



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



KÖPEK MEME TÜMÖRLÜ (KMT) HASTALARDA PALB2 GENİ WD40 DOMAINİ GENETİK ANALİZİ

Özge Şebnem ÇILDIR

GENETİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Özge ÖZMEN

ANKARA

2022

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÖPEK MEME TÜMÖRLÜ (KMT) HASTALARDA
PALB2 GENİ WD40 DOMAINİ GENETİK ANALİZİ**

Özge Şebnem ÇILDIR

GENETİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Özge ÖZMEN

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü'nün (19L0239005) proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2022

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Köpek meme tümörlü (KMT) hastalarda *PALB2* geni *WD40* domaini genetik analizi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Özge Şebnem Çıldır

Tarih:

İmza:

Kabul ve Onay

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Genetiği Anabilim Dalında Özge Şebnem ÇILDIR tarafından hazırlanan “Köpek Meme Tümörlü (KMT) Hastalarda *PALB2* Geni *WD40* Domaini Genetik Analizi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/01/22

Prof.Dr. Hilal ÖZDAĞ SEVGİLİ

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof.Dr. Ali RİŞVANLI

Fırat Üniversitesi

Üye

Prof.Dr. R. Gözde ÖZALP

Uludağ Üniversitesi

Üye

Doç.Dr. Bengi ÇINAR KUL

Ankara Üniversitesi

Üye

Doç.Dr. Özge ÖZMEN

Ankara Üniversitesi

Raportör

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof.Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xii
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kuramsal Temeller	3
1.2. Epidemiyolojik Çalışmalar ve KMT Gelişimine Etki Eden Faktörler	4
1.2.1. KMT Epidemiyolojisi	5
1.2.2. KMT Risk Faktörleri	13
1.2.2.1. Yaş	13
1.2.2.2. Beslenme	14
1.2.2.3. Hormonal Etkiler	15
1.2.2.4. Irk Etkisi	22
1.2.2.5. KMT'ne Predispozisyon Yaratan Germ Hattı Mutasyonları	23
1.3. KMT Patolojisi ve KMT'lerinin Derecelendirilmesi	31
1.4. KMT Vakalarının Teşhis ve Tedavisi	35
1.5. KMT ve İnsan Meme Tümörleri Arasındaki Benzerlikler	37
1.6. HR Aracılı DNA Tamir Mekanizması ve KMT Gelişimi Üzerine Etkileri	43
1.6.1. BRCA2, RAD51 ve PALB2 Tümör Baskılayıcı Kompleksi	47
1.6.2. <i>PALB2</i> Geni ve Proteini	49
1.6.2.1. <i>PALB2</i> Geni <i>WD40</i> Domaini ve İşlevleri	58
1.6.2.2. <i>PALB2</i> ve <i>BRCA2</i> Proteinleri Arasındaki Etkileşim	59
1.6.2.3. <i>PALB2</i> ve <i>RAD51</i> Proteinleri Arasındaki Etkileşim	61
1.6.2.4. Köpeklerde <i>PALB2</i> Genine İlişkin Yapılmış Çalışmalar	62
1.6.2.5. İnsan Meme Tümöründe <i>PALB2</i> Genine İlişkin Yapılmış Çalışmalar	63
2. GEREÇ ve YÖNTEM	85
2.1. DNA İzolasyonu, DNA Kalite ve Kantitesi ile Bütünlüğünün Kontrolü	87
2.2. Gen Bölgelerinin Yükseltgenmesi ve Saflaştırılması	87
2.3. Zincir Sonlandırma Reaksiyonları	90
2.4. Kapiller Jel Elektroforezi	92

2.5. Elektroferogramların Kontrolü ve Hazırlanması	93
2.6. Biyoinformatik Analizler	93
3. BULGULAR	106
3.1. DNA İzolasyonu, DNA Kalite ve Kantitesi ile Bütünlüğünün Kontrolü	106
3.2. Gen Bölgelerinin Yükseltgenmesi ve Saflaştırılması	106
3.3. DNA Dizi Analizleri	107
3.4. Biyoinformatik Analizler	112
3.4.1. <i>PALB2</i> Geni İntron 6 Varyantının Etkileri	112
3.4.2. <i>PALB2</i> Geni Ekzon 7 Varyantının Etkileri	113
3.4.3. <i>PALB2</i> Geni Ekzon 13 Varyantının Etkileri	118
3.4.4. <i>PALB2</i> Geni 3' UTR Varyantının Etkileri	121
3.4.5. <i>BRCA2</i> Geni İntron 2 Varyantının Etkileri	122
3.4.6. Protein Etkileşimleri	123
3.4.7. Varyantların İnsan Genomunda Tümör ile Olası İlişkileri	125
3.4.7.1. <i>PALB2</i> İntron 6	126
3.4.7.2. <i>PALB2</i> Ekzon 7	127
3.4.7.3. <i>PALB2</i> Ekzon 13	128
3.4.7.4. <i>PALB2</i> 3' UTR Bölgesi	129
3.4.7.5. <i>BRCA2</i> İntron 2	130
3.5. <i>PALB2</i> Genine İlişkin DnaSP ver. 6.12.03 Verileri	131
4. TARTIŞMA	133
4.1. Örneklem Grubunun Varyantlar Açısından Değerlendirilmesi	134
4.2. Varyantların Protein Yapısı ve Fonksiyonuna Etkileri	152
4.2.1. <i>PALB2</i> Geni İntron 2 Varyantı	152
4.2.2. <i>PALB2</i> Geni Ekzon 7 Varyantı	153
4.2.3. <i>PALB2</i> Geni Ekzon 13 Sinonim Varyantı	171
4.2.4. <i>PALB2</i> Geni 3' UTR Varyantı	175
4.3. Fonksiyonel Çalışmalara İlişkin Öneriler	178
4.4. <i>BRCA2</i> , <i>RAD51</i> ve <i>PALB2</i> Etkileşimlerinin Değerlendirilmesi	182
4.5. Varyantların İnsan ve Köpek Türleri Arasında Karşılaştırılması	189
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	192
ÖZET	196
SUMMARY	197
KAYNAKLAR	198
ÖZGEÇMİŞ	254

ÖNSÖZ

Köpek meme tümörleri (KMT) dişi köpeklerde en sık görülen tümör tipidir. Veteriner hekimlik alanındaki öneminin yanı sıra, insan meme tümörü vakaları ile yüksek oranda benzerlik gösteren bu tümörler, köpek türünün insan meme tümörü vakalarında model olarak kullanılabileceğine ilişkin görüşler oluşmasına neden olmuştur. İnsanlarda kimi çalışmalarda orta, kimi çalışmalarda ise yüksek düzeyde meme tümörü riski ile ilişkilendirilmiş olan *PALB2* mutasyonları homolog rekombinasyon aracılı DNA tamir mekanizmasında (HR) tümör baskılayıcı rolüyle sıklıkla çalışılmasına karşın, köpeklerde bu genin mutasyonları, HR ve KMT üzerindeki etkileri ilk kez “Köpek Meme Tümörlü (KMT) Hastalarda *PALB2* Geni *WD40* Domaini Genetik Analizi” başlığı altındaki doktora tezi kapsamında araştırılmıştır. Tez çalışmasına ilişkin sonuçlar gerek KMT açısından gerekse insanlardaki meme tümörü vakaları ile KMT karşılaştırmaları açısından yapılacak yeni çalışmaların önünü açacaktır.

Doktora öğrenim sürecim boyunca her zaman yanımda olan, maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan aileme, başta sabrı ve çözüm odaklı yaklaşımları ile bana her zaman yol gösteren ve daima yanımda olan tez danışmanım sayın Doç. Dr. Özge Özmen olmak üzere, doktora öğrenimim boyunca ders aldığım ve tez izleme komitemde bana yol gösteren kıymetli hocalarım sayın Doç. Dr. Bengi Çınar Kul ve sayın Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili hocalarıma; birçok tekniği öğrenmemde katkıları bulunan sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Nüket Bilgen’e, birlikte yaptığımız çalışmalarda ekip çalışmasını öğrendiğim, arkadaşlığı bulduğum ve fikir alışverişleri ile bakış açımı genişleten Beylan Canbulat, Araş. Gör. Mustafa Yenal Akkurt, Sevim Isparta, Zeynep Bars Yıldırım, Ezgi Nur Ertan, Büşra Cumhuriyet ve ismini sayamayacağım daha birçok arkadaşıma, manevi desteklerinden ötürü Farmakoloji Anabilim Dalı’ndan Araş. Gör. Dr. Farah Gönül Aydın’a, Genetik Anabilim Dalı Sekreteri Birol Kalender ve fakültemizin güler yüzlü personeli Murat Taşkıran’a desteklerinden ötürü teşekkür ederim.

Tez projesinin desteklenmesini sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve 2211-C öncelikli alan bursu ile maddi sıkıntılarımı düşünmeksizin tez projeme odaklanmamı sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkürü borç bilirim.



SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
Å	Angstrom
aa	Amino asit
ACTH	Adrenokortikotropin
AKC	<i>American kennel club</i>
β	Beta
bç	Baz çifti
BI-RADS	Meme görüntüleme raporlama ve veri sistemi
°C	Santigrat derece
CAS	Kanser ilişkili stroma
cDNA	Komplementer DNA
CDS	Protein kodlayan bölge
cm	Santimetre
CNV	Kopya sayısı varyasyonu
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü

EMSA	Elektroforetik hareketlilik kaydırma analizi
EMT	Epitelyal mezenkimal transisyon
ER	Östrojen reseptörü
ESE	Ekzon bölgesinde <i>splice</i> 'ı kuvvetlendiren yardımcı motif
ESS	Ekzon bölgesinde <i>splice</i> 'ı baskılayan yardımcı motif
Eta	Toplam mutasyon sayısı
ExAC	Ekzom toplama konsorsiyumu
FCI	Dünya köpek organizasyonu
FRET	Floresan rezonans enerji transferi
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GH	Büyüme hormonu
GHR	Büyüme hormonu reseptörü
GWAS	Genom boyu ilişkilendirme çalışması
HGVS	<i>Human genome variation society</i>
HR	Homolog rekombinasyon
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IU	İnternasyonal ünite
k	Nükleotit farklılıklarının ortalama sayısı
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
KMT	Köpek meme tümörü
kV	Kilovolt

μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar
miRNA	Mikro RNA
mM	Milimolar
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
mRNA	Mesajcı RNA
Mt	Mutant dizi
ng	Nanogram
NHEJ	Homolog olmayan uç birleştirme
NJ tree	<i>Neighbour-joining tree</i>
nm	Nanomol
NMD	<i>Nonsense mediated decay</i>
nt	Nükleotit
ObR	Leptin reseptörü
OTR	Oksitosin reseptörü
PALB2	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>
Pi	Bölge başına nükleotit çeşitliliği
Polh	DNA polimeraz eta
PPI	Protein-protein etkileşimi
PR	Progesteron reseptörü
PRL	Prolaktin
PRLR	Prolaktin reseptörü

PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PZR	Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
S	Değişken bölge sayısı
siRNA	<i>Small interfering</i> RNA
sn	Saniye
SPR	Yüzey plazmon rezonans spektroskopisi
STH	Somatotropin
TBE	Tris borik asit EDTA
TF	Transkripsiyon faktörü
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
TNP	Tekli nükleotit polimorfizmi
TNV	Tekli nükleotit varyantı
tRNA	Taşıyıcı RNA
TSH	Tiroid uyarıcı hormon
UTR	Translasyonu yapılmayan bölge
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein kolesterol
Wt	Yabanıl dizi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. HR basamakları sinaps aşaması	46
Şekil 1.2. <i>NCBI</i> veri tabanında köpek <i>PALB2</i> genine ilişkin genomik pozisyon bilgileri	51
Şekil 1.3. <i>NCBI</i> veri tabanındaki köpek <i>PALB2</i> genine ait transkriptler	52
Şekil 1.4. <i>Ensembl</i> veri tabanında <i>PALB2</i> genine ilişkin kayıtlar	52
Şekil 1.5. <i>Ugene</i> programında <i>ClustalW</i> ile hizalanmış primer transkriptlere ait bir görsel	54
Şekil 1.6. <i>Ugene</i> programında <i>ClustalW</i> ile hizalanmış primer transkriptlere ait bir görsel	54
Şekil 1.7. <i>Uniprot</i> veri tabanında köpek <i>PALB2</i> proteinlerine ilişkin arama sonuçları	54
Şekil 1.8. J9NVL4 ve A0A5S9I5Z8 kodlu <i>PALB2</i> proteinlerinin karşılaştırılması	56
Şekil 1.9. Köpek türüne ait <i>PALB2</i> proteinlerinde <i>WD40</i> domaini bölgeleri	57
Şekil 1.10. <i>PALB2</i> geni <i>WD40</i> domaini yapısı	59
Şekil 1.11. İnsan <i>PALB2</i> proteini <i>WD</i> tekrarlarının amino asit pozisyonları	59
Şekil 1.12. Köpek <i>PALB2</i> proteini <i>WD40</i> domaini amino asit pozisyonları	59
Şekil 1.13. <i>BRCA2</i> - <i>PALB2</i> kompleksinin yapısı	60
Şekil 1.14. <i>BRCA2</i> etkileşim bölgesinin farklı türlerde amino asit dizileri	61
Şekil 1.15. <i>UniProt</i> veri tabanında dördüncü ve beşinci <i>WD</i> tekrarı bölgelerinin insan ve köpek türlerindeki pozisyonları	61
Şekil 1.16. <i>PALB2</i> proteini <i>WD40</i> domaininin insan ve köpek türlerinde karşılaştırılması	62
Şekil 1.17. <i>RAD51</i> proteininin <i>PALB2</i> ile etkileşim bölgesinin insan ve köpek türlerinde karşılaştırılması	62

Şekil 2.1. Biyoinformatik analiz basamakları ve kullanılan araçlar	94
Şekil 3.1. DNA izolatlarının %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü	106
Şekil 3.2. Çalışmada gerçekleştirilen reaksiyonlara ilişkin örnek bir %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü	106
Şekil 3.3. WD40D1 PZR ürünlerine ait sekanslar ve örneklemin intron 6'daki g.22220063C>G varyantı açısından durumu	107
Şekil 3.4. İntron 6'daki g.22220063C>G varyantına ait elektroferogram görüntüleri	107
Şekil 3.5. WD40D2 PZR ürünlerine ait sekanslar ve örneklemin ekzon 7'deki c.3149C>T varyantı açısından durumu	108
Şekil 3.6. Ekzon 7'deki c.3149C>T varyantına ait elektroferogram görüntüleri	108
Şekil 3.7. WD40D8 PZR ürünlerine ait sekanslar ve örneklemin ekzon 13'teki c.4062C>T varyantı açısından durumu	109
Şekil 3.8. Ekzon 13'teki c.4062C>T varyantına ait elektroferogram görüntüleri	109
Şekil 3.9. WD40D8 PZR ürünlerine ait sekanslar ve örneklemin 3' UTR bölgesindeki c.4071T>C varyantı açısından durumu	110
Şekil 3.10. Ekzon 13'teki c.4071T>C varyantına ait elektroferogram görüntüleri	110
Şekil 3.11. <i>BRCA2</i> geni E3 primer seti PZR ürünlerine ait sekanslar ve örneklemin g.7794120C>T varyantı açısından durumu	111
Şekil 3.12. <i>BRCA2</i> geni intron 2'deki g.7794120C>T varyantına ait elektroferogram görüntüleri	111
Şekil 3.13. <i>PALB2</i> ve <i>BRCA2</i> genlerinde tespit edilen varyantların örneklemdaki dağılımı	112
Şekil 3.14. <i>ConSurf</i> sunucusunda köpek <i>PALB2</i> proteininin korunmuşluk düzeyine ait gösterge çizelgesi	114
Şekil 3.15. <i>SWISS-MODEL</i> ile oluşturulan <i>WD40</i> domaini modeli	115
Şekil 3.16. <i>Phyre2</i> ile görselleştirilen <i>WD40</i> domaini modeli	115

Şekil 3.17. <i>FTSite Binding Site Prediction</i> ligand bağlanma bölgesi analiz sonuçları	116
Şekil 3.18. <i>FunFOLD2</i> ligand bağlanma bölgesi analiz sonuçları	116
Şekil 3.19. Ekzon 7 varyantının <i>EX-SKIP</i> aracına göre <i>splice</i> mekanizmasına etkisi	118
Şekil 3.20. R1354R varyantına ilişkin <i>ConSurf</i> sunucusu sonucu	119
Şekil 3.21. <i>PALB2</i> genindeki zararlı sinonim mutasyonlar; <i>dbDSM v2.0</i> veri tabanı sonuçları	119
Şekil 3.22. Ekzon 13 varyantlarının <i>EX-SKIP</i> aracına göre <i>splice</i> mekanizmasına etkisi	120
Şekil 3.23. <i>STRING</i> veri tabanında <i>PALB2</i> proteini etkileşimleri	125
Şekil 3.24. İntron 6'da tespit edilen varyantın pozisyonu	126
Şekil 3.25. Ekzon 7'de tespit edilen varyantın pozisyonu	127
Şekil 3.26. Ekzon 13'te tespit edilen varyantın pozisyonu	128
Şekil 3.27. 3' UTR bölgesinde tespit edilen varyantın pozisyonu	129
Şekil 3.28. <i>BRCA2</i> intron 2'deki g.7794120C>T varyantının pozisyonu	130
Şekil 4.1. 85 köpek ırkının popülasyon yapısı	144
Şekil 4.2. Vonholdt ve ark. (2010) tarafından yapılmış genom boyu ilişkilendirme çalışması	147
Şekil 4.3. <i>PALB2</i> , <i>RAD51</i> ve <i>BRCA2</i> genlerinin etkileşim bölgelerinde tespit edilen sinonim olmayan varyantlar	183

