Contig 18	NP_001180506.1	40S ribosomal protein S2 [Macaca mulatta]	47%	1,00E-164	99%
Contig 19	ABR01162.1	endonuclease/reverse transcriptase [Sus scrofa]	12%	0,33	50%
Contig 20	XP_003421050.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: GMP reductase 2-like [Loxodonta africana]	88%	8,00E-160	70%
Contig 21	XP_002192767.1	PREDICTED: hypothetical protein [Taeniopygia guttata]	37%	2,00E-81	100%
Contig 22	YP_377576.1	penicillin-binding protein 1A [Synechococcus sp. CC9902] >gb ABB26532.1 Penicillin-binding protein 1A [Synechococcus sp. CC9902]	52%	1,6	31%
Contig 23	XP_003467824.1	PREDICTED: antileukoproteinase-like [Cavia porcellus]	33%	3,00E-41	48%
Contig 24	XP_533525.1	PREDICTED: retinal dehydrogenase 1 isoform 1 [Canis lupus familiaris]	7%	8,00E-08	100%

Tümörlü meme dokusu contiglerinin BLASTX'e göre benzerlik gösterdiği organizmaların oranları %19'u *Canis lupus familiaris*, %9'u *Macaca mulatta*, %9'u *Taeniopygia guttata*, geri kalanı ise *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*, *Pan troglodytes*, *Ailuropoda melanoleuca*, *Danio rerio*, *Loxodonta africana*, *Mustela putorius furo*, *Anolis carolinensis*, *Plasmodium chabaudi chabaudi*, *Heterocephalus glaber*, *Synechococcus sp.*, *Cavia porcellus* % 4,5 olacak şekildedir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 Tümörlü meme dokusuna ait contiglerin BLASTX sonuçlarına göre GenBank'ta bulunan organizmalarla olan benzerliği

Meme dokusu EST'lerinin GenBank'taki organizmalarla olan benzerliği karşılaştırıldığında; normal meme dokusunda, en fazla homolojiyi gösteren ilk 4 organizma *Canis lupus familiaris* (%32), *Homo sapiens* (%20), *Sus scrofa* (%8), *Canis familiaris* (%8) iken tümörlü meme dokusunda *Canis lupus familiaris* (%28), *Homo sapiens* (%21), *Sus scrofa* (%8), *Bos taurus* (%8) şeklindedir. Görüldüğü üzere her iki dokuda da *Homo sapiens* homoloji oranları birbirine yakındır.



Şekil 3.12 Normal ve tümörlü meme dokularında en fazla homolojiyi gösteren ilk 4 organizmanın yüzde değerleri ve karşılaştırılması

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 EST BLAST ANALİZLERİ

Genom çalışmalarında, genler hakkındaki bilgilere ulaşmanın en kısa ve hızlı yolu EST ile yapılan çalışmalardır. Çalışma sonuçlarının güvenilirliği için EST'lerin doğru bir şekilde analiz edilmesi gerekmektedir. cDNA'ları oluşturan EST'ler aynı gende oluşsa bile aynı genin farklı bölgelerinden eksprese olan ürünleri ya da genin farklı uzunluklardaki fragmentleri klonlanmış olabilir. Bu durumda birleşmiş EST'lerden meydana gelen contigler farklılık gösterebilir.

Bu çalışmada Terrier ırkı sağlıklı bir köpeğin normal meme dokusu ile meme kanserine yakalanmış bir başka Terrier ırkı köpeğe ait tümörlü meme dokusunun cDNA kütüphaneleri oluşturulmuş ve EST klonları elde edilerek dizin analizi yapılmıştır. Sonuçta 2268 EST elde edilmiştir. EST'lerin BLASTN analizi, birleştirilmiş dizilerden oluşan contiglerin ise hem BLASTN hem de BLASTX analizleri yapılmış, sonuçlar ayrı ayrı değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Tümörlü ve normal meme dokularına ait muhtemel gen ekspresyon profilleri belirlenmiştir. EST dizilerinden oluşan cDNA kütüphaneleri mRNA'ların izole edildiği evrede aktif olan genlerle ilgili bilgi sunmaktadır [84].

4.1.1 Tümörlü meme dokusu BLAST analizleri

Köpek meme tümörlerinin %50'si malignant olarak sınıflandırılmaktadır ve çoğu tedavi

stratejisi (kemoterapi kombinasyonları, radyasyon, immünoterapi gibi) tekrerrü önlemede çok etkili değildir [20], [18], [85]. Bunlara ek olarak çeşitli yayınlar, histopatolojik pre-malignant lezyonlu köpeklerin ya da malignant CMTs geçmişi olan köpeklerin, yeni bir malignant CMT geliştirme riskinin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Meme tümörü etiyolojisindeki çevresel enfekte edici etkenlerin olası rolü bilimsel merak uyandırmıştır. Özellikle sentetik kimyasal içeriğin çevreye serbest bırakılmasıyla, canlı varlıkların doğrudan ya da dolaylı olarak bunlara maruz kalmasıyla olur [16].

İnsanlarda olduğu gibi köpeklerde de benign ve malign meme tümörlerinin gelişimi, cinsiyet steroid hormonlarına bağlıdır. Ayrıca kadınlarda olduğu gibi dişi köpek tümörlerinde de, hormon reseptörleri kaybedilir, hızlı bir ilerleme gerçekleşir ve köpekte metastatik bir hastalık oluşur [60]. İnsanlarda retrovirüslerin meme tümörü gelişimini tetiklediği yönündeki düşünce köpeklerde de kesin olarak kanıtlanmamıştır.

Sorenmo'nun (2009) yapmış olduğu bir çalışmada, malignant tümörlerin önceden var olan benign tümörlerden geliştiği hipotezi bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar malignant tümörü olan köpeklerin, benign tümörü olan köpeklerden çok daha yaşlı olduğunu göstermiş olup, malignant tümörlerin benign tümörlerden daha geniş olduğu belirlenmiştir. İncelenen köpeklerin 2/3'nün multipl tümörü vardır ve malignansiye doğru histolojik olarak ilerlemenin kanıtı, artan tümör boyutu ile bağdaştırılmaktadır. Bu bulgular CMTs'lerinin benignden malignanta ilerlediğini gösterir [31]. Çalışmamızda kullanılan Terrier ırkına ait tümörlü meme dokusu örneğinde, köpeğe ait tümörün boyutu büyük olup kanseri ilerlemiş bir evrede bulunmaktadır, bu da kullanmış olduğumuz tümörlü dokunun malignant olabileceği şüphesini uyandırmaktadır.