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Tümörlerin sınıflandırılması	33
Çizelge 1.2. TNM sınıflandırması ve klinik evreler	34
Çizelge 2.1. Örneklerin dağılımı	85
Çizelge 2.2. Seçilen KMT vakalarına ilişkin bilgiler	86
Çizelge 2.3. <i>PALB2</i> geni <i>WD40</i> domainini ve <i>BRCA2</i> geni etkileşim bölgesini kodlayan bölgelerin yükseltgenmesi amacıyla tasarlanmış primer setleri	88
Çizelge 2.4. PZR'larda kullanılan kimyasalların konsantrasyon ve miktarları	89
Çizelge 2.5. PZR reaksiyonları için ısı-döngü cihazı protokolü	89
Çizelge 2.6. Ekzon 13 için tasarlanan sekans primerleri	91
Çizelge 2.7. <i>BigDye</i> reaksiyonu için <i>mastermix</i> protokolü	91
Çizelge 2.8. <i>BigDye</i> reaksiyonu için ısı-döngü cihazı protokolü	91
Çizelge 2.9. Kapiller jel elektroforezinde kullanılan enjeksiyon süreleri, akımı ve yürütme süresi bilgileri	92
Çizelge 2.10. Varyant türleri için kullanılan <i>in silico</i> analizler	94
Çizelge 3.1. İntron 6 varyantı <i>Human Splicing Finder</i> sonuçları	113
Çizelge 3.2. A1050V yanlış anlam mutasyonunun etkilerine ilişkin özet çizelge	114
Çizelge 3.3. <i>miRWalk</i> veri tabanında varyant bölgesine bağlanan miRNA'lar ve bağlanma bölgelerine ilişkin bilgiler	117
Çizelge 3.4. <i>AnimalTFDB3.0</i> veri tabanında köpek (<i>Canis familiaris</i>) türünde ekzon 7 bölgesinde tespit edilen transkripsiyon faktörleri	117
Çizelge 3.5. Ekzon 7 varyantı <i>Human Splicing Finder</i> sonuçları	118
Çizelge 3.6. <i>AnimalTFDB3.0</i> veri tabanında köpek (<i>Canis familiaris</i>) türünde ekzon 13'te tespit edilen transkripsiyon faktörleri	120

Çizelge 3.7. Ekzon 13 sinonim varyantı için <i>Human Splicing Finder</i> sonuçları	121
Çizelge 3.8. <i>AnimalTFDB3.0</i> veri tabanında köpek (<i>Canis familiaris</i>) türünde 3' UTR bölgesinde tespit edilen transkripsiyon faktörleri	121
Çizelge 3.9. 3' UTR varyantı için <i>Human Splicing Finder</i> sonuçları	122
Çizelge 3.10. <i>AnimalTFDB3.0</i> veri tabanında köpek (<i>Canis familiaris</i>) türünde intron 2 bölgesinde tespit edilen transkripsiyon faktörleri	122
Çizelge 3.11. İntron 2 bölgesi için <i>Human Splicing Finder</i> sonuçları	123
Çizelge 3.12. <i>IntAct</i> veri tabanında köpekte de PALB2 proteini ile etkileşimde olan proteinler ve etkileşim bölgeleri	124
Çizelge 3.13. VEP taramasında kullanılan HGVS tanımlayıcıları	126
Çizelge 3.14. Haplotipler ve DNA dizilerinin haplotiplere göre dağılımı	132
Çizelge 3.15. <i>PALB2</i> geni <i>WD40</i> domaini nükleotit dağılımları	132
Çizelge 4.1. <i>PALB2</i> varyantlarının tümör histopatolojilerine göre dağılımı	135
Çizelge 4.2. <i>PALB2</i> varyantlarının histolojik derecelere göre dağılımı	137
Çizelge 4.3. <i>PALB2</i> varyantlarının akciğer metastazis durumuna göre dağılımı	138
Çizelge 4.4. <i>PALB2</i> varyantlarının yaş (köpek yaşı) gruplarına göre dağılımı	140
Çizelge 4.5. Örneklem grubuna ait yaşlar ve tümör tipi ve histopatolojileri	141
Çizelge 4.6. FCI sınıflandırmasına göre örneklemdeki bireyler ve varyant dağılımları	143
Çizelge 4.7. Şekil 4.1'deki popülasyon dağılımına göre varyantların durumu	145
Çizelge 4.8. Vonholdt ve ark. (2010)'nın çalışması sonucunda elde edilen haplotip grupları, FCI sınıflandırması ve varyantların dağılımı	149
Çizelge 4.9. Fonksiyonel analizlerle desteklenen zararlı varyantların bulunduğu bireylere ilişkin veriler	186
Çizelge 4.10. Örneklemdeki bireyler ve bu bireylerde protein-protein etkileşimlerini etkileyebilecek varyant sayıları	187

1. GİRİŞ

Hücrelerden herhangi birinin otonomi kazanarak canlının kontrol mekanizmalarının etkisinde kalmadan, sınırsız çoğalması sonucunda oluşan, normal dokulara kıyasla çok daha hızlı bir şekilde gelişen ve oluşmasına etken olan sebep ya da sebepler ortadan kalktıktan sonra dahi büyümesini sürdüren yeni doku oluşumları tümör adını almaktadır (Erer ve Kıran, 2005).

Meme tümörleri kadınlarda en yaygın görülen tümör tipidir (Ferlay ve ark., 2015). Miki ve ark. (1994), insan 17'nci kromozomunda meme ve ovaryum kanseri duyarlılık geni olan *BRCA1* 'i, Wooster ve ark. (1994) ise 13'üncü kromozomda diğer bir meme kanseri duyarlılık geni olan *BRCA2* 'yi keşfetmişlerdir. 2001 yılında insan genom projesinin tamamlanmasından bu yana (Lander ve ark., 2001) meme tümörlerinin biyolojisinin anlaşılması üzerine birçok çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir.

Meme tümörleri insanlarda görülmelerinin yanı sıra, çeşitli türlerde de gözlenebilmektedir (Greenacre, 2004; Hamilton, 1974 ve Munson ve Moresco, 2007). Sığır (*Bos taurus*), at (*Equus caballus*), domuz (*Sus scrofa domesticus*), koyun (*Ovis aries*) ve keçi (*Capra hircus*) gibi evcil hayvanlarda spontan meme tümörü vakalarının nadir olarak gözleendiği veya bildirilmediği belirtilmektedir (Hamilton, 1974 ve Munson ve Moresco, 2007). Yaban hayvanlarından orman kedisi (*Felis chaus*), puma (*Puma concolor*), jaguar (*Panthera onca*), leopar (*Panthera pardus*), aslan (*Panthera leo*), kaplan (*Panthera tigris*), siyah ayaklı gelincik (*Mustela nigripes*), Kaliforniya deniz aslanı (*Zalophus californianus*), misk kedisi (*Arctictis binturong*), beyaz balina (*Delphinapterus leucas*), kızıl kanguru (*Macropus rufus*), Parma valabisi (*Macropus parma*), uçan kuskus (*Petaurus norfolcensis*) ve Tazmania canavarı (*Sarcophilus harrisii*) gibi türlerde bildirilen vakalar mevcuttur (Munson ve Moresco, 2007). Deney hayvanları ve küçük memeliler söz konusu olduğunda ise kobay (*Cavia porcellus*),

Afrika kirpisi (*Atelerix albiventris*), Rus hamsteri (*Phodopus sungorus*), fare (*Mus musculus*) ve sıçanlarda (*Rattus norvegicus*) spontan meme tümörleri görülebildiği bildirilmiştir (Greenacre, 2004). Kedi (*Felis catus*) ve köpeklerde (*Canis familiaris*) tümör olgularının diğer türlerden daha sık görüldüğü bildirilmektedir (Gamlem ve ark., 2008 ve Munson ve Moresco, 2007). Yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre, köpeklerdeki tümör insidansı, kedilerdeki tümör insidansının yaklaşık iki katı kadardır (Dorn ve ark., 1967).

Köpek meme tümörleri (KMT) dişi köpeklerde en yaygın görülen tümör tipidir (Dobson ve ark., 2002; Gamlem ve ark., 2008; Merlo ve ark., 2008; Moulton ve ark., 1970; Sleenckx ve ark., 2011; Sorenmo, 2003 ve Vascellari ve ark., 2009). 2005 yılında köpek genom sekansının tamamlanmasından (Ostrander ve Wayne, 2005) sonra, köpekler için oldukça önemli bir sağlık sorunu olan KMT'nin biyolojisinin anlaşılması üzerine yapılan moleküler çalışmalar artış göstermiştir.

Karşılaştırmalı onkoloji alanında insanlarda görülen tümör vakaları ile köpeklerde görülen tümör vakaları arasında yüksek oranda benzerlik görüldüğü bildirilmekte, köpeklerde yapılan çalışmaların insanlardaki tümör vakalarında model organizma olarak kullanılma potansiyeline dikkat çekilmektedir (Waters ve Wildasin, 2006). Köpeklerde yaşam süresi insanlara kıyasla oldukça kısadır ayrıca ırk, vücut büyüklüğü ve akrabalık derecesine göre değişiklik göstermektedir (Galis ve ark., 2007; Patronek ve ark., 1997 ve Yordy ve ark., 2020). *American Kennel Club* (AKC) web sitesinde (<https://www.akc.org>) kinoloji federasyonunca kabul edilen ırkların ortalama yaşam süreleri, cüsseleri gibi bilgilere ulaşılabilmekte ve güncel olarak kullanılan köpek-insan yaşı kıyaslama tablosuna erişilebilmektedir (The American Kennel Club, 2021). Yapay seçim sonucunda meydana gelen birçok köpek ırkı bulunmakta, bu ırkların bazılarında kanser veya diğer hastalıklara ilişkin genetik yatkınlık görülebilmektedir (Ostrander ve Wayne, 2005). Evciltme ile birlikte insan ve köpek türleri yakın temas halinde bulunmakta ve aynı çevresel etkilere maruz kalmaktadırlar (Gamlem ve ark., 2008 ve Waters ve Wildasin, 2006). Farklı kanser tiplerinde tedavi veya kanser gelişiminin önlenmesi için yeni yöntemler geliştirilmekte ve bu yöntemlerin köpeklerde ve insanlarda denenmesi söz konusu olabilmektedir (Waters

ve Wildasin, 2006). Tümör vakalarının köpeklerde spontan olarak gelişmesi, yaygın olarak görülmesi (Dobson ve ark., 2002; Gamlem ve ark., 2008; Hamilton, 1974; Merlo ve ark., 2008; Moulton ve ark., 1970; Sleenckx ve ark., 2011; Sorenmo, 2003 ve Vascellari ve ark., 2009) ve insan tümörleri ile benzer maligniteler göstermesi ile iki tür arasındaki anatomik ve fizyolojik benzerlikler (Khanna ve ark., 2006) köpek türünün insanlarda tümör çalışmaları için en uygun model organizma olduğunu göstermektedir (Waters ve Wildasin, 2006). Bu amaçla, 2004 yılında hem veteriner hem de insan tümör araştırmalarının ortaklaşa yürütülebilmesi için Köpek Karşılaştırmalı Onkoloji ve Genomik Konsorsiyumu kurulmuştur, ancak henüz örneklenen tümör tipleri KMT vakalarını kapsamamaktadır (Khanna ve ark., 2006 ve Mazcko ve Thomas, 2015).

1.1. Kuramsal Temeller

Kanser, genetik ve epigenetik bozukluklar nedeniyle gelişen bir hastalıktır (Rivera ve von Euler, 2011). Kanser gelişimini etkileyen genetik faktörlerin başında DNA tamir mekanizmalarının bozulması gelmektedir (Bhattacharjee ve Nandi, 2016). BRCA2, RAD51 ve PALB2 (*Partner and Localizer of BRCA2*) proteinleri arasındaki etkileşimler, DNA iplikliğinin hatasız tamirini sağlayan homolog rekombinasyon aracılı DNA tamir mekanizmasında kilit rol oynamaktadır (Sun ve ark., 2020). BRCA2 ve RAD51 proteinlerinin birbirleri ve PALB2 proteini ile etkileşime geçtikleri domainlere ait nükleotit dizilerindeki somatik varyantlar daha önce aynı örneklemdeki köpeklere ait tümör dokularında yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Ozmen ve ark., 2017a ve Ozmen ve ark., 2017b).

Sunulan tez çalışması, *PALB2* geni *WD40* domainindeki germ hattı mutasyonlarının meme tümörü gelişimi ve malignitesi üstünde doğrudan veya dolaylı olarak (protein-protein etkileşimleri ile) etkili olabileceği hipotezi üzerine kurulmuştur. Bu hipotezin test edilebilmesi amacı ile PALB2 proteininin BRCA2 ve RAD51 proteinleri ile etkileşime geçtiği bilinen *WD40* domainine ait nükleotit

dizilerindeki germ hattı varyantlarının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında;

Köpeklerde daha önce araştırılmamış olan *PALB2* geninde tümörlü bireylerden alınan kanlardan izole edilen DNA'larda varyasyonlar taranarak tümörle ilişkili olabilecek varyantların tespit edilmesi,

Tespit edilen varyantların protein yapısı ve fonksiyonuna etkilerinin belirlenmesi ve proteinler arasındaki etkileşimleri nasıl etkilediğinin ortaya çıkartılması,

HR mekanizmasında önemli olduğu bilinen RAD51 ve BRCA2 proteinlerinde aynı popülasyonda daha önceden tespit edilmiş olan somatik varyantlardan hangileri ile birlikte görüldüklerinin tespit edilmesi,

Tümör gelişimi ve malignitesinin tespit edilen varyantlardan ne şekilde etkilendiklerine dair verilerin ortaya konulması,

Köpek ve insan meme tümörü vakalarında *PALB2* geni *WD40* domaininde benzer varyantların veya mutasyonların bulunup bulunmadığının ve bu olası varyantların türler arasında benzerlik gösterip göstermediğinin araştırılması,

Bir model organizma olarak düşünüldüğünde elde edilen veriler ışığında KMT vakalarının insan meme tümörü vakalarına model teşkil edip edemeyeceğinin tartışılması hedeflenmiştir.

1.2. Epidemiyolojik Çalışmalar ve KMT Gelişimine Etki Eden Faktörler

Dünya'nın çeşitli yerlerinde, farklı zaman dilimlerinde KMT vakalarına ilişkin yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur (Kelsey ve ark., 1998; Perez Alenza ve ark., 2000

ve Philibert ve ark., 2003). Bu çalışmalarda insidans, vakaların cinsiyet, yaş, ırk ve kısırlaştırma durumu ile tümör tiplerine göre (benign-iyi huylu veya malign-kötü huylu) dağılımları özetlenmeye çalışılmıştır.

1.2.1. KMT Epidemiyolojisi

Dorn ve ark. (1967)' nın Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Kaliforniya Eyaletinde Alameda ve Contra Costa bölgelerinde köpek ve kedilerde görülen malign (kötü huylu) tümör kayıtları üzerine yaptıkları çalışmada tümörlerin insidansı ile yaş, cinsiyet ve ırk faktörünün kanser gelişimindeki etkileri araştırılmıştır. Tüm malign tümörler (ağız ve yutak, deri, bağ doku, lenfosarkom, meme bezi, diğer bölgeler) göz önüne alındığında köpekler için tümör insidansı 100 000'de 381,2 olarak hesaplanmıştır. Meme tümörleri için ise bu oran 100 000'de 105,0 olarak belirlenmiştir. Tüm vakaların içerisinde en yüksek insidansa sahip tümörlerin KMT vakaları olduğu tespit edilmiş, erkek ve dişi cinsiyetlere göre KMT insidansı hesaplandığında oranlar sırasıyla 100 000'de 6,0 ve 198,8 olarak bulunmuştur. Erkek köpeklerdeki KMT vakalarının toplam vakaların %2,7'sini oluşturduğu gözlenmiştir. Meme tümörü vakalarında kısırlaştırılmamış köpeklerde meme tümörü gelişiminin kısırlaştırılmış köpeklerden yedi kat fazla olduğu bildirilmiştir. KMT gelişiminde ırk faktörünün etkileri incelendiğinde ise, safkan köpeklerde melez köpeklere oranla KMT vakalarının anlamlı derecede daha fazla görüldüğü belirtilmiştir. Yaş ile ilişkili hesaplamalar yapıldığında ise 10-11 yaşa kadar KMT insidansında artış görüldüğü, sonrasında ise bu oranın düştüğü bildirilmiştir.

Schneider (1970) ABD'nin Kaliforniya Eyaletinde Alameda ve Contra Costa bölgeleri kanser kayıtları üzerinde yaptığı çalışma ile insan ve köpek türlerinde görülen meme tümörü vakalarını yaş, cinsiyet ve insidans oranlarını göz önünde bulundurarak karşılaştırmıştır. Köpek yaşlarının yaklaşık insan yaşlarına dönüştürülmesi ile yapılan çalışmada, dişi köpeklerde KMT insidansının kadınlardaki meme tümörü oranlarının üç katı, erkek köpeklerdeki KMT insidansının ise erkek meme tümörü insidansının 16 katı olduğu belirtilmiştir. Tümör vakalarının yaşa bağlı

değişimleri incelendiğinde, kadınlarda menapoz yaşlarına kadar her iki türde tümör vakalarındaki artış paralel olarak seyretmiş, bu yaşlarda ise köpeklerde vakalar logaritmik olarak artmaya devam ederken, kadınlarda bu artışın yavaşladığı görülmüştür. Her iki türde tümör tiplerinin karşılaştırılması sonucunda, insanlarda vakaların %74,6'sı adenokarsinoma, %24,7'si karsinoma, %0,2'si sarkoma ve %0,5'i ise bilinmeyen tümör tipleri olarak tanımlanmıştır. Köpeklerde ise vakaların %76,1'i adenokarsinoma, %18'i malign miks meme tümörü, %2,8'i sarkoma, %1,1'i ise malign miyoepitelyoma olarak bulunmuş, oranların her iki türde benzer olduğu ifade edilmiştir.

Cohen ve ark. (1974), Pennsylvania Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne 1952-1953 yılları arasındaki klinik ve postmortem kayıtlara ait verileri derlemişlerdir. Bu kayıtlar incelendiğinde, kayıtların %4,2'sinde tümör bildirildiği; en yaygın tümör tipinin 864 vaka ile deri tümörleri, ikinci sırada ise 546 vaka ile meme tümörleri olduğu; meme tümörlerinin en çok *Fox terrier*, *Cocker spaniel* ve *Boston terrier* ırklarında görüldüğü belirtilmiştir. Çalışmada *Boxer* ırkının ise vücudun diğer bölgelerinde tümör oluşumuna yatkınlıklarına değinilirken meme tümörü vakalarından fazla etkilenmedikleri ifade edilmiştir.

MacVean ve ark. (1978), Tulsa köpek ve kedi neoplazi kayıtları ile yaptıkları çalışmada köpeklerin yaklaşık %1'inde tümör vakaları görüldüğünü bildirmişlerdir. Tümör insidansı 100 000 köpekte 1 126 olarak hesaplanmıştır. KMT vakalarının en sık görülen ikinci tümör tipi olduğu belirtilmiş ve en yaygın görülen malign tümörlerin meme tümörü vakaları olduğu ifade edilmiştir. KMT vakalarında benign tümörlerin malign tümörlere nazaran daha sık görüldüğü bildirilmiştir. Dişi köpeklerde KMT vakaları en sık *Pointer*, *Poodle* ve *Boston terrier* ırklarında görülmüştür. *Dachshund* ırkı ise KMT insidansı en düşük ırk olarak bildirilmiştir. İncelenen yaş grupları dikkate alındığında kısırlaştırılmamış dişi köpeklerde kısırlaştırılmış dişi köpeklere göre tümör vakalarına daha sık rastlanmıştır. *Pointer* ırkının ise bu durumun dışında kaldığı ifade edilmiştir.

Misdorp (1996), kanser etiyolojisi ve patogenezi aracılığıyla veteriner, insan ve karşılaştırmalı onkoloji alanlarındaki epidemiyolojik çalışmaları değerlendirmiştir. İnsan, köpek ve kedilerdeki primer tümörlerin insidansı yaşa bağlı olarak değerlendirildiğinde meme tümörü insidansı insanlar için yılda 100 000'de 43,6; köpekler için 50,9 ve kediler için 14,9 olarak hesaplanmıştır.

Perez Alenza ve ark. (2000)'ın, KMT vakalarının insidansını ve prognozunu etkileyen faktörlere ilişkin hazırladıkları derlemede epidemiyolojiye yönelik olarak yaş, kısırlaştırma durumu, progestagen uygulamaları ve erken yaşlarda obezite görülmesi ve ev yemeği ile beslenmenin KMT vakalarındaki etkilerine değinilmiş; yaş, cinsiyet, kısırlaştırma durumu, hormon uygulamaları ve diyet KMT insidansını etkileyen risk faktörleri olarak belirlenmiştir.

O'Brien ve ark. (2000), 1964-1994 yılları arasında Michigan'da toplanan insan ve köpek tümör vakalarına ait kayıtlar aracılığıyla kanser paternlerini konum (lokasyon) ve zamana bağlı olarak kıyaslamaya çalışmışlardır. Çalışma sonuçları köpeklerde ve insanlarda incelenen kanser vakalarının konumsal kümelenmesindeki süreçlerin birbirinden bağımsız olmadığını ve farklı coğrafi bölgelerde homojen bir şekilde dağılım göstermediğini ortaya koymuştur. Türden bağımsız şekilde 2 000 metrenin altında yapılan ölçeklendirmede, köpeklerde görülen aynı tipteki tümör vakalarının insanlara göre daha kısa mesafelerde daha yoğun bir şekilde kümelendiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada zamana bağlı olarak gerçekleştirilen karşılaştırmalarda ise türler arasında tümör vakalarının zamana bağlı olarak kümelendiğine ilişkin çok az kanıt olduğu belirtilmiştir.

Dobson ve ark. (2002), İngiltere'de sigortalı köpeklere ait kayıtlarda yaptıkları çalışmalarda 130 683 kayıttan 2 546'sında tümör ve tümör benzeri oluşum görüldüğünü bildirmişlerdir. Çalışmada meme tümörü insidansı 100 000'de 205 olarak belirtilmiştir. Meme tümörleri sınıflandırıldığında insidans oranları karsinomalar için 100 000'de 32; adenokarsinomalar için 100 000'de 18; adenomalar için 100 000'de 14; miks meme tümörleri için 100 000'de 11 ve diğer histopatolojiler için 100 000'de 129 olarak hesaplanmıştır. Yaş ile ilişkili incelemeler sonucunda meme tümörü

vakalarının genç bireylerde görece daha az görüldüğü; altı ve 10 yaşları arasında belirgin bir artış gösterdiği; 10 yaşından büyük bireylerde ise sıklığında düşüş görüldüğü bildirilmiştir. Tümör malignitesine bakıldığında ise malign tümörlerin (%26) benign tümörlerin (%13) iki katı oranında tespit edildiği görülmüş fakat tümörlerin çoğu (%61) sınıflandırılmamıştır. Meme bezinde tümör gelişimine ait insidansın genel tümör insidansından yedi kat fazla olduğu bildirilmiştir.

Egenvall ve ark. (2005), İsveç'te üç ve 10 yaşları aralığındaki sigortalı köpeklerle yaptıkları çalışmada, tüm köpekler göz önüne alındığında meme tümörü insidansının yılda 10 000'de 111; 1992 ve 1993 yılında doğan köpekler için ise yılda 10 000'de 154 olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada meme tümörü insidansının yaş ve ırk faktörlerinden etkilendiği bildirilmiştir. İlerleyen yaş ile birlikte meme tümörü vakalarında artış olduğu ifade edilmiştir. Bununla birlikte çalışmaya dahil edilen ırklarda meme tümörü insidansı en yüksek olan ilk 10 ırk sırasıyla *English springer spaniel*, *Doberman*, *Boxer*, *Softcoated wheatan terrier*, *American cocker spaniel*, *Yorkshire terrier*, *Leonberger*, *Bichon frise*, *German shepherd* ve *Papillon* olarak belirtilmiştir. Aynı çalışmada meme tümörü insidansı en düşük olan 10 ırk ise sırasıyla *Rough-haired collie*, *Finnish hound*, *Newfoundland*, *Tibetan spaniel*, *Finnish spitz*, *Shetland sheepdog*, *Bearded collie*, *Swedish hound*, *Border collie* ve *Tervueren* olarak tespit edilmiştir.

Merlo ve ark. (2008), İtalya'da köpek tümör kayıtları ile yaptıkları çalışmada evcil köpeklerdeki kanser vakalarının insidanslarını incelemişlerdir. 1985 ve 2002 yılları arasında toplanan 6 743 biyopsi örneğinden 3 303'üne (%48,9) kanser teşhisi konmuştur. Diğer biyopsilerin malign olmadığı belirtilmiştir. Dişi köpeklerde en sık rastlanan kanser vakalarının KMT vakaları olduğu ve tüm kanser vakalarının %70'ini KMT vakalarının oluşturduğu bildirilmiştir. Tüm kanser vakalarının insidansı erkek köpeklerde yılda 100 000'de 99,3; dişi köpeklerde 100 000'de 272,1 iken; KMT vakalarının insidansı dişi köpeklerde yılda 100 000'de 191,8 olarak hesaplanmıştır. Kanser frekansı üç yaşından küçük dişi köpeklerde %3,1; 11 yaşından büyük dişi köpeklerde ise %27,1 olarak hesaplanmıştır. Erkek köpeklerde ise üç yaşın altındaki bireylerde kanser frekansı %5,7; 11 yaşın üstündeki bireylerde ise %30 olarak

bulunmuştur. Kanser vakalarının %61'i melez köpeklerde, %31'i ise saf ırk köpeklerde tespit edilmiştir.

Gamlem ve ark. (2008), 1990 ve 1998 yılları arasında yapılan Norveç Köpek Kanser Projesi kapsamında elde edilen örneklerle çalışmışlardır. Meme tümörü insidansının tüm tümörler içinde %30 ile ikinci en çok rastlanan tümör grubu olduğu bildirilmiştir. Yapılan daha önceki çalışmalarla kıyaslandığında bu çalışmada meme tümörlerinin %94'ünü malign veya premalign lezyonların oluşturduğu belirtilmiştir. Çalışma verilerine göre iki ve üç yaş aralığında dişi köpeklerde KMT vakaları %10'luk frekans ile üçüncü sırada gelirken, dört ile beş yaş aralığında bu frekansın %35'e yükselmesi ile en sık görülen tümör tipi haline gelmektedir. Altı ile yedi yaş aralığında ise KMT vakalarının frekansı %46'ya ulaşmaktadır. Sekiz ile dokuz yaş aralığında aynı frekansta görülmeye devam ederken, 10 ile 11 yaşları aralığında %50'ye ulaşmaktadır. 12 ve 13 yaş aralığında ise KMT frekansı dişi köpeklerde azalmaya başlamakta ve 14 yaşından itibaren ise %40'a gerilemektedir.

Vascellari ve ark. (2009), İtalya'da yaptıkları çalışmada köpek ve kedilerde spontan olarak görülen tümör vakalarını incelemişlerdir. Köpeklerde görülen tüm tümör vakalarının insidansı yılda 100 000'de 282,2 olarak hesaplanmıştır. Malign ve benign tümörlerin erkek ve dişi bireylerde eşit olarak dağılım gösterdiği bildirilmiştir. Saf ırklarda malign tümör insidansının melezlerdeki tümör insidansından iki kat fazla olduğu ifade edilmiştir. Yaş artışına bağlı olarak ise tümör insidansının arttığı görülmüştür. Dişi köpeklerde en sık görülen tümörlerin meme tümörleri (%56) olduğu bildirilmiştir. Cinsiyet ayrımı yapılmaksızın incelendiğinde ise meme tümörlerinin %34,8 ile en sık görülen ikinci tümör tipi olduğu belirlenmiştir.

Grüntzig ve ark. (2015), 1955 ve 2008 yılları arasında İsviçre'de köpek kanser kayıtları üstünde retrospektif bir çalışma yapmıştır. Kayıtlı köpeklerin %51,83'üne tümör tanısı konmuştur. Tüm tümörler göz önünde bulundurulduğunda vakaların %47,07'sinin malign olduğu ifade edilmiştir. Meme tümörü vakaları %20,53 frekans ile en yaygın görülen ikinci tümör vakası olarak bildirilmiştir.

Salas ve ark. (2015), 2002 ve 2012 yılları arasında yapmış oldukları retrospektif çalışmada meme tümörü insidansını %16,8 olarak hesaplamışlardır. KMT vakalarının %47,7'sinin benign; %47,5'inin ise malign karakterde olduğu bildirilmiştir. KMT'nden etkilenen bireylerin %80'inin saf ırk köpeklerden oluştuğu; *Poodle*, *Cocker spaniel*, *German shepherd* ve *Labrador retriever* ırklarının KMT'den daha fazla etkilendikleri ifade edilmiştir. KMT insidansının en yüksek olduğu yaş grubunun dokuz ve 12 yaşları arasındaki yetişkin köpeklerden oluştuğu tespit edilmiştir. Kısırlaştırılmamış köpeklerde ise KMT insidansının daha yüksek olduğu ifade edilmiştir.

Andrade ve ark. (2017), yaptıkları retrospektif çalışmada Brezilya'da 2004 ve 2014 yılları arasında dişi köpeklerde görülen KMT vakalarını değerlendirmiş ve dişi köpeklerde görülen tümör vakalarının %40'ını KMT vakalarının oluşturduğunu bildirmişlerdir. Çalışılan köpeklerin bir ve 20 yaşları arasında oldukları; KMT için ortalama yaşın 9,99 olduğu ifade edilmiştir. Meme tümöründen en çok etkilenen ırkların melez (%39,56) köpekler olduğu; bu frekansı ise *Poodle* ırkının (%20,19) izlediği bildirilmiştir. *Poodle*, *Cocker spaniel*, *Pointer*, *Maltese*, *Yorkshire terrier* ve *Dachshund* ırklarının KMT'ye predispoze oldukları belirtilmiştir.

Pastor ve ark. (2018), İspanya'da Extremadura Üniversitesi Hayvan Hastanesi'nin Cerrahi Kliniği'ne 2008-2012 yılları arasında gelen hastalarda KMT vakaları üzerine bir epidemiyolojik çalışma yapmışlardır. Kliniğe gelen toplam 858 dişi hastadan 376'sının onkoloji hastası olduğu; bu hastaların 227'sinde ise meme tümörü bulunduğu bildirilmiştir. Çalışmaya göre dişi köpekler için onkolojinin en yaygın görülen patoloji olduğu (%43,82), meme tümörlerinin ise neoplaziler içinde en sık gözlenen olgular olduğu (%60,37) tespit edilmiştir. Ayrıca ırk, yaş ve hastanın boyutları göz önüne alındığında, melez bireylerde safkan köpeklerden daha çok meme tümörü olgusu görüldüğü ve bu olguların daha malign (kötü huylu) karakterde olduğu; artan yaşın tümör malignitesiyle arasında anlamlı bir doğru orantı bulunduğu ve büyük köpek ırklarının küçüklere göre KMT gelişimine daha duyarlı oldukları ifade edilmiştir.

Do Carmo Silva ve ark. (2019), Brezilya'da Espirito Santo'da patoloji laboratuvarına 2012-2016 yılları arasında gelen 255 dişi köpekte KMT vakalarına ilişkin epidemiyolojik bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada dişi köpeklerde görülen tüm neoplazilerin %50-70'inin KMT vakası olduğu ve tümör oluşumunun çiftleşme durumu ve hastanın yaşı ile doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir. Hastaların %48,6'sının birden fazla lezyona sahip olduğu bildirilen çalışmada, lezyonların %86,8'inin meme neoplazisi olduğu; bu neoplazilerin %67'sinin malign; %20'sinin ise benign olduğu; vakaların %26,7'sinin melez, %25,5'inin *Poodle*, %9,8'inin *Pinscher*, %4,7'sinin ise *Dachshund* ırkı köpekler olduğu ifade edilmiştir.

Ramesh ve ark. (2019), Chennai'de (Hindistan) 229 köpek tümör vakası arasındaki meme tümörlerinin insidansını hesaplamışlardır. Yapılan çalışma sonucunda KMT vakalarının tüm tümör vakaları arasındaki yüzdesi %34,94 olarak bulunmuştur. Popülasyonda ise KMT vakasına sahip bireylerin yüzdesi %0,11 olarak hesaplanmıştır. KMT insidansının en yüksek olduğu yaş aralığı sekiz ile 12 yaşları arası olarak bulunmuştur. KMT vakalarının en sık gözlemlendiği ırkın *Spitz* olduğunun bildirildiği çalışmada, saf ırklarda tümör olgularının daha fazla gözlemlendiği ifade edilmiştir.