Neoplazi (bir grup hücrenin veya dokunun büyümesi, çoğalması) gelişme riskinden sorumlu tutulan yüzlerce gen bulunmaktadır. Kalıtsal olarak kansere yatkınlık yaratan genler sıklıkla hücre büyümesi ve farklılaşmasının kontrolünde, DNA onarımında ve genomik bütünlüğün sağlanmasında rol oynadığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır [86]. Tümörlü meme dokusuna ait BLAST analizi sonuçları bu durumu desteklemektedir. Normal meme dokusuna oranla, hücre büyümesi ve farklılaşması,

DNA onarımı gibi olaylarda rol oynayan genler tümörlü meme dokusunda daha çok bulunmaktadır. Hücre döngüsünde, sinyal yollarında, hücre büyümesi kontrolünde, proliferasyon ve farklılaşma gibi durumlarda etkin “ tirozin fosfataz”, “matriks metalloproteinaz 19”, “inositol polifosfat” ve “myc ilişkili faktör X” ve “WD repeat domain” gibi genler tümörlü meme dokusunda homoloji göstermiştir.

Çizelge 4.1 Homolojisi bulunan genler, oranları ve EST sayıları-1

Homolojisi olan gen	Homoloji oranı	EST sayısı
WD repeat domain	%98	1
Myc associated factor X	%21	1
Inositol polyphosphate	%6	1
Matrix metalloproteinase 19	%86	1
Tyrosine phosphatase	%95	1

Asano (2006) ve Carraway&Sweeney (2006) gibi bilim insanlarının yapmış olduğu çalışmalarda, sitokin ve kemokin meme kanserinde rol oynadığını ancak sinyal yollarının çok iyi bilinmediğini belirtmişlerdir. Kemokinler, malign tümör oluşumunda rol oynarlar ve yapmış olduğumuz çalışmada tümörlü EST benzerlik sorgulaması sonuçlarında da bulunmaktadır. %98, %26 ve %5 oranlarında homolojisi bulunan kemokine 3 EST’de rastlanmıştır.

Mutasyonu ile kanser gelişimine neden olabilecek ya da apoptozis gibi koşulları tetikleyecek genlere normal meme dokusu ile kıyaslandığında tümörlü doku sonuçlarında daha fazla EST’de rastlanmıştır. Bunlardan monositlerden salgılanan, kanserli hücrelerin yıkımında önemli rol oynayan ve apoptozisi indükleyen sitokinlerden “tümör nekroz faktör” [106], apoptoziste olayında etkin “clusterin”, “değişiklik yapan beta büyüme faktörü” (transforming growth factor beta), “apoptotic

chromatin condensation inducer 1 (ACIN1)” ve “karsinoembriyogenik antijen-iliskili hücre adhezyon molekül 1 izoform 1s” genleridir. Bu genlerin bulunduğu EST sayısı 1 olup en fazla homoloji gösteren %94 ile “clusterin”dir.

İnsülin reseptörü (INSR) ya da “insülin benzeri büyüme faktörü” (insulin-like growth factor, IGF) sinyalizasyonunun, meme tümörü gelişiminde yer aldığı tahmin edilmektedir [87]. İnsülin reseptör ailesi üyeleri IGF1R, IGF2R, INSR, GHR ve ligandları IGF1, IGF2 üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmış ve bunların köpek meme tümörleri karsinogenezi üzerinde potansiyel etkisi bulunmuştur [87], [88]. Yapılan araştırmalarda, normal köpek meme bezi ve adenomalarının fazla INSR ekspresyonu varken, karsinomaların ve metastazların gözle görülür bir biçimde azalmış ekspresyonları belgelenmiştir. İnsülin ve IGF sinyal seviyelerindeki değişiklikler kanser oluşumuna neden olmaktadır [69], [88]. Çalışmamızda EST analizleri sonrasında elde edilen verilerin içinde “insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)”, “epidermal büyüme faktörü”, “fibroblast büyüme faktörü” her iki meme dokusunda da tespit edilmiştir. Köpekler üzerinde yapılan birçok çalışmada, östrojen (ER), progesteron (PR), prolaktin (PRLR), ve epidermal büyüme faktörü reseptörlerinin (EGF-R) hem normal köpeklerde hem de tümörlü köpeklerde bulunduğu saptanmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada yer alan genlerin benzerlik sonuçlarında, bu reseptörlere hem normal hem de tümörlü köpek meme dokusunda karşılaşılmıştır.

2005 yılında yapılan bir cDNA çalışmasında “mucin” ve “cadherin” genlerinin overekspresyonlarının meme kanseri oluşumunda rol oynadığı bulunmuştur [89]. Yapmış olduğumuz tümörlü meme dokusu benzerlik sonuçlarında bu iki gen de yer almaktadır. “Cadherin” ise hem tümörlü hem de normal meme dokusunda tespit edilen muhtemel genlerdendir.

Benign tümörlerde görülen “leydig hücre tümörü” ile ilgili araştırmalar, radyoterapi ve kemoterapiye dirençli olduğunu göstermektedir [90]. Kanser hücrelerinde yüksek aktivite gösteren “PDK1 (Pirüvat dehidrogenaz kinaz)” ve “Wilms tumor 1 associated protein” homoloji bulgularımızda rastlanmaktadır. Çeşitli hücre döngüsünde etkin olan,

transkripsiyonel regülasyondan rol oynayan “Wilms tumor 1 associated protein”’in EST’lerimizde yüksek oranda benzerlikleri bulunmaktadır [89] (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Homolojisi bulunan genler, oranları ve EST sayıları-2

Homolojisi olan gen	Homoloji oranı	EST sayısı
Leydig cell tümör	%81	1
Wilms tumor 1 associated protein	%98, %93	2
PDK1	%97	1

Sinyal yollarında meydana gelen mutasyonların kanseri tetikleyici olduğu ispatlanmıştır. ERK1/2 MAP kinaz aktivasyonuna sebep olan malignansi ile ilişik “D-dopachrome tautomerase”, intraselüler sinyal yollarında yer alan proteinlerde bulunan “pleckstrin homology domain” ve Wnt proteinleri için reseptörleri kodlayan “Wntless homolog” EST benzerlik sorgulaması sonuçlarında yer almakta, bu da bozulan sinyal yolağı ve proteinlerinin kansere olan etkisinin sonucu olduğunu düşündürmektedir. Wnt sinyali, hem insanda hem de yetişkin hayvanlarda meme kanseri gelişimine neden olur ve karsinogenezde rol oynar. Bu yolak çoğu tümör oluşumunda aktif hale gelir. Hem insanda hem de köpeklerde çoğu yolak komponentlerinin “down-regülasyonu” gözlenmiştir [92], [93], [94].

RhoA protein seviyesi ile meme kanseri durumunda belirgin artış gösteren “Ras homolog gen ailesi” ve mutasyonu bazal hücre karsinomaları ile ilişik “Ras p21 protein aktivatörü (*Ras* GTPase activator protein) ” ve memelilerde yüksek oranda korunan *Ras* süper ailesi GTP-bağlayıcı proteinlerden ARF üyesi “ADP-ribosylation factor 4” ile benzerlik gösteren sonuçların EST’lerimizde rastlanması bu onkogen ile yapılan çalışmalara destek verebilir.

Yapılan bir çalışmada sinyal yollarında anahtar komponent olan “GNAS kompleks lokus” mutasyonunun STAT3 aktivasyonunu sağladığı ve kansere neden olduğu

bulunmuştur [95]. “Guanin nükleotid bağlayıcı proteinler “ sinyal yollarında görev yapan proteinlerdendir. Homolojisi belirlenen, meme ve prostat kanserinde etkisi olan “tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)” ve “insan akciğer onkogeni 7” EST’lerimizde benzerlikleri bulunan genlerdir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Homolojisi bulunan genler, oranları ve EST sayıları-3

Homolojisi olan gen	Homoloji oranı	EST sayısı
GNAS complex locus	%97	1
Guanine nucleotid binding proteins	%98, %97, %94	3
Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)	%96	1
İnsan akciğer onkogeni 7	%82	1

EST benzerlik sorgulaması sonuçlarında, mutasyonu ile kanseri tetikleyecek genlere rastlanmıştır. Bunlardan bazıları “glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1)”, “UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine” ve “ tirozin kinaz”dır. Buna ek olarak “lysyl oksidaz” onkogen süpresörü ve “HtrA1” tümör süpresörü olarak görev yapan ve benzerliği bulunan muhtemel genlerdir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Homolojisi bulunan genler, oranları ve EST sayıları-4

Homolojisi olan gen	Homoloji oranı	EST sayısı
GSTP1	%81	1
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine	%98, %45	2
Lysyl oxidase	%81, %59	2
HtrA1	%86	1

Mutasyonu kas distrofisine neden olan “*Homo sapiens* sarkospan (Kras oncogene associated gene)” [96], [97], seviyesindeki artışı kanserin yayılmasına neden olan “tümör protein” ve mutasyonu retinal-renal genetik bozukluğu gibi durumlara yol açan “serolojik tanımlanmış kolon kanseri antijeni 8” genleri tümörlü meme dokusunda homolojisi yüksek muhtemel gen dizileridir. KRAS2 sinyal geçişini sağlayan bir GTPase olarak bilinmektedir ve somatik mutasyonlar sonucunda, meme kanseri de dahil olmak üzere çoğu kanser türünde etkili hale geldiği kanıtlanmıştır [98].

Çalışmamızda yapılan BLAST analiz sonuçlarında bulunan MAP (mitogen-activated protein) kinazlar ekstraselüler stimülasyonu ve çeşitli hücrel aktiviteyi (gen ekspresyonu, mitoz, farklılaşma, apoptosis) regüle etmeyi sağlamaktadır [99]. MMPs’ler ise hem insanlarda hem de köpeklerde aynı etkiyi yapar, tümör invazyonunu ve farklı tümörlerdeki progresyonunu kontrol eder. Yapılan çalışmalarda, matrix metalloproteinazlar (MMPs) ve metalloproteinazların inhibitörlerinin (TIMPs) tümör progresyonunda yer aldığı ve reaktif stroma ile ilişkilendirildiği (tümör gelişimi için yapısal ve vasküler destek sağlar) düşünülmektedir [18].

Hem köpeklerde hem de insanlarda bulunan, mutasyonu ölümcül Mendelian hastalığına sebep olan, glisin metabolizmasındaki önemli enzimlerden “aminometiltransferaz (AMT)” [100], osteoklast ve akciğer kanseri gelişiminde rol oynayan “T-cell leukemia translocation altered gene (TCTA)” [101] genleri elde ettiğimiz EST’lerle homoji göstermektedir. “AMT” geni 3 EST’de %67, %60 ve %49 oranlarında benzerlik göstermektedir.

Overekspresyonu tümör oluşumu gibi durumlarda görülen “leukemia viral oncogene homolog 3”, “mRE11 mayotik rekombinasyon 11 homolog A”, insan meme kanseri vakalarında kanserle ilişkili olarak hücre döngüsünde rol oynayan “siklin-bağımlı kinaz” benzerlik sorgulamasında elde edilen olası genlerdir.

Ayrıca benign monoklonal adenomalarda sık rastlanan “pituitary tumor-transforming gene 1 protein interacting” [102] genine EST analizlerimizde rastlanmıştır.

Sonuçlarımızda rastlanmayan ancak köpek meme tümörü oluşumuna teşvik ettiği

bulunan genlerden *FBN1*, *AOX1* ve *PTERG2*, *SEPP1* ve *DCN* [9], [10], meme kanserinde görülen başlıca genler olan *BRCA1* ve *BRCA2*, *p53* ile EST'lerimizde herhangi bir homoloji tespiti yapılmamıştır. *BRIP1*, *CDH1*, *ESR1*, *STK11* ve *TP53* gibi en çok çalışılan risk genlerine de [64], [65] benzerlik araştırması yaptığımız bu çalışmada rastlanmamıştır. Bu araştırmanın homoloji sonuçlarında daha çok hücre döngüsünde etkin olan, hücrenin proliferasyonunu ve göçünü sağlayan, apoptozis gibi durumlarda rol oynayan, büyümeyi kontrol eden olası genlerin varlığı tespit edilmiştir.