Türkiye'de yapılmış çalışmalara odaklanıldığında, KMT epidemiyolojisine dair yapılmış pek fazla çalışma bulunmadığı görülmektedir. Yapılan çalışmaların çoğunlukla KMT patolojisi ile sınırlı kaldığı görülmektedir. Pamukçu ve Ertürk (1962), Ankara'da köpeklerde görülen tümör çeşitlerini incelemişlerdir. Bu çalışmada 1933 ve 1960 yılları arasında elde edilen 106 tümör vakası incelenmiş; en sık rastlanan tümörlerin 35 vaka ile meme tümörleri olduğu ifade edilmiştir. Ertürk ve ark. (1971), yine Ankara'da 1964 ve 1970 yılları arasında köpek ve kedilerde görülen tümörleri incelemişlerdir. İncelenen 52 tümörden yedisinin KMT olduğu belirlenmiştir. Köküslü ve Akkayan (1972) yaptıkları çalışmada 1968 ve 1972 yılları arasında Ankara'da kedi ve köpeklere ait primer meme tümörü vakalarını incelemişlerdir. İlgili yıl aralığında yalnızca 11 köpek ve üç kediye ait meme tümörü vakası geldiğini bildirmişlerdir. Çalışılan köpeklerden birinin yalnızca tümör; birinin benign tümör, diğer dokuz vakanın ise malign tümör olduğu ifade edilmiştir. Köpeklerin altı ve 18

yaşları arasındaki dişiler oldukları belirtilmiştir. Tümör vakası gözlenen bireylerin ırkları *Poodle*, *Pointer*, *Terrier*, *Boxer* ve melez olarak sınıflandırılmıştır. Vaka azlığı ise köpeklerle olan ilgisizliğe bağlanmıştır. Türkaslan ve ark. (1983), 1977 ve 1981 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesine getirilen diş köpeklerdeki meme tümörü olgularına dair bir çalışma yapmışlardır. Toplam 14 vakadan 11 adedi *Poodle*, üçü ise *Boxer* ırkı olarak bildirilmiştir. *Poodle* ırkı köpeklerin üç buçuk ile 14 yaş aralığında; *Boxer* ırkı köpeklerin ise üç ve 14 yaş aralığında oldukları belirtilmiştir. Erer ve Kıran (1993), Konya’da 1985 ve 1992 yılları arasında köpeklerde görülen tümör vakalarını incelemişlerdir. Süre zarfında 27 köpeğe ait (14 diş ve 13 erkek) 34 tümör vakası ele alınmıştır. Tümör oluşumlarının başta meme olmak üzere (%32,4) en çok diş genital sistemde (%44,1) olduğu ifade edilmiştir. Meme tümörlerinin %81,8’inin malign olduğu bildirilmiştir. Atalay Vural ve Aydın (2001), 1973 ve 1998 yılları arasında Ankara’da görülen KMT vakalarını incelemişlerdir. İlgili yıl aralığında incelenen 888 tümörün 236’sının (%26,5) KMT vakası olduğunu bildirmişlerdir. KMT örneklerinin 208’i diş, dokuzu erkek, 19’unun cinsiyeti bildirilmemiş köpeklerden alındığı ifade edilmiştir. İncelenen 236 vakanın 48’i (%23,08) *Poodle*, 40’ı (%19,23) *Toy poodle*, 30’u (%14,43) *Terrier*, 15’i (%7,21) *Pinscher*, 48’i (%23,08) 13 farklı ırka ait, 28’i (%11,86) ise hangi ırk olduğu bilinmeyen köpekler olarak bildirilmiştir. Farklı ırklara ait olduğu bildirilen tümör vakalarının, *Pointer*, *Setter*, Kangal, melez, *Cocker*, *Boxer*, *Dachshund*, *Doberman*, *Chivaua*, Afgan tazısı ve *Collie* ırklarına ait oldukları bildirilmiştir. Köpeklerin %96’sının 5-15 yaş arasında olduğu ifade edilmiştir. İncelenen tümörlerin 168’inin malign, 68’inin ise benign karakterde olduğu bildirilmiştir. Gülçubuk ve Gürel (2003), İstanbul’da 1995 ve 2000 yılları arasında köpeklerde görülen tümörleri incelemişlerdir. 182 tümör vakasından %40,10’unun diş genital sistemde bulunduğu, diş genital sistem tümörlerinin ise %71,23’ünün meme tümörü olduğu bildirilmiştir. Sontas ve ark. (2009), 155 KMT hastası köpeğe ilişkin retrospektif çalışma yapmışlardır. KMT’den en çok etkilenen ırkların *Poodle* (n=83), *Cocker spaniel* (n=11), melez (n=10) ve *Boxer* (n=6) ırkları olduğu bildirilmiştir. 155 köpeğe ait 212 tümörün %78,3’ünün malign, %12,3’ünün benign, %8,0’inin hiperplastik değişimler olduğu, %1,4’ünün ise sınıflandırılmadığı belirtilmiştir. Ortalama tümör görülme yaşı çalışmada 9,37 yaş olarak hesaplanmıştır. 119 köpekten

46'sı en az bir kez doğum yapmış; 59 köpekten 22'sinin ise yalancı gebelik geçmişi olduğu bildirilmiştir.

1.2.2. KMT Risk Faktörleri

KMT gelişimini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler arasından en önemlileri yaş, ırk, genetik yatkınlık, hormonlar ve büyüme faktörleri ve son olarak da beslenme olarak sayılabilir (Kelsey ve ark., 1998 ve Perez Alenza ve ark., 2000). Bu faktörlerden yaş, obezite ve steroid hormonları kanser gelişimini etkilediği kadar malignitesine de etki etmektedir (Philibert ve ark., 2003).

1.2.2.1. Yaş

Dorn ve ark. (1967), 10-11 yaşlarına kadar KMT insidansında artış görüldüğünü; sonrasında ise bu oranın düştüğünü bildirmişlerdir. Schneider ve ark. (1969), KMT vakalarının ortalama yaşını 10 yıl-iki ay olarak belirtmişlerdir. Boldizsár ve ark. (1992), KMT vakalarının yaş, ırk ve döneme göre dağılımlarını incelemiş ve KMT için en yüksek insidansın 10 yaşındaki köpeklerde görüldüğünü bildirmişlerdir. Dobson ve ark. (2002), meme tümörü vakalarının genç bireylerde görece daha az görüldüğünü, altı ve 10 yaşları arasında belirgin bir artış gösterdiğini, on yaşından büyük bireylerde ise KMT frekansında düşüş görüldüğünü ifade etmişlerdir. Zatloukal ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada meme displazi/hiperplazilerinin sekiz; benign tümörlerin 10, malign tümörlerin ise 13 yaşlı köpeklerde en yüksek frekansa ulaştıklarını bildirmişlerdir. Gamlem ve ark. (2008), KMT vakalarının 10-11 yaş aralığındaki bireylerde %50 ile en yüksek frekansa ulaştığını, sonrasında ise KMT frekansında düşüş görüldüğünü bildirmişlerdir. Salas ve ark. (2015), KMT frekansının en yüksek olduğu yaş aralığının dokuz ile 12 yaşları arası dönem olduğunu ifade ederken, Andrade ve ark. (2017), KMT için ortalama yaşın 9,99 olduğunu belirtmişlerdir. Ramesh ve ark. (2019), ise KMT vakalarının en yüksek görüldüğü yaş aralığının sekiz ve 12 yaşları arası olduğunu bildirmişlerdir.

Özetlenen çalışmalarda KMT vakalarının genellikle sekiz-10 yaşları aralığında geliştikleri, benign ve malign tümörlerin başlangıç yaşının farklı olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmalara göre benign tümörlerin oluşma yaşı sekiz buçuk iken, malign tümörlerin oluşum yaşı dokuz buçuk olarak belirlenmiştir (Sorenmo, 2003). Beş yaşından önce malign meme tümörü oluşması ise oldukça nadir gözlenen bir durum olarak ifade edilmektedir (Sleeckx ve ark., 2011).

1.2.2.2. Beslenme

Sonnenschein ve ark. (1991), vücut kondüsyonu ve diyetin meme tümörü ile ilişkisini araştırmışlardır. Dokuz ve 12 aylar arasında zayıf vücut kondüsyonuna sahip kısırlaştırılmış köpeklerin %99'unda meme tümörü riskinin azaldığı ifade edilmiştir. Kısırlaştırılmayan köpeklerde ise yine aynı yaş aralığındaki bireylerde zayıf vücut konformasyonuna sahip köpeklerde riskin %40 azaldığı, fakat bu değerin anlamlı bulunmadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, kanser teşhisi konulmasından bir yıl önce yüksek yağ içerikli diyetle beslenmenin kanser gelişimi üzerinde herhangi bir etkisinin görülmediği ifade edilmiştir.

Pérez Alenza ve ark. (1998), yapmış oldukları vaka-kontrol çalışmasında dişi köpeklerde diyet ve meme tümörü gelişimi arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Meme bezinde displazi veya tümör bulunan bireyler ile sağlıklı bireyler karşılaştırılmış, köpeklerin vücut yapıları, diyet ve reproduktif geçmişlerine dair bilgiler toplanmış, serum selenyum seviyeleri, retinol konsantrasyonları ve deri altı yağ dokusundaki yağ asiti profilleri analiz edilmiştir. Bir yaşından önce obezite görülen köpeklerde ve meme tümörü/displazisi teşhisi konulmasından bir yıl öncesinde obezite görülen köpeklerde KMT prevalansının anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir. Ev yemeğiyle beslenen köpeklerde ve özellikle kırmızı et tüketimi daha yüksek olan bireylerde KMT insidansının daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Deri altı yağ dokusunda oleik asit konsantrasyonunun sağlıklı bireylerde anlamlı derecede daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Weeth ve ark. (2004)'nın kanser hastası ve sağlıklı bireylerde vücut kondüsyon skorunu göz önünde bulundurarak yaptıkları çalışmada meme bezi adenokarsinoması ve karsinoması görülen bireylerde kilolu ve obez köpeklerin prevalansındaki artışın sağlıklı bireylerle kıyaslandıklarında anlamlı düzeylere ulaşmadıkları görülmüştür.

Lim ve ark. (2015)'nin çalışmalarında, üçüncü derece köpek meme karsinomalarının oranı kilolu ve obez köpeklerde anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Yine aynı çalışmada kilolu veya obez köpeklerde östrojen ve progesteron reseptörlerinin ifadesi ile paralel şekilde aromataz ifadesinin anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Costa-Santos ve ark. (2019)'nın meme karsinomalı dişi bireylerde yaptıkları çalışmada fazla kilolu veya obez olan köpeklerde karsinomaların daha agresif oldukları ve bu bireylerde daha yüksek trigliserit, VLDL (çok düşük dansiteli lipoprotein kolesterol), albumin, globulin ve laktat konsantrasyonları olduğu belirlenmiştir. Diyetle %90 omega-3 balık yağı kullanıldığında lipit profilinde herhangi bir değişiklik olmamasına karşın; glikoz, total protein ve globulin düzeylerinde artış belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler obez köpeklerde lipit ve metabolik profillerde değişiklik görüldüğünü ve tümörün agresifliği ile dislipidemi arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir.

Andrade ve ark. (2019), fareler üstünde yaptıkları çalışmada gebelik sırasında beslenmeye bağlı olarak germ hücrelerinde ve fetal hücrelerde gerçekleşen epigenomik değişikliklerin sonraki nesilde tümör oluşumunu etkilediğini göstermiştir.

1.2.2.3. Hormonal Etkiler

Östrus siklusu ve kısırlaştırma durumunun KMT oluşum riskini etkilediğine dair yaygın bir görüş bulunmaktadır. Schneider ve ark. (1969)'nın çalışmalarında yalancı gebelik, doğum ve doğurganlık kategorilerinin KMT oluşumunu etkilemediği görülmüştür. Buna karşın, iki ve daha fazla kızgınlık göstermiş olan köpeklerde KMT

oluşumu riski %26 iken; bir kez kızgınlık göstermiş köpeklerde %8; kızgınlık göstermeden önce kısırlaştırılmış bireylerde ise %0,5 olarak bildirilmiştir. Misdorp (1988), geç yaşlarda dahi olsa kısırlaştırmanın KMT gelişimine karşı koruyuculuğu olduğunu göstermiştir. Sorenmo ve ark. (2000), ise KMT hastası bireyleri kısırlaştırma durumuna göre; kısırlaştırılmamış, tümör operasyonundan iki yıldan az bir süre önce veya tümör operasyonu sırasında kısırlaştırılmış ve tümör operasyonundan iki yıldan fazla bir süre önce kısırlaştırılmış olarak üç gruba ayırmışlardır. Tümör operasyonundan iki yıldan az bir süre önce kısırlaştırılmış olan gruptaki bireylerin diğer gruptaki bireylere göre %45 oranında daha uzun yaşadıkları ifade edilmiştir. Çalışma kısırlaştırma zamanının önemini gözler önüne sermiş (Sorenmo ve ark., 2000) ancak Philibert ve ark. (2003), malign KMT vakalarında kısırlaştırma durumunun tümör prognozunu anlamlı şekilde etkilemediğini ifade etmiş; bu durumu KMT vakalarının hormon bağımlı veya hormon bağımsız olarak ortaya çıkabileceğine bağlamışlardır. Genel kanı kısırlaştırma ve kısırlaştırma yaşının KMT oluşumunu etkilemesi yönünde olmasına karşın, Beauvais ve ark. (2012), yaptıkları sistematik derlemede yapılan çalışmaların yanlı olabileceğini ve bu konuda kuvvetli bir kanıt bulunamadığını ifade etmişlerdir.

Hormonlara ilişkin araştırmalar başlıca ovaryum hormonları, ön hipofiz hormonları ve tiroid hormonlarının KMT oluşumu ve gelişimine etkilerinin araştırılmasına yönelik gerçekleştirilmiştir (Rutteman, 1990).

İnsanlarda kullanılan gebelik önleyici preparatların köpeklerde yapılan uzun süreli toksisite çalışmaları progestagenlerin meme dokusunu etkiledikleri ve neoplazilere neden olduklarını göstermiştir (Concannon ve ark., 1981; Kwapien ve ark., 1980; Nelson ve ark., 1972 ve Weikel ve Nelson, 1977). Köpeklerde meme gelişiminde östrojenlerin etkisi düşük olmasına karşın progesteronun oldukça işlevsel olduğu bilinmektedir (Chambers ve Günzel, 1979). Köpeklerde yapılan çalışmalar, dışarıdan yalnızca östrojen verilmesi durumunda köpeklerin östrojenin karsinojenik etkilerine karşı dirençli olduklarını göstermiştir (Segaloff, 1975). Buna karşın gebelik önleyici preparatlardan progestinlerin tek başına verilmesi veya progestin-mestranol kombinasyonlarının orta ve yüksek dozlarda uzun süreli uygulamalarında KMT

gelişiminde artış tespit edilmiştir (Geil ve Lamar, 1977; Giles ve ark., 1978 ve Kwapien ve ark., 1977). Toksisite testleri dışında, veteriner hekimlik alanında yapılan çalışmalarda da köpeklerde östrus kontrolü için kullanılan progestagenlerin düzenli kullanımında KMT insidansında artışa neden oldukları bildirilmiştir (Misdorp, 1988 ve van Os ve ark., 1981).

Östrojenler ve progestagenlerin köpek meme dokusunda direkt veya prolaktin ve büyüme hormonlarını (GH) uyarmak suretiyle indirekt etki ederek meme bezi hiperplazilerine neden olduğu, progesteron etkinliğinin yüksek oranda mamotrofik etkili köpek büyüme hormonunu uyardığı düşünülmektedir (Chambers ve Günzel, 1979 ve El Etreby ve ark., 1979). Östrojenlerin köpek meme bezlerinde duktal sistemde proliferasyon ve ektaziye uyardığı, progestagenlerin ise epitelyal ve miyoepitelyal proliferasyonu uyarak lobuloalveoler büyümeye neden olduğu bildirilmiştir (El Etreby ve Gräf, 1979). El Etreby ve ark. (1980), spontan KMT vakalarında GH salınımındaki artışa dikkat çekmiş ayrıca FSH (follikül uyarıcı hormon), LH (lütinleştirici hormon) ve tirotropin sentezleyen hücrelerde sekresyonun baskılandığını belirtmiştir.

D'Arville ve Pierrepont (1979), KMT vakalarında östrojen, progesteron ve androjen reseptörlerinin varlığını göstermişlerdir. Briggs (1980), spontan köpek benign adenomasında progesteron reseptörü (PR) konsantrasyonunun progesteron ile uyarılmış meme dokusunun iki katı; uyarılmamış meme dokusundaki reseptör konsantrasyonunun ise 10 katı olduğunu göstermiştir. Bu reseptör seviyelerinin ise insan ve sıçan meme tümörlerindeki reseptör konsantrasyonlarından daha yüksek olduğu belirtilmiştir. MacEwen ve ark. (1982), inceledikleri tümör örneklerinin bazılarında östrojen reseptörü (ER) bulunduğunu, bazılarında ise bulunmadığını bildirmiştir. ER ve PR varlığı ile ilgili çeşitli araştırmacılar tarafından yapılmış bir çok çalışma mevcuttur (Donnay ve ark., 1996; Elling ve Ungemach, 1983 ve Raynaud ve ark., 1981). Yapılan çalışmalardan birinde (Elling ve Ungemach, 1983), aynı bireyden elde edilen aynı histopatolojideki örneklerin reseptör karakteristiği açısından farklılık gösterebildiğine dikkat çekilmiştir. Lespagnard ve ark. (1987), *in vitro* çalışmalarında östrojen ve progesteronun hem ER ve PR pozitif, hem de ER ve PR negatif KMT

örneklerinde replikasyonu uyardığını göstermişlerdir. Çalışmada ayrıca ER ve PR içeriği ile bazal proliferasyon oranının korelasyon gösterdiği belirtilmiş fakat uyarılmış proliferasyon oranı ile arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır.

Warner (1977), tarafından köpek meme dokusuna ait duktal bağ dokusu displazileri, hiperplastik alveoler lobuler displaziler ve adenoma örnekleri ile yapılan *in vitro* çalışmada, alveoler lezyonlarda hormonlardan bağımsız sekresyon gerçekleştiği gösterilmiştir. Duktal bağ dokusu displazilerinde morfolojik değişiklikler gözlemlenemediği için büyüme tespit edilememiştir. Adenofibromadaki sekresyonun kortizol, mamotropin ve insülin kombinasyonu ile östradiol, progesteron, kortizol, mamotropin, somatotropin ve insülin kombinasyonuna duyarlı olduğu ayrıca sağlıklı meme dokularının ise aynı hormon kombinasyonlarına yanıt vermediği tespit edilmiştir.