4.1.2 Normal meme dokusu BLAST analizleri

Normal meme dokusuna ait BLASTN analizlerinde karşılaşılan genlerden yüksek oranda benzerlik gösteren (%97-*Homo sapiens*) "serin peptidaz inhibitör" hormon taşınması, proteinlerin katlanması gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarda görev alıp böceklerde immün sistemde yer alırken [104], "serin/treonin kinaz" hücre döngüsünde ve proliferasyonunda rol oynar ve çeşitli kanser tiplerinde ekspresyonu değişikliğe uğrar.

BLAST analizi yapılan EST dizilerimizde benzerlik gösteren, hücre döngüsünde ya da farklılaşmasında görev alan genler "hücre bölünmesi döngüsü 17 ilişkili protein kinaz", büyüme görevinin yanı sıra hücre siklusunun Go/G1 fazlarında ekspresyonu en yüksek seviyeye ulaşan, kromozom translokasyonu ile B-cell kronik lenfositik lösemiye neden olan "B-hücreli translokasyon geni 1" genlerine rastlanmıştır.

EST BLAST sonuçlarımızda yer alan "FRAS 1 ekstraselüler matriks protein" in epidermal hücrelerde ekspresyonu fazladır ve epitel-mezenkimal dayanıklılığa katkıda bulunur, mutasyonu Fraser sendromuna sebep olur [105] ve EST'lerimizde benzerliği tespit edilmiştir.

Hücrede bulunan ATP'deki kimyasal enerjiyi mekanik hareket enerjisine dönüştüren motor proteini ve ilaç kullanımı boyunca detoksikasyonu sağlayan, basit hücresel fonksiyonlarda yer aldığı bulunan, Alzheimer gibi hastalıklarda rol oynadığı düşünülen "sitoplazmik dynein" epoksidleri trans-dihidrodiols'e dönüştüren "epoksid hidrolaz I" benzerlik analizi yapılan diğer genlerdendir.

Lizozomal proteolitik sistemin ana komponenti olan ve mutasyonu sonucu kanser ve Alzheimer gibi hastalıklara neden olan “cathepsin F”, T hücrelerinin büyümesini ve farklılaşmasını stimüle eden sinyallerin modülasyonunda önemli rol oynayan intraselüler binding protein “myozenin-2” BLAST sonuçlarımızda yer almaktadır.

Spesifik endotelial hücre reseptörü olan “thrombomodulin (THBD)”, hızlı çizgili kaslarda (fast skeletal troponin) ekspres olan ve kasılmada görevli “troponin T type 3”, hücre proliferasyonu, büyümeyi sağlayan, fazla ekspresyonu kolon kanserine neden olan “metiyonin adenosiltransferaz II”, transmembran proteinlerden “sitokrom”, kimyasal reaksiyonları katalizleyen enzim “dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2” normal meme dokusu genleri ile benzerlik göstermektedir.

Onkogen ya da transkripsiyonel regülatör olarak rol oynayan ve overekspresyonu hücre invazyonunu arttıran, meme kanseri oluşumunda prediktör “meme tümörü otoantijeni”, sitozolde bulunan glikogen granüllerinde bulunan enzim “fosforilaz glikojen” genlerinin homolojisi normal meme dokusunda tespit edilmiştir.

Membran proteini olan “LanC lantibiotic domain containing phosphatase”, Fox geninin hücresel homologu “Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virusubiquitously”, transkripsiyonel regülasyonda ve mikrotübül-bağımlı hücre hareketinde rol oynayan “histon deasetilaz” ekspresyonu endometrial karsinoma hücrelerinde görülen ana transkripsiyon element-bağlayıcı protein olarak bilinen “krueppel-like factor 9” analiz sonuçlarında görülmektedir. Normal meme dokusunda benzerlikleri bulunan olası genlerin homoloji oranları ve EST sayıları Çizelge 4.5’te verilmiştir.

Çizelge 4.5 Normal dokuda homolojisi bulunan genler, oranları ve EST sayıları

Homolojisi olan gen	Homoloji oranı	EST sayısı
Serine peptidase inhibitor	%97	1
Serine/threonine kinase	%91	1
Cell division protein kinase 17	%99, %74	2
B-cell translocation gene 1	%96	1
FRAS 1 extracellular matrix protein	%93	1
Cytoplasmic dynein	%95	1
Epoxide hydrolase I	%97	1
Cathepsin F	%98	1
Myozenin-2	%99	1
Thrombomodulin	%59, %55, %50, %49, %39, %29, %20, %7	8
Troponin T type 3	%87, %64	1
Methionine adenosyltransferase II	%82	1
Cytochrome	%88, %86	2
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	%96	1
Breast tumor autoantigen	%70	1
Phosphorylase glycogen	%95	1
LanC lantibiotic domain containing phosphatase	%80, %33	2
Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virusubiquitously	%70, %57	2
Histone deacetylase	%95	1

Analiz sonuçlarının vermiş olduğu bilgilere dayanarak normal meme dokusuna ait BLAST sonuçlarında hücrelerin yapısal kısımlarında bulunan, düzenleyici ve kimyasal reaksiyonlarda görev alan, hücrenin büyümesini ve farklılaşmasını sağlayan genlerle benzerlik bulunmuştur.

Normal ve neoplazmaya ait meme dokularında bulunan steroid hormon reseptörlerinin farklılığı, malignant tümörlü dişi köpeklerde bulunan steroid hormon serum seviyesi, sağlıklı köpekler ya da benign tümörlü köpeklerle karşılaştırıldığında çok daha fazla miktarda bulunmaktadır. Hormonlar, genetik mutasyonlarla birlikte hücre proliferasyonunu indükler. Carreño (1999), karsinogenezdeki hormon rolünün, diğer karsinogenezlerle değişen hücrelerin proliferasyonunu kısıtladığını belirtmektedir [16].

Hormon bağımlı neoplazi gelişiminde yer alan spesifik genler halen bilinmemektedir. Buna ek olarak onkogenlerin, tümör süpresör genlerin, DNA tamirindeki genlerin, hormonal karsinogenezde rol oynadığına inanılır [16].

%80 ve üzerinde homoloji gösteren genler incelendiğinde ise her iki meme dokusunda da protein sentezinde görev alan, ribozomların alt birimlerini oluşturan “ribozomal protein” EST’lerimizde en fazla sayıda bulunan gendir. Normal meme dokusunda bu genin ardından protein sentezi sırasında peptid zincirinin uzamasını sağlayan “uzama faktörü”, tümörlü meme dokusunda ise sırasıyla “kasein” sonra da “uzama faktörü” gelmektedir.

Tümörlü ve normal doku arasında rastlanan farklar, gen ekspresyonundaki farklılıkların tamamını göstermeye yeterli değildir. EST dizilerinin tesadüfi klonlar üzerinden yapılıyor olması bize bütün gen örneklerinden ekspresyon seviyelerine uygun sayısal oranda karşımıza çıkmasını engeller.

EST sayımızın kısıtlı olmasından dolayı, ekspres olan bütün genlerin tespit edilmesi mümkün olmasa da, bu çalışma bize ekspresyon profili hakkında önemli bilgiler vermiştir. Muhtemel genlerin dizilerinin, EST bankasına kaydedilmesiyle birlikte

tümörlü dokuyla çalışan araştırmacılara kaynak olacaktır. Özellikle köpek meme dokusuna spesifik olan bu EST'ler, köpek meme kanseri çalışmaları için oldukça değerli bilgiler taşımaktadır.

Son zamanlardaki yüksek işlem hacmi olan genomik çalışmalar, meme kanserinin moleküler kompleksliğini anlama olanağı sağlar. Köpek meme bezi tümörlerinin insan meme tümörleri ile çok yakın benzerlikler göstermesi, onkoloji çalışmaları açısından köpeklerin çok önemli biyomodeller olduğunu kanıtlar. Moleküler biyoloji teknikleri ile yapılan araştırmalar, sağlıklı ve normal hücrelerin kötü huylu karakter kazanmasına bağlı olarak tümör oluşumuna neden olan genlerin belirlenmesi her geçen yıl önem kazanmaktadır. Bu çalışmanın kanser araştırmalarında model organizma olarak kullanılan Terrier ırkı köpeğin meme dokularındaki bilinmeyen genlerin belirlenmesine olanak sağlayacağı gibi bundan sonraki çalışmalara da önemli bir kaynak teşkil edeceği, kanserin moleküler biyolojisini anlamada yardımcı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

-
- [1] Nussbaum, R., McInnes, R. R., Willard, H. F., Thompson, M. W. ve Tunçbilek, E., (2005). Thompson&Thompson Tıbbi Genetik, 6. baskı, Güneş Kitabevi, Ankara.
 - [2] Klug, W. S., ve Cummings, M. R., (2003). Genetik Kavramlar, 6. baskı, Palme Yayınları, 207, Ankara.
 - [3] Campbell, N. A. ve Reece, J. B., (2006). Biyoloji, 6. baskı, Palme Yayınları, 381, Ankara.
 - [4] Bozcuk, A. N., (2000). Genetik, 1. baskı, Palme Yayınları, Ankara.
 - [5] Çefle, K., (2009), Kanser Genetiği, http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/kg22_3/9.pdf, (23 Mart 2012).
 - [6] Geske, F. J. ve Gerschenson, L. E., (2001). "The biology of apoptosis", Human Pathology, 32: 1029-1038; Derleyen: Özvaran, M. K., "Malign mezotelyomada gen tedavisi", (2004). Toraks Dergisi, 5 (2): 110-115.
 - [7] Cohen, J. J., (1998). "Apoptosis", Postgraduate Syllabus, 1: 1-19; Derleyen: Öktem S., Özhan M. H., Özol, D., (2001). "Apoptozisin önemi", Toraks Dergisi, 2 (1): 91-95.
 - [8] Kauraniemi, P., Barlund, M., Monni, O. ve Kallioniemi, A., (2011). "New amplified and highly expressed genes discovered in the *ERBB2* amplicon in breast cancer by cDNA microarrays", American association for Cancer Research, 61: 8235-8240.
 - [9] Perou, C. M., Sorlie, 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., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O. ve Botstein, D., (2000). "Molecular portraits of human breast tumours", Nature (London), 406: 747-752.
 - [10] Miller M. E., Christensen G.C, ve Evans H. E., (1964). "The mammary gland. Anatomy of the Dog ", W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 789-803 ; Derleyen Sleeckx, N., Rooster, H., Kroeze, V., Ginneken, C. ve Brantegem, L., (2011). "Canine mammary tumours", Blackwell Verlag, 46: 1112-1131.

- [11] Borge, K. S., Borresen-Dale, A. L. ve Lingaas, F., (2011). "Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour", *Veterinary and Comparative Oncology*, 9: 241-250.
- [12] Martin, A. M. ve Weber, B. L., (2000). "Genetic and hormonal risk factors in breast cancer", *Journal of the National Cancer Institute*, 92: 1126-1135.
- [13] Egeblad, M. ve Werb, Z., (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression", *Nature Reviews-Cancer*, 2: 161-174
- [14] Mottolese, M., Morelli, L., Agrimi, U., Benevolo, M., Sciarretta, F., Antonucci, G. ve Natali, P. G., (1994). "Spontaneous canine mammary tumors. A model for monoclonal antibody diagnosis and treatment of human breast cancer ", *Lab Invest*, 71: 182-187; Derleyen: Sleenckx, N., Rooster, H., Kroeze, V., Ginneken, C. ve Brantegem, L., (2011). "Canine mammary tumours", *Blackwell Verlag*, 46: 1112-1131.
- [15] Helmen, E. (2005). "Complex mammary tumours in the female dog: a review", *Journal of Dairy Research*, 72: 90-97.
- [16] Andrade, F. H., Figueiroa, F., Bersano, P. R., Bissacot, D. Z. ve Rocha, N. S., (2010). "Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants", *Diagnostic Pathology*, 5: 45.
- [17] Rao, N. A. S., Wolferen, M. E., Ham, R., Leenen, D., Groot Koerkamp, M. J. A., Holstege, F. C. P ve Mol, J. A., (2008). "cDNA microarray profiles of canine mammary tumour cell lines reveal deregulated pathways pertaining to their phenotype", *Journal Compilation*, 39: 333-345.
- [18] Aresu, L., Giantin, M., Morello, E., Vascellari, M., Castagnaro, M., Lopparelli, R., Vanessa, Z., Granato, A., Garbisa, S., Arico, A., Bradaschia, A., Mutinelli, F. ve Dacasto, M., (2011). "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors", *BMC Veterinary Research*, 7: 33.
- [19] Sobral, R. A., Honda, S., Katayama, L. H., Brentani, H., Brentani, M. M., Patrão F. C., ve Aparecida, M., (2008). "Tumor slices as a model to evaluate doxorubicin *in vitro* treatment and expression of trios of genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 and PRSS11, MTSS1, SMYD2 in canine mammary gland cancer", *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50: 27.
- [20] Mulas, J. M. ve Reymundo, C., (2000). "Animal models of human breast carcinoma: canine and feline neoplasms", *Revista Espanola de Oncologia*, 2: 274-281.
- [21] Rosai J., (1996). *Ackerman's surgical pathology*, 8. baskı, St. Louis: Mosby.
- [22] Schneider, R., (1970). "Comparison of age, sex and incidence rates in human and canine breast cancer", *Cancer*, 26: 419-426.