Prolaktinin (PRL) kemirgenlerde meme tümörü gelişimini tetiklemesi, Saluja ve ark. (1973; 1974)'nın köpeklerde PRL seviyeleri ve KMT vakaları arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmaya yöneltmiştir. Çalışma sonucunda KMT vakalarında hipofiz bezinde PRL düzeylerinde dengesizlik görüldüğü; KMT'li bireylerde PRL seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu ve diöstrustaki bireylerde bu farkın çok daha anlamlı olduğu bildirilmiştir. Attia (1982), sağlıklı, benign tümürlü ve malign tümürlü köpeklere ait hipofiz bezlerinde PRL ve adrenokortikotropin (ACTH) sentezleyen hücrelerin sekretör aktivitelerinde sağlıklı bireylere göre benign tümürlü bireylerde hafif, malign tümürlü bireylerde ise belirgin bir artış olduğunu tespit etmiştir. Somatotropin (STH) salgılayan hücrelerde ise malign tümürlü bireylerde sayıca azalma olmasına karşın sekretör aktivitelerinin sağlıklı meme dokusuna sahip bireylerle aynı olduğunu göstermiştir. Queiroga ve ark. (2005), çalışmalarında KMT'li köpeklerin serumlarında PRL seviyesinin sağlıklı köpeklerden anlamlı düzeyde yüksek olduğunu bildirmiş, benign ve malign KMT'li bireylerin serum PRL seviyeleri arasında anlamlı bir değişiklik olmadığını ifade etmişlerdir. Aynı çalışmada KMT'li dokulara ait örnekler karşılaştırıldığında PRL seviyeleri en yüksekten düşüğe doğru; malign KMT, benign KMT ve sağlıklı doku olarak sıralanmıştır. Bu durum tümör dokusunda saptanan PRL'in hipofiz kökenli değil,

otokrin veya parakrin etki ile memede değişikliğe uğramış hücrelerden salgılandığını düşündürmüştür. Ancak Spoerri ve ark. (2015)'nın yaptıkları çalışmada PRL'in parakrin veya otokrin etkinliğinin olduğuna dair herhangi bir kanıt elde edilememiştir. PRL ve prolaktin reseptörleri (PRLR) düzeylerinin tümör prognozu ve neoadjuvant terapileri için önemli belirteçler olduğu da yayınlarda belirtilmektedir (Guil-Luna ve ark., 2014; Michel ve ark., 2014 ve Queiroga ve ark., 2014).

Yapılan çalışmalar bazı KMT vakalarının PRLR (Rutteman ve ark., 1986) ve epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR) (Nerurkar ve ark., 1987) açısından pozitif veya negatif olabildiklerini göstermiştir. Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü alfa (TGF- α) gibi büyüme faktörlerinin EGFR'ye bağlanarak bu hücrelerde seçici büyümeye ve hücrenin kontrol mekanizmasından kaçmasına neden olabilecekleri düşünülmektedir (Rutteman ve Misdorp, 1993). Normal, displazili ve neoplazili dokularla yapılan çalışmada ER, PR ve epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR) araştırılmıştır. Yalnızca malign tümörlerde ER ve EGFR konsantrasyonlarının anlamlı bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Donnay ve ark., 1996). Bir başka çalışmada ise malign tümörlerde benign KMT ve sağlıklı örneklerle kıyasla EGF düzeyinin steroid düzeyleriyle paralel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum EGF'nin tümör oluşumunda önemli olabileceğini düşündürmektedir (Queiroga ve ark., 2009). Kennedy ve ark. (2011), EGF'nin proliferasyon ve kemotaksise olumlu etkide bulunduğunu; apoptozisi etkisizleştirdiğini ve vasküler endotelyal büyüme faktörü üretimini artırdığını ayrıca tümöre malign bir fenotip kazandırdığını göstermişlerdir.

Pagnini ve ark. (2002), KMT hücre hattında GnRH (Gonadotropin salgılatıcı hormon) agonistinin (Goserelin) EGF'nin uyarıcı aktivitesini baskılayarak tümör proliferasyonunu engellediğini göstermişlerdir.

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF) karsinoma hücreleri veya komşularının proliferasyonunu steroidlerden ve GH'den bağımsız olarak uyarmaktadır (Rutteman ve Misdorp, 1993). Bunun yanı sıra, progestinlerin GH, IGF-I, IGF-II ve IGF bağlayıcı proteinlerin plazma konsantrasyonunda artışa neden olduğu bildirilmiştir (Mol ve ark.,

1996). Progestinlerle uyarılmış GH'nın meme bezindeki hiperplastik duktular epitelden köken aldığı, hipofiz bezinden salgılanan GH ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği ve biyolojik olarak aktif olduğu tespit edilmiştir (Selman ve ark., 1994). Bu GH düzeylerinin büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) ve somatostatine karşı duyarsız oldukları fakat antiprogesterinlere karşı duyarlı olduğu belirtilmiştir (Mol ve ark., 1996). Progestin ile uyarılmış GH'nın meme epitel hücrelerinde proliferasyonu ve bazen de transformasyonu uyararak KMT'ye yatkınlığa neden olduğu düşünülmektedir (Van Garderen ve ark., 1997). Van Garderen ve ark. (1999), meme dokusunda büyüme hormonu reseptörleri (GHR) ile moleküler düzeyde yaptıkları çalışmada GHR'ye ait dört farklı transkript olduğunu göstermişlerdir. En malign tümör örneklerinde yalnızca esas transkriptin bulunduğu tespit edilmiştir. İşlevsel domainlerin atlandığı alternatif transkriptlerin malign tümörlerde olmaması, bu tümörlerde GH'a karşı hassasiyetin artabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Serum ve dokudaki GH ve IGF-I yoğunluğunun malign KMT vakalarında benign KMT vakaları ve sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Queiroga ve ark., 2010). Başka bir çalışmada ise tüm GH sentezleyen hücrelerin PR pozitif oldukları fakat tüm PR pozitif hücrelerden GH sentezlenmediği gözlenmiştir (Lantinga-van Leeuwen ve ark., 2000). Aktif PR'nin bir çeşit transkripsiyon faktörü gibi görev yaparak aynı hücredeki GH ifadesini artırdığı ifade edilmiştir (Lantinga-van Leeuwen ve ark., 2000 ve Queiroga ve ark., 2008). Meme dokusu ve tümör örnekleri ile yapılan bir başka çalışmada (Geraldine ve ark., 2000) hormon reseptörü varlığı ile malign KMT'lerdeki hücresel proliferasyon arasında negatif korelasyon görüldüğü ve insan çalışmalarında da benzeri sonuçlara rastlandığı ifade edilmiştir.

El Etreby (1979), KMT'li köpeklerde tiroid fonksiyonları ve KMT arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Çalışmada kontrol grubuna göre KMT'li vakalarda tiroid hormonlarının daha düşük seviyede tespit edilmesi tiroid bezinin de hormonal dengesizlikten etkilendiğini göstermiştir. Tiroid hormonları ile PRL ve GH gibi hipofiz bezi ile ilişkili hormonların etkileşiminin tümör oluşumunda rol alabileceğini, tiroid hormonlarındaki yetersizliğin meme dokusunda PRL ve GH'a hassasiyetini etkileyebileceğini öne sürmüştür.

Frank ve ark. (1979), uzun süreli medroksiprogesteron asetat ve progesteron uygulanan sağlıklı ve kısırlaştırılmış dişi köpeklerde serum insülin, tiroid uyarıcı hormon (TSH), triiodotreonin, GH, PRL, 17 β -östradiol, progesteron ve kortizol seviyelerini ölçtükleri çalışmada, serumdaki GH ve insülin seviyelerinde artış; triiodotreonin, kortizol seviyelerinde düşüş tespit etmişlerdir. 17 β -östradiol seviyesi yalnızca medroksiprogesteron uygulanan grupta düşmüş fakat her iki grupta TSH ve PRL seviyelerinde herhangi bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir.

Benavente ve ark. (2019), çalışmalarında benign ve malign tümörler dokularında oksitosin reseptörü (OTR) varlığını göstermişlerdir. Benign tümörlerdeki OTR'nin malign tümörlere göre daha yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir. Malign tümörlerde ise OTR ifadesi I. ve II. derece tümörlerde, III. derece tümörlere kıyasla daha yüksek bulunmuştur.

Hormon ve hormon reseptörü düzeylerinin tümör oluşumunun yanı sıra tümörün malignitesi ve prognozu ile de ilişkili olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur. Malign KMT hastası bireylerin hem serum steroid hormon düzeylerinin hem de meme dokusu örneklerindeki steroid hormon düzeylerinin sağlıklı ve benign KMT'li bireylerden yüksek olduğu bildirilmiştir (Queiroga ve ark., 2005). Benign tümörlerde progesteron ifadesinin yüksek, hücrel proliferasyonun ise daha düşük olduğu; buna karşın malign tümörlerde durumun tam tersi olarak görüldüğü tespit edilmiştir. Artan malignite tümörün hormon bağımsız hale gelmesi ile ilişkilendirilmiştir (Thuróczy ve ark., 2007).

Spoerri ve ark. (2015), ER, PGR, GHR ve PRLR ifadelerinde normal dokudan malign fenotipe geçişte anlamlı derecede düşüş görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu düşüşün benign tümörlerde yalnızca PRLR için anlamlı olduğu ifade edilmiştir. Mohr ve ark. (2016), ER, PGR, PRLR ve GHR ifadelerinin malign tümörlerde düşüşü ile ilgili olarak Spoerri ve ark (2015)'nin çalışmaları ile paralel sonuçlar elde etmişlerdir. Sorenmo ve ark. (2019), östrojenin ER pozitif tümörlerde karsinojen etkide bulunduğunu fakat ER negatif tümörlerde koruyucu bir etkisi olabileceğini ifade etmişlerdir.

Çalışmaların odağında bulunan ovaryum steroidleri, hipofiz ve tiroid bezlerinden sentezlenen hormonlar ve büyüme faktörleri haricinde yapılan çalışmalara bakıldığında Ressel ve ark. (2012), agresif tümör hücrelerinde leptin ve leptin reseptörünün (ObR) düşük düzeylerde ifade edildiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte Lim ve ark. (2015), adiponektin ifadesindeki düşüşün kötü prognoz ile korele olduğunu, leptin ifadesinin PR ile, ObR'nin ise ER ile korele olduğunu bildirmişlerdir.

Özetle; ovaryum steroidleri ve bu steroidlere ilişkin reseptörlerin varlığının; bu hormonlara bağlı olarak hipofiz bezinden sentezlenen hormonlar ile reseptörlerinin ve çeşitli büyüme faktörlerinin tümör oluşumu, proliferasyonu, malignitesi ve prognozu ile ilişkili olduğu ve tiroid bezi fonksiyonlarının tümör nedeniyle etkilenebildiği söylenebilir.

1.2.2.4. Irk Etkisi

Geçmişinde akrabalı yetiştirme bulunan köpeklerde ırklar içi çok düşük seviyede genetik varyasyon gözlenir. Özellikle insanlarla kıyaslandığında sınırlı popülasyon büyüklüğü ve ırklar içi bağlantı dengesizliğinin yüksek derecede görülmesine yol açmaktadır. Kalabalık insan popülasyonlarında gözlenen meme kanserleri ile kıyaslandığında, düşük genetik varyasyondan dolayı, KMT'nin tek bir ırk içinde daha homojen bir kökene sahip olması beklenmektedir. Bu durum ırklar içindeki risk faktörlerinin çok daha kolay saptanabilmesine izin vermektedir (Rivera ve ark., 2009).

Fox terrier (Cohen ve ark., 1974), *Cocker spaniel* (Andrade ve ark., 2017; Atalay Vural ve Aydın, 2001; Cohen ve ark., 1974; Dobson, 2013; Egenvall ve ark., 2005; Salas ve ark., 2015 ve Sontas ve ark., 2009), *Boston terrier* (Cohen ve ark., 1974 ve Macvean ve ark., 1978), *Pointer* (Andrade ve ark., 2017; Atalay Vural ve Aydın, 2001; Dobson, 2013; Köküslü ve Akkayan, 1972 ve Macvean ve ark., 1978), *Beagle* (Schafer ve ark., 1998), *Poodle* (Andrade ve ark., 2017; Atalay Vural ve Aydın, 2001; do Carmo Silva ve ark., 2019; Dobson, 2013; Köküslü ve Akkayan, 1972; Macvean

ve ark., 1978; Salas ve ark., 2015; Sontas ve ark., 2009 ve Türkaslan ve ark., 1983), *English springer spaniel* (Dobson, 2013 ve Egenvall ve ark., 2005), *Brittany spaniel*, *Puli*, *English setter* (Dobson, 2013), *Doberman* (Atalay Vural ve Aydin, 2001; do Carmo Silva ve ark., 2019; Dobson, 2013 ve Egenvall ve ark., 2005), *Boxer* (Atalay Vural ve Aydin, 2001; Dobson, 2013; Egenvall ve ark., 2005; Köküuslu ve Akkayan, 1972; Sontas ve ark., 2009 ve Türkaslan ve ark., 1983), *Softcoated wheatan terrier* (Egenvall ve ark., 2005), *German shepherd* (Dobson, 2013 ve Salas ve ark., 2015), *Labrador retriever* (Salas ve ark., 2015), *Maltese* (Andrade ve ark., 2017 ve Dobson, 2013), *Yorkshire terrier* (Andrade ve ark., 2017; Dobson, 2013 ve Egenvall ve ark., 2005), *Dachshund* (Andrade ve ark., 2017; Atalay Vural ve Aydin, 2001; do Carmo Silva ve ark., 2019 ve Dobson, 2013) ırklarında meme tümörü vakalarına predispozisyon görüldüğü bildirilmiştir. Buna karşın *Collie*, *Saint bernard*, *Shetland sheepdog*, *Bernese mountain dog* (Rivera ve ark., 2009) ve *Rough haired collie* (Dobson, 2013) ırkları KMT için düşük risk grubu sınıflandırmasına dahil edilmiştir.

1.2.2.5. KMT'ne Predispozisyon Yaratan Germ Hattı Mutasyonları

Irklar içi düşük genetik varyasyon görülmesi ve artan homozigotluk (Rivera ve ark., 2009) KMT oluşumunda etkili germ hattı mutasyonları bulunabileceği düşüncesini kuvvetlendirmektedir. Schafer ve ark. (1998), *Beagle* ırkına ait ailelerde KMT vakalarına ailesel yatkınlık ve direnç görünen hatlar ile çalışmış ve örneklemdeki ailelerde aynı genetik faktörlerin KMT'ye yatkınlık ve dirençle ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Köpeklerde meme tümörüne neden olan birçok aday gen bulunmaktadır ve bu genlerin tümör oluşumu üzerine etkileri yoğun olarak çalışılmaktadır (Borge ve ark., 2011; Klopffleisch ve ark., 2010; Queiroga ve ark., 2011 ve Rivera ve von Euler, 2011).

p53 proteini tümör baskılayıcı ve büyümeyi önleyici genlerden birisidir (Klopffleisch ve ark., 2010). Chu ve ark. (1998), 74 KMT örneğiyle yaptıkları çalışmada benign tümörlerde *TP53* (p53) geninde herhangi bir mutasyon tespit edememiş fakat malign tümörler olan primer karsinomaların yaklaşık %15'inde

mutasyon olduğunu belirlemişlerdir. Ekzon 4, 5, 6 ve 7’de anlamsız mutasyon, *splice* bölgesinde mutasyon ve çerçeve kayması mutasyonları olduğu tespit edilmiştir. Mayr ve ark. (1999), meme adenokarsinomasında *TP53* geni, ekzon 5’te yanlış anlam mutasyonu; meme adenomasında ise ekzon 4’te heterozigot bir sinonim mutasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Tümör dokularında yapılmış bu çalışmaların yanısıra Veldhoen ve ark. (1999), spontan KMT vakalarında *TP53* geninde germ hattında 10 hastanın üçünde mutasyon görüldüğü, iki hastada tümör dokularında ekzon 2 ve ekzon 5’te mutasyon olduğu, hastalardan birinde ise hem tümör dokusu hem de germ hattında ekzon 3’ten 7’ye kadar delesyon bulunduğunu tespit etmişlerdir. Muto ve ark. (2000), yine *TP53* geninde yaptıkları çalışmada, 38 benign meme tümöründe dört yanlış anlam mutasyonu; 25 karsinomada ise beş yanlış anlam mutasyonu ve bir anlamsız mutasyon belirlemişlerdir. Lee ve Kweon (2002), *TP53* geninde 10 malign tümörde dört yanlış anlam mutasyonu, bir anlamsız mutasyon; 10 benign tümörde ise iki yanlış anlam mutasyonu ve bir sinonim mutasyon tespit etmiş ve mutasyonlar ile prognoz arasında bir ilişki olabileceğini ifade etmişlerdir. Lee ve ark. (2004), bir başka çalışmalarında ise tümör dokularında *TP53* geni mutasyonları ve gen ifadesini prognoza yönelik değerlendirmişlerdir. Mutasyonlar ile gen ifadesinin artışında anlamlı bir korelasyon tespit edilen çalışmada, *TP53* mutasyonları ve artan protein ifadesi malign karakterde artış ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Rivera ve ark. (2009), *English springer spaniel* ırkında *TP53*’ün de dahil olduğu 10 adet gende iki farklı örneklem grubunda kan örneklerinde tekli nükleotit polimorfizmi (TNP) taraması yapmışlardır. *TP53* geninde yedi adet TNP tespit edilen çalışmada, ikinci grupta yalnızca bir TNP %5’lik minör allel frekansının üstünde bulunmuş ve ileri analizlere geçilmemiştir. Borge ve ark. (2011), 32 bireyden oluşan bir örneklemde *TP53*’ün de içinde bulunduğu aday genler için germ hattı mutasyonu taraması yapmış ve *TP53* geni için herhangi bir germ hattı mutasyonu tespit edememişlerdir.

Rungsipipat ve ark. (1999), KMT vakalarının genomunda tirozin kinaz ailesine bağlı *YES1* protoonkogeninin, Murakami ve ark. (2000), ise siklin A ifadesinden sorumlu genin (Hibridizasyon temelli metod ile çalışıldığından *CCNA1* mı yoksa *CCNA2* mı olduğu belirsizdir) amplifikasyonlarını araştırarak genomik anormallikleri

tespit etmeye çalışmış fakat KMT ile ilişkilerinin saptanabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu belirtmişlerdir.