- [23] Gobello, C., Sota, R. L. ve Goya, R. G., (2001). "Canine pseudopregnancy: a review", *Reproduction of Domestic Animals*, 36: 283-288.
- [24] Moe, L., (2001). "Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds", *J. Reprod Fertil Suppl*, 57: 439-443.
- [25] Uva, P., Aurisicchio, L., Watters, J., Loboda, A., Kulkarni, A., Castle, J., Palombo, F., Viti, V., Mesiti, G., Zappulli, V., Marconato, L., Abramo, F., Ciliberto, G., Lahm, A., Monica, N. ve Rinaldis, E., (2009). "Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors", *BMC Genomics*, 10: 135.
- [26] Hoffman, M. M. ve Birney, E., (2007). "Estimating the neutral rate of nucleotide substitution using introns", *Molecular Biology and Evolution*, 24: 522-531.
- [27] Perez-Alenza, M. D., Pena, L., Del Castillo, N. ve Nieto, A. I., (2000). "Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours". *Journal of Small Animal Practise*, 41: 287 – 291.
- [28] Marella, N. V., Malyavantham K. S. ve Wang J., (2009). "Cytogenetic and cDNA microarray expression analysis of MCF10 huma breast cancer progression cell lines", *Cancer Reseach*, 69: 5946-5953.
- [29] Kumaraguruparan, R., Prathiba, D. ve Nagini S., (2006). "Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours". *Research in Veterinary Science*, 81: 214-218
- [30] Helmen, E., Bergstrom, R., Holmberg, L., Spangberg, I. B., Hnasson, K. ve Lindgren, A., (1993). "Prognostic factors in canine mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases ", *Vet Pathol*, 30: 20-27.
- [31] Sorenmo, K. U., Kristiansen V. M., Cofone, M. A., Shofer, F. S., Bren, A. M., Langeland, M., Mongil, C. M., Grondahl, A. M., Teige, J. ve Goldschmidt, M. H., (2009). "Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence ", *Vet Comp Oncol*, 7: 162-172.
- [32] Thuroczy, J., Reisvaag, G. J., Perge, E., Tibold, A., Szilagyi, J. ve Balogh, L., (2007). "Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours", *Journal of Comparative Pathology*, 137: 122-129.
- [33] Thomas, D. B., (1984). "Do hormones cause breast cancer?", *Cancer*, 53: 595-604.
- [34] Yamashita, H., Yando, Y., Nishio, M., Zhang, Z., Hamaguchi, M., Mita, K., Kobayashi, S., Fujii, Y. ve Iwase, H., (2006). "Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer", *Breast Cancer*, 13: 74-83.

- [35] Frye, F., Dorn, C. R., Taylor, D. O. N., Hibbard, H. H. ve Klauber, M. R., (1967). "Characteristics of canine mammary gland tumor cases". *Animal Hospital*, 3: 1-2.
- [36] Schneider, R., Dorn, C. R. ve Taylor, D. O. N., (1976). "Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival". *Journal of Nutrition and Cancer Institute*, 56: 779-786.
- [37] Güçer, H., (2006). Renal hücreli karsinomlarda Cox-2 ekspresyonu ve mikrodamar yoğunluğunun klinikopatolojik parametrelerle karşılaştırılması, Uzmanlık tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, İstanbul.
- [38] Queiroga, F. L., Pires, I., Lobo, L. ve Lopes, C. S., (2010). "The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours", *Research in Veterinary Science*, 88: 441-445.
- [39] Millanta, F., Citi, S., Della Santa, D., Porciani, M. ve Poli, A., (2006). "Cox-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers", *Breast Cancer Research and Treatment*, 98: 115-120.
- [40] Queiroga, F. L., Alves, A., Pires, I. ve Lopes, C., (2007). "Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours", *Journal of Comparative Pathology*, 136: 177-185.
- [41] Dias, P. P., Lopes, C. C., Matos, A. J., Santos, M., Gartner, F., Medeiros, R. ve Lopes, C., (2009). "Cox-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland", *Journal of Comparative Pathology*, 140: 247-253.
- [42] Stoll, B. A., (2000). "Adiposity as a risk determinant for postmenopausal breast cancer", *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 24: 527-533.
- [43] Perez, A. D., Rutteman, G. R., Pena, L., Beynen, A. C. ve Cuesta, P., (1998). "Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study", *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12: 132-139.
- [44] Knapp, D. W. ve Waters, D. J., (1997). "Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans". *Molecular Medicine Today*, 3: 8.
- [45] Osborne, C. K., (1998). "Steroid hormone receptors in breast cancer management", *Breast Cancer Research and Treatment*, 51: 227-238.
- [46] Clemente, M., Pérez-Alenza, M. ve Pena, L., (2009). "Metastasis of canine inflammatory versus non-inflammatory mammary tumours", *Journal of Comparative Pathology*, 143: 157-163.
- [47] Millanta, F., Caneschi, V., Ressel, L., Citi, S. ve Poli, A., (2009). "Expression of vascular endothelial growth factor in canine inflammatory and non-