Watzinger ve ark. (2001), insanlardaki tümör vakalarında dikkat çeken *NRAS*, *KRAS* ve *HRAS* protoonkogenlerinin en çok mutasyon görünen kodonlarının bulunduğu ekzon 1 ve ekzon 2 bölgelerinde KMT vakalarının da dahil olduğu kedi ve köpek tümör dokularında mutasyon taraması yapmış; KMT vakalarında bu genlere ve ilgili bölgelere ilişkin herhangi bir mutasyona rastlamamışlardır.

De las Mulas ve ark. (2003), KMT vakalarında tirozin kinaz reseptör proteini olan ve onkogen olarak kabul edilen *ERBB2* (*HER2*, *c-erbB-2*, *neu*) ile çalışmışlardır. İmmünohistokimya ve kromogenik *in-situ* hibridizasyon sonuçlarına göre proteinin KMT vakalarının %17,6'sında gen amplifikasyonu olmaksızın ifade artışı gösterdiği bildirilmiştir. İnsan ve köpek meme tümörü vakalarında tespit edilen yüzde oranlarının benzerliğine dikkat çekilmiştir. Rivera ve ark. (2009), *English springer spaniel* ırkında kan örneklerinde *ERBB2* genine ait toplam beş TNP tespit etmiş ve KMT vakaları ile aralarında anlamlı bir ilişki saptayamamışlardır. Borge ve ark. (2011) ise *ERBB2* geninde yaptıkları çalışmada 32 bireyden oluşan bir örnekleme kan numunelerinde sekizi kodlanan bölgede olmak üzere toplamda 23 TNP ve kodlanmayan bölgede bir adet *indel* mutasyonu tespit etmişlerdir. Tespit edilen polimorfizmlerden birinin yanlış anlam mutasyonuna neden olduğu, amino asit yükünü değiştirebileceği ve *PolyPhen* tahminine göre zararlı olabileceği bildirilmiştir.

Kanae ve ark. (2006), 13 tümörlü, iki sağlıklı meme dokusunda tümör baskılayıcı olduğu bilinen *PTEN* geninde varyasyon taraması ve gen ifade düzeylerini araştırmışlardır. Mutasyon tespit edilmeyen çalışmada gen ifadesi beş benign tümörün dördünde iki ile dört kat arası düşüş göstermiştir. Malign tümörlerde ise sekiz örnekten dördünde ifade düşüşü tespit edilirken, diğer örneklerin ifadelerinde herhangi bir ifade farklılığı tespit edilememiştir. Borge ve ark. (2011), ise *PTEN* geninde dördü kodlanmayan, biri kodlanan bölgelerde olmak üzere toplam beş adet TNP tespit etmişlerdir. Tespit edilen TNP'nin sinonim olduğu ve amino asit dizisini değiştirmedeği belirtilmiştir. Borge ve ark. (2015), *PTEN* geninin sıklıkla kayba

uğrayan bir lokusta bulunduğu ve tümörlerin beşinde homozigot olarak delesyona uğradığını tespit etmişlerdir.

Rivera ve ark. (2009), *English springer spaniel* ırkında yaptıkları çalışmada *CHEK2* geninde toplamda altı adet TNP tespit etmiş fakat KMT ile aralarında anlamlı bir ilişki olduğunu gösterememişlerdir. Borge ve ark. (2011)'nın çalışmalarında ise *CHEK2* geninde yalnızca kodlanmayan bölgelerde üç adet TNP ve bir adet *indel* mutasyonu tespit edilmiştir.

Rivera ve ark. (2009), *English springer spaniel* ırkında yaptıkları çalışmada *FGFR2* geninde dokuz adet TNP tespit etmiş ve ilk veri setinde TNP'ler ile tümör oluşumu arasında anlamlı bir korelasyon elde edilse de ikinci veri seti değerlendirmeye katıldığında anlamlı bir sonuç elde edilemediği bildirilmiştir.

LSP1 geninde yapılan çalışmada (Rivera ve ark., 2009) altı adet TNP tespit edilmiş fakat tümör ile aralarında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

MAP3K1 geninde altı adet TNP tespit edilmiş fakat tümör oluşumu ile bu TNP'ler arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır (Rivera ve ark., 2009).

RCAS1 geninde yapılan TNP taraması sonucunda *English springer spaniel* ırkında beş adet TNP tespit edilmiş fakat tümör oluşumu ile aralarında herhangi bir anlamlı korelasyon bulunmamıştır (Rivera ve ark., 2009).

TOX3 geninde tespit edilen yedi TNP ile tümör oluşumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmemiştir (Rivera ve ark., 2009).

Borge ve ark. (2011), *BRIP1* geninin kodlanan bölgelerinde iki, kodlanmayan bölgelerinde ise üç olmak üzere toplam beş adet TNP tespit etmişlerdir. Yanlış anlam mutasyonu ile sonuçlanan bu baz değişimlerinin rezidülerde herhangi bir yük değişimi yaratmadığı ve *PolyPhen* tahmininde benign olarak nitelendirildiği bildirilmiştir.

CDH1 geninde yapılan çalışmada kodlanan bölgede bir TNP, üç nükleotitlik bir *indel*, kodlanmayan bölgede ise dört adet TNP ve iki *indel* saptanmıştır. Kodlanan bölgedeki TNP'nin amino asit dizisinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı ifade edilmiştir (Borge ve ark., 2011).

EGFR geninde kodlanan bölgede iki; kodlanmayan bölgede ise dört adet TNP tespit edilmiştir. Tespit edilen iki yanlış anlam mutasyonunun korunmuş bir bölgede gerçekleşmediği; birinin benign olduğu, diğerinin ise zararlı olabileceği bildirilmiştir (Borge ve ark., 2011).

ESR1 geninde kodlanan bölgede üç; kodlanmayan bölgede ise iki adet TNP tespit edilmiştir. Ekzon 2 ve 8'de görülen TNP'lerin amino asit dizisinde herhangi bir değişime neden olmadığı; ekzon 4'te görülen yanlış anlam mutasyonunun ise rezidü grubunda herhangi bir değişime neden olmadığı ve *PolyPhen* tahmininde benign olarak nitelendirildiği ifade edilmiştir (Borge ve ark., 2011).

STK11 geninde yapılan taramalarda yalnızca kodlanmayan bölgelerde üç adet TNP tespit edildiği bildirilmiştir (Borge ve ark., 2011).

Rivera ve ark. (2009), KMT vakalarında tümör baskılayıcı olduğu bilinen *BRCA1* geninin de içinde bulunduğu 10 gen ile yaptıkları polimorfizm çalışmasında toplam sekiz adet TNP tespit etmiş; iki farklı örneklemin kullanıldığı ve birlikte değerlendirildiği ileri analizlerde ise *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonların *English springer spaniel* ırkında tümör gelişimi ile anlamlı ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Borge ve ark. (2011) ise yaptıkları çalışmada *BRCA1* geninde kodlanan bölgede bir; kodlanmayan bölgede ise iki TNP tespit etmiş; tespit edilen varyantın amino asit dizisini değiştirmedeğini bildirmiştir. Enginler ve ark. (2014), *BRCA1* geninin 5' UTR bölgesi, intron 8 ve ekzon 9 bölgelerinde varyasyon taramışlardır. 5' UTR bölgesinde iki TNP tespit edilen çalışmada intron 8'de iki yeni TNP; ekzon 9'da ise iki yeni TNP tespit edilmiştir. Ekzon 9'da tespit edilen varyantların sinonim olduğu belirtilmiştir. Qiu ve ark. (2015), *BRCA1*'in promotor bölgesini tanımlamış ve bu bölgede mutasyon taramışlardır. Malign KMT vakalarının

%46,6'sının promotor bölgesinde bir sitozin nükleotidinin delesyona uğradığı tespit edilmiştir. mRNA ifadesinin KMT vakalarında anlamlı derecede azaldığı bildirilmiş fakat benign ve malign tümörler arasında bu ifade düşüşüne ilişkin anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Qiu ve Lin (2016)'ın başka bir çalışmalarında ise bir benign ve bir malign tümör örneğinde *BRCA1* geninde toplamda dört adet nokta mutasyonu tespit edilmiştir. Benign KMT vakasında tespit edilen p.E1589Q mutasyonunun erken *stop* kodonu oluşumuna neden olan zararlı bir mutasyon olduğu bildirilmiştir. Malign KMT vakasında tespit edilen p.T1207A mutasyonunun benign, yine malign örnekte tespit edilen p.V1336I mutasyonunun ise zararlı bir mutasyon olduğu bildirilmiştir. 5' *flanking region*'da yapılan çalışma ise malign vakalara ait bir klonda dört CpG adasında metilasyon olduğu tespit edilmiştir.

DNA tamirinde görevli *BRCA2* ve *RAD51* genlerinin köpeklerdeki cDNA'ları (komplementer DNA) klonlanarak DNA dizi analizleri yapılmış ve ilerleyen yıllarda KMT vakalarında çalışılması üzerine zemin hazırlanmaya çalışılmıştır. Çalışma sonuçları *BRCA2* amino asit dizisinde insanla %68, *RAD51* geninin ise %99 homoloji gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Ochiai ve ark., 2001). Yoshikawa ve ark. (2005), *BRCA2* geni ile yaptıkları çalışmada ekzon 27'ye ait genomik diziyi analiz etmiş ve heterozigotluk kaybının tespiti için kullanılmak üzere polimorfik bir belirteç elde etmeye çalışmış, ayrıca çalışma sırasında dört yeni nükleotit polimorfizmi tespit etmişlerdir. İleri çalışmalarında ise yine *BRCA2* geninde heterozigotluk kaybı analizi için üç yeni polimorfik belirteç geliştirmişlerdir (Yoshikawa ve ark., 2008). Rivera ve ark. (2009), *English springer spaniel* ırkında kan örneklerinde yaptıkları TNP taramasında *BRCA2* genine ait TNP'leri de analiz etmişler; toplamda dört adet TNP tespit edilen çalışmada *BRCA2* aday geninin KMT gelişiminde etkili olduğu bildirilmiştir. Hsu ve ark. (2009), KMT hastası bireylerde *BRCA2* geninin BRC domainini kodlayan ekzon 11 bölgesinde DNA dizi analizi ile nükleotit varyasyonlarını araştırmışlardır. %68'i yanlış anlam mutasyonu; %32'si sinonim mutasyon olmak üzere 19 adet sporadik nokta mutasyonu saptanmıştır. Borge ve ark. (2011), *BRCA2*'nin kodlanan bölgelerinde dört TNP, iki *indel*; kodlanmayan bölgelerinde ise iki TNP, bir *indel* olmak üzere toplam dokuz adet varyasyon tespit etmişlerdir. TNP'lerin üçünün yanlış anlam mutasyonuna neden olduğu; *PolyPhen*

tahminine göre bu mutasyonların ikisinin benign; birinin ise zararlı mutasyon olması muhtemel olarak görülmüştür. Ochiai ve ark. (2011), *RAD51* geni ile *BRCA2*'deki fonksiyonel domainlerinden olan BRC tekrarları arasındaki ilişkiyi iki hibrit analizi (*two-hybrid assay*) ile araştırmışlardır. Sekiz adet BRC tekrarından BRC1, BRC2 ve BRC4'ün *RAD51* ile kuvvetli; BRC8'in orta; BRC3, BRC5 ve BRC7'nin zayıf bir şekilde bağ kurduğu; BRC6'nın ise *RAD51* ile bağlanmadığı bildirilmiş; yanlış anlam mutasyonları ve proteinin kısa kalmasına neden olan mutasyonların tümör oluşumuna neden olabileceği öngörülmüştür. Yoshikawa ve ark. (2012), köpeklerdeki p.T1425P ve p.K1435R mutasyonlarının etkilerini incelemişlerdir. İnsan p.K1440R ve p.K1440E mutasyonlarının köpeklerdeki p.K1435R mutasyonuna karşılık geldiğini ve bu mutasyonun *RAD51* ile etkileşimi değiştirerek zararlı etki gösterdiği ifade edilmiştir. İnsanlardaki p.T1430P mutasyonuna karşılık gelen p.T1425P mutasyonunun ise insan ve köpeklerde benzer etkilere neden olduğu bildirilmiştir. Enginler ve ark. (2014), *BRCA2* geninin 12, 24 ve 27'nci ekzonlarında polimorfizm taraması yapmışlardır. Ekzon 12'de iki; ekzon 24'te biri yeni olmak üzere iki; ekzon 27'de ise bir yeni TNP ve yine ekzon 27'de bir *indel* tanımlamışlardır. Ekzon 24'teki TNP'lerden birinin ve ekzon 27'deki TNP'nin yanlış anlam mutasyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Ochiai ve ark. (2015), 236 KMT hastası bireyde saptanmış BRC3 ve BRC4 tekrar bölgelerindeki polimorfizmlerin altı farklı kombinasyonunun *RAD51*'e bağlanmasını iki hibrit analizi ile ölçmüş ve BRC3-4'ün içerdiği 1425P allelinin bağlanma gücünde anlamlı bir düşüş görüldüğünü tespit etmişlerdir. Yoshikawa ve ark. (2015), yedi sağlıklı meme dokusu ve 17 KMT dokusu ile yaptıkları çalışmada *BRCA2* geni ifadesinde promotor bölgede herhangi bir mutasyon saptanmamasına karşın gen ifadesinde anlamlı derecede düşüş tespit etmişlerdir. Sekiz tümör örneğinde iki farklı *splice* varyantı tespit edilen çalışmada varyantlardan birinin çerçeve kayması mutasyonu nedeniyle erken *stop* kodonu oluşumuna yol açtığı ve ifadedeki düşüşün bununla ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Özmen ve ark. (2017a), ekzon 11'de, 19'u yeni olmak üzere toplam 28 somatik TNP tespit etmişlerdir. *In silico* analizlerde sinonim olmayan 21 TNP'nin protein fonksiyonunu değiştirebileceği, dört TNP'nin ise proteine zararlı etkisi olabileceği bildirilmiş; p.T1425P mutasyonunun korunmuş bölgede olması nedeniyle tümör oluşumuyla ilişkili olması en muhtemel mutasyon olduğu ifade edilmiştir. Maués ve ark. (2018), 48 KMT hastasına ait kan ve

doku örneklerinde *BRCA2* geninin ekzon 11’inde görülen varyantların frekansını ve bu frekansların klinik evrelere ve tümör histopatolojilerine göre dağılımlarını araştırmışlardır. Çalışmada üçü muhtemelen zararlı olan toplamda yedi adet varyant tespit edilmiştir. Bu üç varyantlardan en az birini taşıyan 21 KMT vakası III. evre ve üstünde olarak belirlenmiş; vakalardan biri ise bu grubun dışında kalmıştır. Vakaların %97,9’unda tanımlanan yedi polimorfizmden bir ile üç arasında polimorfizme rastlanmıştır. TNP’ler ile ırk, yaş, tümör derecesi ve histopatolojisi arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmemiştir.

BRCA2 ile ilişkisi ve homolog rekombinasyon aracılı DNA tamir mekanizmasındaki işlevi dolayısıyla (Krejci ve ark., 2012) *RAD51* geni KMT vakalarında araştırılan genler arasındadır. Özmen ve ark. (2017b), genin *PALB2* ve *BRCA2* proteinleri ile etkileşime geçtiği domainlerinde yaptıkları çalışma sonucunda iki TNP ve yedi TNV (tekli nükleotit varyantı) tespit etmiş; p.N196D, p.H199D ve p.T225S değişimlerinin zararlı mutasyonlar olduğu ve protein fonksiyonunu etkileyebileceğini bildirmişlerdir. Uemura ve ark. (2019) ise yaptıkları çalışmada p.A209S ve p.T225S mutantlarının *PALB2* proteini ile etkileşimini aksattığını iki hibrit analizi ile göstermişlerdir.

Hennecke ve ark. (2015), malign KMT vakalarının %50’sinde *PFDN5* geninin de bulunduğu bölgede somatik delesyon tespit edildiğini; delesyon görülen vakalarda tümör belirteçlerinden biri olan Ki-67 skorunda artış görüldüğünü bildirmiştir. Gendeki delesyonun tümörün agresifliği ile ilişkili olabileceği, daha kapsamlı çalışmaların gerekli olduğu ifade edilmiştir.

Surdyka ve Slaska (2017), KMT hastası bireylerde mitokondriyal genler olan *ND2*, *COX2*, *ATP6* ve *COX3* genlerinde varyasyon taramışlardır. 28 polimorfik bölge ve 11 mutasyon tanımlanan çalışmada *COX2* geninde saptanan p.N117S ve *COX3* geninde saptanan p.A184T mutasyonlarının amino asit değişikliğine yol açtığı bildirilmiştir.

Lee ve ark. (2019), 20 KMT vakasında yaptıkları ekzom dizileme sonucuna göre *PIK3CA* geninin en sık mutasyon görülen gen olduğunu tespit etmişlerdir (%45). İnsanda sıklıkla görülen p.H1047R mutasyonunun köpeklerde de sıklıkla görüldüğü bildirilmiştir; örneklemin %29’unda bu mutasyonun görüldüğü ifade edilmiştir.

1.3. KMT Patolojisi ve KMT’lerinin Derecelendirilmesi

Tümörler, hücrelerden herhangi birinin otonomi kazanması ve canlının kontrol mekanizmalarının etkisinden kurtulması ile sınırsız çoğalması sonucunda meydana gelen, normal dokulara kıyasla çok daha hızlı bir şekilde gelişen ve tümör oluşumunu başlatıcı etkenler ortadan kalktıktan sonra dahi büyümesini sürdüren yeni doku oluşumlarıdır (Erer ve Kıran, 2005a).

Tümör oluşumunun temelinde genetik hasar ve/veya epigenetik etkisiyle gen ifadelerinde meydana gelen değişiklikler bulunmaktadır. Gerek DNA replikasyonunda meydana gelen hatalar, gerekse virus, mutajenik kimyasallar ve radyasyon gibi ajanların etkileri tümör oluşumunu tetiklemektedir (Cullen ve Breen, 2016).

Tümör kitlesinin büyümesi tek bir hücrenin neoplastik dönüşüm geçirerek bölünmesi ile tek bir klondan köken alarak başlamakta fakat genetik dengesizlikten ötürü zamanla heterojen bir hal almaktadır. Tümörün malignitesini etkileyen kilit noktalar sürekli olarak proliferasyonun uyarılması, büyümeyi baskılayan moleküllerden kaçış, invazyon ve metastazisin aktivasyonu, sürekli hücre bölünmesi, damar oluşumu ve hücre ölümüne karşı dayanıklılık olarak sayılabilir (Cullen ve Breen, 2016).

Tümörler, orijinlerine göre ve tümör tipinin karakterine göre isimlendirilirler. Bölgeye lokalize olan ve çevre dokulara yayılmayan tümörler benign; çevre dokulara ve uzak organlara yayılma eğiliminde olan tümörler ise malign olarak adlandırılmaktadır. Benign tümörlerde tümörün köken aldığı dokunun sonuna “-oma” eki gelerek isimlendirme yapılmaktadır. Malign karakterdeki tümörlerde ise

mezenkimal kökenli tümörler sarkoma, epitelyal kökenli tümörler ise karsinoma olarak adlandırılmaktadır. Adlandırmada çeşitli istisnalar bulunabilmektedir. Tek bir embriyonal yapraktan köken alan fakat farklı dokular içeren tümörler miks tümör; birden fazla embriyonal yapraktan köken alan tümörler ise teratom olarak adlandırılmaktadır (Erer ve Kıran, 2005b).

Meme bezleri parenkim, stroma, kanal, damar ve sinir dokuları içeren; ter bezinden farklılaşmış tübüloalveoler bezlerdir. Meme bezlerinde meydana gelen tümör oluşumları meme tümörü olarak ifade edilmektedir (Sleeckx ve ark., 2011).

KMT vakalarında 1974 ve 1999 yıllarında farklı histolojik sınıflandırma yöntemleri önerilmiştir (Sleeckx ve ark., 2011). Goldschmidt ve ark. (2011), iki yöntemi entegre ederek yeni bir sınıflandırma önermişlerdir ve güncel çalışmalarda histopatolojik sınıflandırmada bu yöntem kullanılmaya başlanmıştır. Goldschmidt ve ark. (2011)'nın sınıflandırması Çizelge 1.1'de görüldüğü gibidir.

Çizelge 1.1. Tümörlerin sınıflandırılması (Türkçeleştirilmiş, (Goldschmidt ve ark., 2011)).

1) Malign Epitelyal Neoplaziler	4) Karsinosarkomalar-Malign Miks Meme Tümörleri
<i>In situ</i> karsinoma Basit karsinoma a. Tübüler b. Tübülopapiller c. Kistik papiller d. Kribriform Mikropapiller invaziv karsinoma Solid karsinoma Komedokarsinoma Anaplastik karsinoma Miks adenoma/miks tümörde karsinoma Kompleks karsinoma Karsinoma ve malign miyoepitelyoma Miks karsinoma Duktal karsinoma İntraduktal papiller karsinoma	5) Benign Neoplaziler Basit adenoma İntraduktal papiller adenoma (Duktal papilloma) Duktal adenoma (Bazaloid adenoma) Skvamoz diferensiasyonlu duktal adenoma Fibroadenoma Myoepitelyoma Kompleks aadenoma (Adenomyoepitelyoma) Benign miks tümör
2) Özel Tipteki Malign Epitelyal Neoplaziler	6) Hiperplazi/Displaziler
Skvamoz hücre karsinoması Adenoskuamoz karsinoma Müsinöz karsinoma Lipitten zengin karsinoma Mekik hücre karsinoması Malign miyoepitelyoma Squamoz hücre karsinoması-mekik hücre varyantı Karsinoma-mekik hücre varyantı	Duktal ektazi Lobuler hiperplazi Düzenli lobuler hiperplazi Sekresyonlu lobuler hiperplazi Fibrozisli lobuler hiperplazi Atipik lobuler hiperplazi
İnflamatuvar (yangısal) karsinoma	Epitelyozis Papillomatosis Fibroadenomatöz değişiklik Jinekomasti
3) Malign Mezenkimal Neoplaziler-Sarkomalar	7) Meme Başı Neoplazileri
Osteosarkoma Kondrosarkoma Fibrosarkoma Hemangiosarkoma Diğer sarkomalar	Adenoma Karsinoma Epidermal infiltrasyonlu karsinoma (Paget benzeri hastalık)
	8) Meme Başı Hiperplazi/Displazileri Meme başı derisinde melanozis

Tümörün malignitesinin belirlenmesinde en önemli kriterler hematoksilen ve eozin boyaması yapılan örneklerde tümör tipi, çekirdekte ve hücrede anlamlı pleomorfizm, mitotik indeks, neoplazi içinde nekrozlu alanların varlığı, tümör çevresinde veya lenfatik invazyonlar ile bölgesel lenf yumrularında metastazis olarak sayılmaktadır (Goldschmidt ve ark., 2011). Meme tümörlerinde histolojik derecelendirmede en yaygın kullanılan yöntem 1998 yılında Elston ve Ellis tarafından önerilen yöntemdir. Tübül oluşumu, çekirdek pleomorfizmi ve mitotik sayım kriterlerinden her biri bir ile üç arasında skorlanarak bu skorlar toplanır. Toplam skor üç ve beş arasındaysa tümör iyi derecede farklılaşma göstermiştir ve tümör derecesi I olarak kabul edilir. Skor altı ve yedi arasındaysa tümör orta derecede farklılaşma göstermiştir ve tümör derecesi II olarak kabul edilir. Skor sekiz ve dokuz arasında ise tümör zayıf düzeyde farklılaşma göstermiştir ve tümör derecesi III olarak kabul edilir

(Cassali ve ark., 2011; Goldschmidt ve ark., 2011 ve Sleenckx ve ark., 2011). Tümör derecesindeki artış zayıf prognozla ve sağkalımdaki düşüşle ilişkilendirilmektedir (Goldschmidt ve ark., 2011).

Çizelge 1.2. TNM sınıflandırması ve klinik evreler (düzenlenmiş) (Cassali ve ark., 2011).

Primer tümör (T)		Bölgesel Lenf Yumruları (N)	
T0 Primer tümöre dair kanıt yok		N0 Bölgesel lenf yumrularında metastazis yok	
T1 Tümör boyutu <3 cm a: bağlı değil b: deriye bağlı c: kasa bağlı		N1 Tek taraftaki lenf yumrularında tutulum a: yok b: var	
T2 Tümör boyutu 3-5 cm a: bağlı değil b: deriye bağlı c: kasa bağlı		N2 Bilateral lenf yumrularında tutulum a: yok b: var	
T3 Tümör boyutu >5 cm a: bağlı değil b: deriye bağlı c: kasa bağlı		Uzak bölgelere metastazis (M)	
T4 Herhangi bir boyutta tümör (yangısal karsinoma)		M0 Yok	
		M1 Uzak lenf yumruları da dahil olmak üzere var	
	T	N	M
Evre I	T1a, b ya da c	N0; N1a ya da N2a	M0
Evre II	T0 T1a, b ya da c T2 a, b ya da c	N1 N1 N0 ya da N1a	M0
Evre III	T3 hepsi T hepsi	N hepsi Nb hepsi	M0
Evre IV	T hepsi	N hepsi	M1

Klinik evreler ise 1980 yılında Owen'ın önerdiği TNM sınıflandırmasına göre belirlenmektedir. Çizelge 1.2'de klinik evrelerin belirlenmesinde kullanılan kriterler ve evreler görülmektedir. Sistemde öncelikle tümöre ilişkin özellikler (T), lenf yumrularının durumu (N) ve metastazis durumu (M) değerlendirilir ve skorlanır. Ardından yapılan değerlendirmeler gruplanarak vakanın hangi klinik evrede olduğu verilere göre tespit edilir. Klinik evreler prognoz için hala kullanılmaya devam edilmektedir. Bunun yanı sıra hormon reseptörleri, anjiyogenezis, adezyon molekülleri gibi çeşitli moleküler belirteçler tümörün karakteri ve prognozu için kullanılabilmektedir (Cassali ve ark., 2011).

1.4. KMT Vakalarının Teşhis ve Tedavisi

KMT vakalarının çoğunda teşhis sırasında vakaların genel sağlık durumunda herhangi bir sorun olmadığı, meme dokusunda rutin muayene sırasında ya da hasta sahibi tarafından tesadüfen bir veya birden fazla kitleye rastlaması sonucu kliniğe başvurulduğu bildirilmiştir (Cassali ve ark., 2011; Sleenckx ve ark., 2011 ve Sorenmo, 2003). Metastazis görülen vakalar veya yangısal tümör vakalarında ise yorgunluk, halsizlik, kilo kaybı, dispne, öksürük, lenfödem, ağrı, topallık, poliüri, polidipsi gibi belirtilere rastlanabilmektedir (Sorenmo, 2003 ve Sleenckx ve ark., 2011).

Klinik muayene anamnez alındıktan sonra fiziksel muayene ile başlar. Fiziksel muayenede hasta sırt üstü pozisyona alınarak meme dokusu ve meme başları bölgesel ülser, yangı, gözle görülebilen bir şişlik olup olmadığı yönünde incelenir, palpasyonla torasik bölgeden inguinal bölgeye doğru her iki meme zincirindeki tüm meme bezleri kitle varlığı açısından kontrol edilir ve bölgesel lenf yumrularında büyüme olup olmadığına bakılır (Cassali ve ark., 2011 ve Sleenckx ve ark., 2011). KMT'lerin genellikle sert, sınırlı, değişken büyüklükte ve deri ile kaslarda hareketli yapılar olarak karşımıza çıktıkları ve lezyonlarda zaman zaman travmalar ve ülserasyonlar görülebileceği bildirilmiştir (Sorenmo, 2003; Cassali ve ark., 2011 ve Sleenckx ve ark., 2011).

Kesin teşhis için cerrahi yöntemle tümörlü dokunun eksizyonu ve ardından histopatolojik muayenesinin yapılması gerekmektedir (Cassali ve ark., 2011; Sleenckx ve ark., 2011 ve Sorenmo, 2003).

İnce iğne aspirasyonu ile tümör dokusu ve lenf yumrularından alınan örnekler ile sitolojik muayene yapılmaktadır. Bu muayene sırasında malignite ile ilişkili olabilecek çekirdek büyüklüğü, biçimi, sayısı, çekirdek-sitoplazma oranı gibi kriterler değerlendirilir ve lenf yumrularında metastazis olup olmadığı tespit edilir (Cassali ve ark., 2011; Novosad, 2003; Sleenckx ve ark., 2011 ve Sorenmo, 2003).

Tedavi öncesi hematolojik ve biyokimyasal değerlerin kontrolü yapılır. Akciğer metastazisinin saptanabilmesi için ventrodorsal, sağ lateral ve sol lateral pozisyonlarda toraks radyografileri çekilir veya bilgisayarlı tomografi kullanılabilir. Uzak organlara metastazis gibi bazı durumlarda abdominal ultrason veya radyografi de klinik muayene prosedürüne dahil edilebilir (Cassali ve ark., 2011; Novosad, 2003; Sleeckx ve ark., 2011 ve Sorenmo, 2003).

Meme tümörü tedavisinde esas tedavi cerrahi müdahale ile yapılmakla birlikte, adjuvant terapi olarak kemoterapi, hormon terapisi ve radyoterapi kullanılabileceği bildirilmiştir. Tümör boyutu, konumu, karakteri ve hastanın genel durumu göz önüne alınarak lumpektomi, basit mastektomi, bölgesel mastektomi, tek taraflı mastektomi ve çift taraflı mastektomi yaklaşımları ile tümör dokusu sınırları geniş tutularak, tümör hücresi sıçramış bölge bırakılmayacak şekilde meme dokusu alınmaktadır. Lenfatik drenaj ile meme zincirindeki diğer meme bezlerine ve lenf yumrularına metastazis gerçekleşebileceği ihtimali nedeniyle operasyon sırasında ilgili lenf yumruları da rutin olarak alınmaktadır. Agresif ve metastatik tümörlerde ilgili meme zincirindeki tüm meme bezleri alınabilmektedir (Cassali ve ark., 2011; Novosad, 2003; Sleeckx ve ark., 2011 ve Sorenmo, 2003).

İnsanlarda meme tümörü vakalarında yaygın olarak uygulanmasına karşın, KMT vakalarında radyoterapi uygulamaları için net bir protokol bulunmamakta ve radyoterapi uygulamalarına nadir olarak rastlanmaktadır (Cassali ve ark., 2011; Novosad, 2003 ve Sorenmo, 2003). KMT vakalarında çeşitli deneysel çalışmalarda kullanılan kemoterapötikler *5-fluorouracil* ve *cyclophosphamide*, *paclitaxel*, *doxorubicin* veya *docetaxel*, *gemcitabine*, *mitoxantrone*, *vincristine* ve *cyclophosphamide*, *doxorubicine* ve *cyclophosphamide*, *doxorubicin*, *cyclophosphamide* ve *5-fluorouracil*, *gemcitabine* ve *carboplatin* kombinasyonları olarak sayılabilir. *5-fluorouracil* ve *cyclophosphamide* kombinasyonu ile *mitoxantrone*, *vincristine* ve *cyclophosphamide* kombinasyonlarının hafif yan etkileri olduğu ve ortalama hayatta kalma süresini anlamlı derecede artırdığı bildirilmiştir (Sleeckx ve ark., 2011). Kemoterapi için *doxorubicin* ve *cyclophosphamide* kullanımı önerilmektedir (Erer ve Kıran, 2005c). Hormon terapilerinin KMT vakalarında

denendiği çalışmalarda GnRH agonisti goserelin ile hormon ilişkili KMT vakalarında insanlara paralel sonuçlar alındığı, progesteron reseptör blokörü aglepristone ile PR pozitif vakalarda proliferasyonun azaldığı bildirilmiştir (Sleeckx ve ark., 2011).

1.5. KMT ve İnsan Meme Tümörleri Arasındaki Benzerlikler

Meme tümörleri dişi köpeklerde (Dobson ve ark., 2002; Merlo ve ark., 2008 ve Vascellari ve ark., 2009) ve kadınlarda (Ferlay ve ark., 2015) en yaygın görülen kanser tipidir. Gerek klinik, gerekse moleküler açıdan iki türde meme tümörleri arasında yüksek derecede benzerlik görülmektedir (Queiroga ve ark., 2011). Kanser gelişimi her iki türde de spontan olarak görülmektedir (Dobson ve ark., 2002; Gamlem ve ark., 2008; Hamilton, 1974; Merlo ve ark., 2008; Moulton ve ark., 1970; Sleeckx ve ark., 2011; Sorenmo, 2003 ve Vascellari ve ark., 2009). KMT vakaları insan meme tümörleri ile klinik, histopatolojik, biyokimyasal ve sitolojik bulgular ile oluşum mekanizmaları bakımından yüksek oranda benzerlik göstermektedir (Abdelmegeed ve Mohammed, 2018; Antuofermo ve ark., 2007; Cassali ve ark., 2007; Kumaraguruparan ve ark., 2006a; Kumaraguruparan ve ark., 2006b; Rivera ve ark., 2009 ve Rivera ve von Euler, 2011).

Yaşa bağlı meydana gelen meme tümörü vakaları insanlarda 25, köpeklerde ise beş yaşından önce çok nadir olarak gözlenmektedir (Egenvall ve ark., 2005) ve her iki türde de meme tümörü vakalarından etkilenen bireylerin genellikle orta yaş grubuna dahil oldukları görülmektedir (Abdelmegeed ve Mohammed, 2018). Her iki türde de yaş arttıkça tümörün malignitesinde artış olduğu ifade edilmektedir. Her ne kadar benign tümörler için en çok görülen histopatolojik tipler farklılık gösterse de her iki türde de ortak olarak basit karsinomalar en yaygın görülen malign tümörler olarak tespit edilmiştir (Sorenmo ve ark., 2009).