- inflammatory mammary carcinoma”, *Journal of Comparative Pathology*, 142: 36-42.
- [48] Illera, J. C., Perez-Alenza M. D., Nieto, A., Jimenez, M. A., Silvan, G., Dunner, S. ve Pena, L., (2006). “Steroids and receptors in canine mammary cancer”, *Steroids*, 71: 541-548.
 - [49] Liu, Z., Luo, X., Guo, S., Wang, J., Zhang, X., Wang, N., Jiang, Y. ve Zhang, T., (2009), “MRTF-A decreases the anti-tumor effect of tamoxifen on MCF-7 human breast cancer cells”, *Bioinformatics and Biomedical Engineering-ICBBE*, 1-4.
 - [50] Holdaway, I. M. ve Friesen, H., G., (1977). “Hormone binding by human mammary carcinoma”, *Cancer Research*, 37: 1946-1952.
 - [51] Deroo, B.J. ve Korach, K.S., (2006). “Estrogen receptors and human disease”, *American Society for Clinical Investigation*, 116: 561-570.
 - [52] Boviell, R., Durif, J., Dechelotte P., Bingon, Y. J. ve Galon, D. B., (2011). “Epigenetic modulation of BRCA1 and BRCA2 gene expression by equol in breast cancer cell lines”, *British Journal of Nutrition*, 1-7.
 - [53] Adem, C., Reynolds, C., Ingle, J. N. ve Nascimento, A. G., (2004). “Primary breast sarcoma: clinicopathologic series from the Mayo Clinic and review of the literature”, *British Journal of Cancer*, 91: 237-241.
 - [54] Blanchard, D. K., Reynolds, C. A., Grant, C. S. ve Donohue, J. H., (2003). “Primary nonphyllodes breast sarcomas”, *American Journal of Surgical Pathology*, 186: 359-361.
 - [55] Pandey, M., Mathew, A., Abraham, E. K. ve Rajan, B., (2004). “Primary sarcoma of the breast”, *Journal of Surgical Oncology*, 87: 121-125.
 - [56] Lynch, H. T., Silva, E., Snyder, C. ve Lynch, J. F., (2008). “Hereditary breast cancer: part 1. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes”, *The Breast Journal*, 14: 3-13.
 - [57] Breast Cancer Information Core, (2010), <http://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/index.shtml>, (27 Mart 2012).
 - [58] Klopffleisch, R., Klose, P., Christoph, W., Bondzio, A., Multhaup, G., Einspanier, R. ve Gruber, A. D., (2010). “Proteome of metastatic canine mammary carcinomas: Similarities to an differences from human breast cancer”, *Journal of Proteom Research*, 9: 6380-6391.
 - [59] Zacchetti, A., Garderen, E. ve Rutteman, G. R., (2007). “Immunohistochemical evaluation of p53 expression with different antibodies in malignant canine tumours with or without p53 gene mutation”. *Veterinary and Comparative Oncology*, 5: 108-118.

- [60] Chu, L. L., Rutteman, G. R., Kong, J. M. C., Ghahremani, M., Schmeing, M., Misdorp, W., Garderen, E. ve Pelletier, J., (1998). "Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia", *Breast Cancer Research and Treatment*, 50: 11-25.
- [61] Jerry, D. J., Dunphy, K. A. ve Hagen, M. J., (2010). "Estrogens, regulation of p53 and breast cancer risk: a balancing act", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67: 1017-1023.
- [62] Sternlicht, M. D. ve Werb, Z., (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior", *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17: 463-516
- [63] Li, H., Fan, X. ve Houghton, J., (2007). "Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer", *Journal of Cellular Biochemistry*, 101: 805-815.
- [64] Wooster, R., Neuhausen, S. L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T. ve Averill, D., (1994). "Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13", *Science*, 265: 2088-2090.
- [65] Peto, J., Collins, N., Barfoot, R., Seal, S., Warren, W., Rahman, N., Easton, D. F., Evans, C., Deacon, J. ve Stratton, M. R., (1999). "Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations in patients with early-onset breast cancer", *Journal of the National Cancer Institute*, 91: 943-949.
- [66] Vahteristo, P., Bartkova, J., Eerola, H., Syrjakoski, K., Ojala, S., Kilpivaara, O., Tamminen, A., Kononen, J., Aittomaki, K., Heikkila, P., Holli, K., Blomqvist, C., Bartek, J., Kallioniemi, O. P. ve Nevanlinna, H. A., (2002). "CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer", *American Journal of Human Genetics*, 71: 432-438.
- [67] Thompson, D., Duedal, S., Kirner, J., McGuffog, L., Last, J., Reiman, A., Byrd, P., Taylor, M. ve Easton, D. F., (2005). "Cancer risks and mortality in heterozygous *ATM* mutation carriers", *Journal of the National Cancer Institute*, 97:813-822.
- [68] Erin, N., Zhao, W., Ishirugo, K., Chase, G. ve Clawson, G., (2004). "Capsaicin-induced cell death", *The Journal of Biological Chemistry*, 99: 351-364.
- [69] Holly, J. M. ve Perks, C. M., (2008). "Cancer as an endocrine problem", *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 22: 539-550.
- [70] Belfiore, A. ve Frasca, F., (2008). "IGF and insulin receptor signalling in breast cancer", *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 13: 381-406.
- [71] Ying, S. Y., (2003). "Generation of cDNA libraries: Methods and Protocols", *Methods in Molecular Biology*, 221.
- [72] Dale, J. ve Schantz, M., (2002). "From genes to Genome", 110-116.
- [73] Primrose, S. B. ve Twyman, R. M., (2006). *Principles of gene manipulation and genomics*, 7. baskı, Blackwell Publishing, Oxford, UK.

- [74] Selzer, P. M., Marhöfer, R. J. ve Rohwer, A., (2008). Applied Bioinformatics, 1.baskı, Springer, Almanya.
- [75] Ewing, B., Hiller, L., Wendl, M. ve Green, P., (1998). "Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assesment", Genome Research, 8: 175-185.
- [76] NCBI, Vecscreen, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html> , 10 Şubat 2012.
- [77] Huang, X. ve Madan, A., (1999). "CAP3: a DNA assembly program", Genome Research, 9: 868-877.
- [78] Koltes, J. E., Hu, Z., Fritz, E. ve Reecy, J. M., (2009). "BEAP: The Blast extension and Alignment program- a tool for contig construction and analysis of preliminary genome sequence", BMC Res. Notes, 2: 11.
- [79] NCBI, Basic Blast, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, 20 Ekim 2011.
- [80] Aoki, H., Xu, J., Emili, A., Chosay, J., Golshani, A. ve Ganoza, M. C., (2007). "Interactions of elongation factor EF-P with the *Escherichia coli* ribosome", The FEBS Journal, 275: 671-682
- [81] Bagshaw, C. R., (2007). "Myosin mechanochemistry", Cell Press, 511-512.
- [82] Elmalı, E., Karaeren, Z., Özdöl, Ç. ve Akan, Ö. A., (2005). Akut koroner sendrom şüpheli hastalarda kardiyak troponin T ve troponin I'nın karşılaştırılması, Türk Biyokimya Dergisi, 30: 212-215.
- [83] Bağdatoğlu, Ö. T., (2008). Gastrointestinal kanserli hastalarda G protein $\beta 3$ geni (GNB3) C 825T polimorfizminin değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- [84] Dale, J. ve Schantz, M., (2002). "From genes to genome", 110-116.
- [85] MacEwen, E.G., (1990). "Spontaneous tumours in dogs and cats: models for the study of cancer and treatment ", Cancer and metastasis Reviews, 9: 125-36.
- [86] Bae, A.E. ve Brown, S.J., (2001). Etiology of cancer genetics, 6.baskı, DeVita VT, Hellman S., Rosenberg.
- [87] Klopffleisch, R., Hvid, H., Klose, P., Costa, A. ve Gruber, A. D., (2010). "Insulin receptor is expressed in normal canine mammary gland and benign adenomas but decreased in metastatic canine mammary carcinomas similar to human breast cancer", Veterinary and Comparative Oncology, 8: 293-301.
- [88] Pollak, M., (2008). "Targetting insulin and insulin-like growth factor signalling in oncology", Current Opinion in Pharmacology, 8: 384-392.
- [89] El-Rehim, D. M. A., Ball, G., Pinder, S.E., Rakha, E., Paish, C., Robertson, F. R, Macmillan, D., Blamey, R. ve Ellis, I. O., (2005). "High-throughput protein

expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses”, 116: 340-350.

- [90] Minareci, S., Lekili, M., Ayder, A. R., Durgun, M. N. ve Sayın, A. Y., Postacı, H., (1993). Testisin leydig hücreli tümörü, Türk Üroloji Dergisi, Sayı 4, 19: 347-349
- [91] Sugiyama, H., (2010). “WT1 (Wilms’ tumor gene 1): Biology and cancer immunotherapy”, Japanese Journal of Clinical Oncology, 40: 377-387.
- [92] Asano, Y., Ihn, H., Jinnin, M., Mimura, Y. ve Tamaki, K., (2006). “Involvement of alphavbeta5 integrin in the establishment of autocrine TGF-beta signaling in dermal fibroblasts derived from localized scleroderma”, Journal of Investigative Dermatology, 126:1761-9.
- [93] Klaus, A. ve Birchmeier, W., (2008). “Wnt signalling and its impact on development and cancer”, Nature Reviews, 8: 387-398.
- [94] Taki, M., Kamata, N., Yokoyama, K., Fujimoto, R., Tsutsumi, S. ve Nagayama, M., (2003). “ Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithal-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells”, Cancer Science, 94: 593-597.
- [95] Nault, J. C., Fabre, M., Counchy, G., Pilatti, C., Jeannot, E., Nhieu, J. T. V. N., Saint-Paul, M., Muret, A., Redon, M., Buffet, C., Salenave, S., Balabaud, C., Prevot, S., Labrune, P., Sage, P., Scoazec, J., Chanson, P., Jessica, Z., (2012). “GNAS-activating mutations define a rare subgroup of inflammatory liver tumors characterized by STAT3 activation”, Journal of Hepatology, 56: 184-191.
- [96] Miller, G., Wang, E. L., Nassar, K. L., Peter, A. K. ve Crosbie, R.H., (2006). “Structural and functional analysis of the sarcoglycan-sarcospan subcomplex”, Experimental cell research, 313: 639-651.
- [97] Crosbie, R. H., Lim, L. E., Moore, S. A., Hirano, M., Hays, A. P., Maybaum, S. W., Collin, H., Dovico, S. A., Stolle, C. A., Fardeau, M., Tomé, F. M. S. ve Campbell, K. P., (2000). “Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan-sarcospan interactions”, Human Molecular Genetics, 9 (13): 2019 – 2027.
- [98] Sweet-Cordero, A., Mukherjee, S., Subramanian, A., You, H., Roix, J. J., Ladd-Acosta, C., Mesirov, J., Golub, T. R. ve Jacks, T., (2005). “An oncogenic KRAS2 expression signature identified by cross-species gene expression analysis”, Nature Genetics”, 37: 48-55.
- [99] Sebolt-Leopold, J. S. ve Herrera, R., (2004). “Targetting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer”, Nature Reviews Cancer, 4: 937-947.
- [100] Backofen, B. ve Leeb, T., (2002). “Genomic organization of the Murine Aminomethyltransferase gene (Amt)”, Full Length Research Paper, 13: 179-183.

- [101] Kotake, S., Yago, T., Kawamoto, M. ve Nanke, Y., (2012). "The role of T-cell leukemia translocation-associated gene protein in human tumorigenesis and carcinogenesis", *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012: 8.
- [102] Chen, S., Xiao, L., Liu, Z. ve Liu, Y., (2011). "Pituitary tumor transforming gene-1 haplotypes and risk of pituitary adenoma: a case-control study", *BMC Medical Genetics*, 12: 44.
- [103] Hayes A. J., Huang, W. Q. ve Yu, J., (2000). "Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer", *British Journal of Cancer*, 83: 1154-1160.
- [104] Fonscca, F. P. P., Ike, P. T. L., Assis, D. M., Icimoto, M. Y., Juliano, M. A., Juliano, L., Puzer, L. ve Henrique-Silva, F., (2011). "Leviserpin: A serine peptidase inhibitor (Serpine) from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*", 30: 404-412.
- [105] Pitera, J. E., Scambler, P. J. ve Woolf, A. S., (2008). "Fras1, a basement membrane-associated protein mutated in Fraser syndrome, mediates both the initiation of the mammalian kidney and the integrity of renal glomeruli", *Human Molecular Genetics*, 17: 3953-3964.
- [106] Watanabe, N., Niitsu, Y., Yamauchi, N., Neda, H., Sone, H., Maeda, M. ve Urushizaki, I., (1987). "Cell cycle specificity of tumor necrosis factor and its receptor", *Sciverse*, 11: 813-817.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Burçin TELLİOĞLU
Doğum Tarihi ve Yeri :KOCAELİ/ 10.01.1985
Yabancı Dili :İngilizce, Portekizce
E-posta :burcintellioglu@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2012
Lisans	Biyoloji Öğretmenliği	Marmara Üniversitesi	2008
Lise	Fen Bilimleri	Sami Yangın Anadolu Lisesi	2003

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2011-Devam ediyor	Fen Bilimleri Dershanesi	Müdür Yardımcısı
01.2008-04.2008	Gilbert High School-USA/Iowa	Biology Teacher

06.2007-10.2007 Shaws Supermarket-USA/NewHampshire Sales Assistant