İnsan ve köpek meme tümörlerinde anjiyogenez ve kan damarlarının morfolojilerinin benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Sleeckx ve ark., 2014). Ayrıca meme dokusunda saptanan kolumnar hücre lezyonlarının (meme tümörü gelişiminde

etkili olduğu düşünölen öncöl oluşumlardan biri) patolojik ve immunofenotipik olarak birbirlerine benzedikleri ifade edilmektedir (Ferreira ve ark., 2010). İnsan ve köpeklerde meme tümörü vakalarında T-lenfosit infiltrasyonuna ilişkin yayınları değerdendiren Carvalho ve ark. (2014), regölatör T hücrelerinin arttığı vakalarda zayıf prognoz, malignite ile tümöre infiltre olan lenfositler arasındaki ilişki, CD4+/CD8+ olan T hücrelerinin sağkalımı düşürmesi ve yardımcı T2 hücrelerinin tümörün ilerlemesini uyarması durumlarını iki tür arasındaki benzer özellikler olarak değerdendirmişlerdir. Caceres ve ark. (2017), köpek ve insan yangısal meme tümörü hücre hatlarını kök hücre belirteçlerinin ifadeleri, protein üretimi, *in vivo* tümör oluşturma kapasiteleri açısından karşılaştırmış ve her iki hücre hattının yangısal meme tümörü vakalarının çalışılmasında uygun modeller olduklarını bildirmişlerdir. Mohammed ve ark. (2011), tarafından yapılan bir çalışmada ise KMT'lerin oluşum, patern, makro ve mikrokalsifikasyonlar açısından insanlara benzer mammografik anomaliler gösterdiği tespit edilmiş ve BI-RADS'ın (Meme Görüntöleme Raporlama ve Veri Sistemi) köpeklerde maligniteyi %90 hassasiyet ve %82,8 spesifite ile doğru şekilde tespit ettiğı bildirilmiştir. Epitelyal-mezenkimal transisyonda etkili olduğu düşünölen vimentin filamentlerinin aşırı ifadesi tümör büyüklüğü, tümör derecesi, anjiyogenez, proliferasyon katsayısı ve vasköler invazyon ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuş, insanlardaki vakalarda olduğu gibi KMT vakalarında da vakanın ciddiyeti ile ilişkilendirilmiştir (Rismanchi ve ark., 2014). Kanser ilişkili stromadan (CAS) elde edilen örneklerle yapılan bir çalışmada (Ettlin ve ark., 2017) ACTA2, COL1A1, FAP, PDGFRB gibi CAS belirteçlerinin gen veya protein ifadelerindeki regölasyonun insan ve köpek meme tümörlerinde yüksek oranda benzerlik gösterdiği ayrıca CAS biyolojisinde bu iki tür arasında önemli ölçüde benzerlik bulunduğu bildirilmiştir. İnvaziv KMT vakalarında yapılan bir araştırma kapsamında (Nguyen ve ark., 2018) teşhis yaşı, tümör boyutu, lenfovasköler invazyon, histolojik derece, ER α , PR, Ki-67, HER2, bazal sitokeratinler 5 ve 6 ile EGFR gibi prognostik faktörler değerdendirilmiş ve Cox orantısal risk modeli hazırlanarak insanlardaki invaziv meme tümörü vakalarıyla karşılaştırılmış, iki tür arasında prognoz açısından birçok benzerlik bulunduğu ifade edilmiştir. Aynı örneklem grubu ile yapılan ikinci bir çalışmada (Abadie ve ark., 2018) KMT vakaları insanlardaki immunofenotiplendirmeye uygun olarak sınıflandırılmış, popölasyonun %76'sını üçlü negatif (ER, PR ve HER2 ifadesi

negatif) KMT vakalarının oluşturduğu; bu vakaların oldukça agresif özellik gösterdikleri ayrıca insan üçlü negatif meme tümörü vakaları için model olarak kullanılma potansiyellerinin bulunduğu belirtilmiştir.

BRCA1, BRCA2, RAD51, EGFR, Ki-67, HER2/neu, p53, p63 genleri her iki türde de tümör gelişiminde kritik rol oynamaktadır ve uzun süre östrojene maruziyetin tümör görülme riskini artırdığı bilinmektedir (Abdelmegeed ve Mohammed, 2018). Benzer şekilde, *ATM* geni ve proteinindeki ifade düşüşü insan ve köpeklerde tümör gelişiminde rol oynamaktadır (Raposo-Ferreira ve ark., 2016). Özellikle üçlü negatif vakalar olmak üzere IGF1R ifadesi yüksek olan KMT vakalarında prognozun insanlara benzer şekilde olumsuz etkilendiği bildirilmiştir (Jaillardon ve ark., 2015). Spontan KMT örneklerinden elde edilmiş hücre hatlarında HOX genlerinin ifadelerini araştıran DeInnocentes ve ark. (2015), *HOXA11* ve *HOXC9* genlerinin tümör baskılayıcı olabileceğini ayrıca *HOXA1, HOXA13, HOXD4* ve *HOXD9* genlerinin ise onkogen olma potansiyellerinin bulunduğunu ve bu gen ifadelerindeki değişimin KMT vakaları ile insan meme tümörü vakalarında örtüştüğünü bildirmişlerdir. Glutamin metabolizmasının tümör hücrelerinin hayatta kalmasındaki önemini belirten Ryu ve ark. (2018), bu metabolizmada aktif rol oynayan GLS1 ifadesinin insan meme tümörü vakalarına benzer şekilde klinik patoloji ile korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Az sayıda örnekle yapıldıkları için güvenilirlikleri düşük olmakla birlikte, bazı biyobelirteçlerin KMT ve insan meme tümörü vakalarında ortak olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir (Kaszak ve ark., 2018).

Germ hattı mutasyonlarına ilişkin yapılmış çalışmalar bölüm 1.2.2.5'te özetlenmeye çalışılmıştır. Yapılan çalışmalar insanlarda görülen mutasyonların köpeklerde görülüp görülmediği üzerine tasarlanmış araştırmalardır. Bununla birlikte, insan ve köpeklerde *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde saptanan mutasyonlar karşılaştırıldığında korunmuş bölgelerde ortak mutasyonların bulunduğu da bildirilmiştir (Goebel ve Merner, 2017).

Yapılan çalışmalarda kanser vakalarında ifade değişikliği bulunan birçok genin türler arasında birbirinin ortoloğu olduğu ve regülasyonlarının benzer şekilde

değiştirdiği, ayrıca siklin bağımlı kinaz tümör baskılayıcı gen ailesinin üyelerinde iki türde de delesyon ve kayıp görüldüğü bildirilmiştir (Kabir ve ark., 2016). Hücre büyümesi, proliferasyonu ve hücrenin hayatta kalması ile ilişkili MTOR ifadesinin meme tümörü dahil insanlarda birçok tümör ile ilişkilendirildiği yapılan bir çalışmada (Delgado ve ark., 2015) belirtilmiş, fosfo-MTOR ifadesinin incelenen KMT vakalarının %78'inde arttığı bildirilmiştir. Uva ve ark. (2009), insan ve köpeklere ait tümörlü ve sağlıklı dokularda genom boyu gen ifadesi verilerini karşılaştırmış ve her iki türde tümörlü dokularda ifade değişikliği gösteren ortak genler olduğunu ifade etmişlerdir. Yolak analizleri sonrasında PI3K/AKT, KRAS, PTEN, WNT-beta katenin ve MAPK gibi kanser ile ilişkili yolların her iki türde de benzer şekilde etkilendiklerini bildirmişlerdir. Klopffleisch ve ark. (2010b), metastatik köpek karsinoma vakaları ile insan meme tümörü vakalarını proteom analizi ile karşılaştırmışlardır. Çalışmada 21 proteinin ifadesi metastatik ve metastatik olmayan KMT'ler arasında farklılık göstermiştir. İfade farklılığı saptanan 21 proteinden 19'unun insanlarda meme tümörü dahil çeşitli kanser tiplerinde daha önce malignite veya metastazis ile ilişkilendirilmiş proteinler oldukları, yine dokuz proteinin (EEF1D, FTL, PGDH, PCNA, RANBP1, TPM3, MASPIN, TPM1 ve VCL) ise KMT ve insan meme tümörü vakalarında benzer şekilde ifade edildikleri bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada (Zamani-Ahmadmahmudi ve ark., 2014) köpeklerde serumda proteom analizi ile tümör antijenlerinin tanımlanması ve biyobelirteç tespiti amaçlanmıştır. Tespit edilen otoantijenlerin daha öncesinde insanlarda da meme tümörü vakalarında bildirildikleri ifade edilmiştir. Mikrodizin analizi ile yapılan bir başka çalışmada (Klopffleisch ve ark., 2010c) metastatik olan ve olmayan KMT örneklerinde 1011 genin anlamlı derecede farklı ifade edildiği, bu genlerden hücre bölünmesi, hücre büyümesi, kinaz aktivitesi, translasyon, G1-S kontrol noktası ve transkripsiyonun regülasyonu ile ilişkili 265 genin insan meme tümörü vakalarında da benzer şekilde ifade edildikleri gösterilmiştir. Hussain ve ark. (2018), sağlıklı köpek meme dokuları ve KMT vakalarına ait dokularda gerçekleştirdikleri gen ifadesi profilendirme çalışmasında farklı ifade edilen genler ve ilişkili oldukları yolların insanlarda da çeşitli tümör tipleri ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Amini ve ark. (2019), köpek basit karsinomalarına ait formalinle fikse edilerek parafine gömülmüş stromalar ile RNA dizileme çalışması yaparak regülasyonunda değişiklikler olan genleri ve bu

genlerin ilişkili olduğu yolları tespit etmeye çalışmışlardır. Çalışmada elde edilen sonuçlar veri tabanlarında kayıtlı insan basit karsinomaları ile yapılan çalışmalarla karşılaştırılmış ve veri tabanlarından elde edilen sonuçlar ile çalışmanın bulgularının paralel şekilde anjiyogenez, epitelyal-mezenkimal transisyon, glikoliz, allograft reddi, interferon gama ve alfa yanıtları, komplement, erken ve geç östrojen yanıtları, adipogenez, yağ asidi metabolizması, E2F hedefleri, G2M kontrol noktası, MYC hedefleri, mitotik iğ, katlanmamış protein yanıtı, miyogenez ve mTORc yollarında gen ifadelerinde değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir (Amini ve ark., 2019). Benign ve malign tümörlere ait stromalarda yapılan gen ifadesi çalışmasında ise ifadelerinde artış görülen epitelyal-mezenkimal transisyon ile ilişkili *COL11A1*, *COL8A2* ve *ADAM12* genlerinin insanlarda olduğu gibi köpeklerde de invaziv karsinomalarda potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Amini ve ark., 2020).

Kanser vakalarının yalnızca genetik değil, aynı zamanda epigenetik faktörlerden etkilendiği bilinmekte, bu da araştırmacıları her iki türde de epigenetik mekanizmaların ve bu mekanizmalarda aktif rol alan genlerin tümör oluşumu ve gelişimini araştırmaya yönlendirmektedir. Mikro RNA (miRNA) ifade profillerinin kanser vakalarında değiştiği ve KMT vakaları ile insan meme tümörü vakalarında bu ifade değişikliklerinin güçlü bir korelasyon gösterdiği belirtilmektedir (Kabir ve ark., 2016). Boggs ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada insanlarda onkomir olarak kabul edilen 10 adet miRNA'nın KMT vakalarında ifadelerini incelemiş; bir miRNA haricinde ifade paternlerinin her iki türde de örtüştüğünü ifade etmişlerdir. Köpeğe ait sağlıklı meme epitel hücre kültürü ve KMT vakalarına ait hücre kültüründen elde edilen ekzozomlarda yapılan bir çalışmaya göre (Fish ve ark., 2018) insan meme tümörü vakalarında olduğu gibi, köpeklerde de sağlıklı ve tümörlü hücre hatlarından elde edilen ekzozomlarda miRNA ifadelerinde farklılıklar olduğu görülmüştür.

DNA metiltransferaz inhibitörü 5-Azasitidinin *in vitro* etkileri insan, köpek ve kedi sağlıklı ve tümörlü meme hücresi hatlarında araştırılmış, gen ifadeleri üzerine farklı hücre hatlarında değişen etkiler tespit edilmekle birlikte, tümörleşmede azalma olduğu görülmüştür (Harman ve ark., 2016). Choi ve ark. (2016), önemli bir epigenetik regülatör olan EZH2 ifadesini araştırmış ve insanlarda görülen meme tümörü

vakalarına benzer şekilde KMT vakalarında da bu proteinin ifadesinde anlamlı derecede artış olduğunu bildirmişlerdir. Jeong ve ark. (2019)'ın çalışmaları KMT vakalarında insanla benzer şekilde genom boyu hipometilasyon görüldüğünü bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *ARHGEF2*, *TNFRSF12A*, *SFRP2* gibi apoptozis ile ilişkili genlerde hipermetilasyon ve insanlarda onkogen kabul edilen *HRAS*, *FAM83H*, *RET* gibi genlerde ise hipometilasyon görüldüğü, ayrıca iki tür arasında korunmuş olduğu bilinen miR-96 ve miR-149 ifadelerinin regülasyonunda farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Nam ve ark. (2020), çalışmalarında intronik bölgelerdeki metilasyon durumunun insan ve köpeklerde korelasyon gösterdiğini ve her iki türde tümör baskılayıcı PAX5 transkripsiyon faktörü motifine sahip *CDH5* ve *LRIG1* genleri ile onkogenik PAX6 transkripsiyon faktörü motifine sahip *CDH2* ve *ADAM19* genlerinin ifadelerinin paralellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Schabert ve ark. (2020), *ANK2* genine ait CpG adacıklarının birinde köpek ve insan meme tümörlerinde benzer şekilde hipermetilasyon olduğunu göstermişlerdir.

Her iki türde de bazı ırklarda meme tümörüne predispozisyon görülmektedir. Örneğin; insanlarda Aşkenazi Yahudilerinde *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları (Roy ve ark., 2012) ve Finlandiya kökenli popülasyonlarda tekrarlayan *PALB2* mutasyonları (Obermeier ve ark., 2016) meme tümörüne predispozisyon ile ilişkilendirilmiştir. Köpeklerde ise *Fox terrier* (Cohen ve ark., 1974), *Cocker spaniel* (Andrade ve ark., 2017; Atalay Vural ve Aydın, 2001; Cohen ve ark., 1974; Egenvall ve ark., 2005; Salas ve ark., 2015 ve Sontas ve ark., 2009), *Boston terrier* (Cohen ve ark., 1974 ve Macvean ve ark., 1978), *Pointer* (Andrade ve ark., 2017; Atalay Vural ve Aydın, 2001; Köküslü ve Akkayan, 1972 ve Macvean ve ark., 1978), *Poodle* (Andrade ve ark., 2017; Atalay Vural ve Aydın, 2001; do Carmo Silva ve ark., 2019; Köküslü ve Akkayan, 1972; Macvean ve ark., 1978; Salas ve ark., 2015; Sontas ve ark., 2009 ve Türkaslan ve ark., 1983), *English springer spaniel* (Egenvall ve ark., 2005), *Doberman* (Atalay Vural ve Aydın, 2001; do Carmo Silva ve ark., 2019 ve Egenvall ve ark., 2005), *Boxer* (Atalay Vural ve Aydın, 2001; Egenvall ve ark., 2005; Köküslü ve Akkayan, 1972; Sontas ve ark., 2009 ve Türkaslan ve ark., 1983), *Softcoated wheatan terrier* (Egenvall ve ark., 2005), *German shepherd*, *Labrador retriever* (Salas ve ark., 2015), *Maltese* (Andrade ve ark., 2017), *Yorkshire terrier* (Andrade ve ark., 2017 ve

Egenvall ve ark., 2005), *Dachshund* (Andrade ve ark., 2017; Atalay Vural ve Aydın, 2001 ve do Carmo Silva ve ark., 2019) ırklarında meme tümörü vakalarına predispozisyon görüldüğü bildirilmiştir.

1.6. HR Aracılı DNA Tamir Mekanizması ve KMT Gelişimi Üzerine

Etkileri

DNA karmaşık ve kırılgan organik bir moleküldür. DNA replikasyonu sırasında meydana gelen hatalar ve genetik materyalin kimyasal yapısında meydana gelen hasarlar mutasyonlara neden olmaktadır. Organizmalar mutasyonlara karşı çeşitli DNA onarım sistemlerini kullanmaktadır. Hasarlı DNA onarımdan kaçtığına direkt tamir, hasarlı bazların çıkarılması, hatalı nükleotitlerin çıkarılması, iplikler arası çapraz bağların tamiri; çift zincir kırıklarında ise homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uçların birleştirilmesi (NHEJ) gibi mekanizmalar ile tamir edilmektedir (Sancar ve ark., 2004).

Çift zincir kırıklarında genomun bütünlüğü temel olarak HR ve NHEJ mekanizmaları ile sağlanmaktadır. NHEJ mekanizması kırık uçların birleştirilmesini kapsar ve hücrenin G0/G1 ve G2 evresinde daha baskındır, HR mekanizması ise S ve G2 fazlarının ortalarında ve kardeş kromatidin halihazırda bulunduğu durumlarda daha yaygın olarak devreye girmektedir. NHEJ tamir mekanizmasında insersiyon, delesyon, substitüsyon ve translokasyon gibi çeşitli hatalar meydana gelebilmektedir. HR mekanizması ise çift zincir kırığı gerçekleşmiş olan bölgenin kardeş kromatidinin veya homolog kromozomunun kalıp olarak kullanılarak iplikçiklerin sentezlenmesi temeline dayanmaktadır (Ceccaldi ve ark., 2016; Chapman ve ark., 2012; Sancar ve ark., 2004; Scully ve ark., 2019 ve Vítor ve ark., 2020). Çift zincir kırıklarının tamirinde bu iki temel mekanizma haricinde alternatif uç birleştirme, mikrohomojoloji aracılı uç birleştirme, tek zincir bağlanması ve kırık ile indüklenmiş replikasyon gibi hata oluşumuna açık bazı mekanizmalar da ortaya çıkabilmekte ve bu tür durumlar onkogenik etkilere neden olabilmektedir (Ceccaldi ve ark., 2016 ve Scully ve ark., 2019).

Hücreler iyonize radyasyona veya çift zincir kırığı oluşumuna neden olan başka bir etkene maruz kaldıklarında hangi tamir mekanizmasının aktive edileceği birden fazla faktöre bağlıdır. Hücre döngüsünün hangi fazda olduğu, kırık uçların rezeksiyonunun boyutu, BRCA1 ve 53BP1 mediyatörleri arasındaki denge, DNA hasar yanıtıyla ilişkili kinazlar, kırık oluşumu üzerinden geçen süre, kırık uçların birbirlerine uzaklıkları ve konumları, histon modifikasyonları, kromatinin yeniden modellenmesi, hücre döngüsüne göre ortamda bulunan proteinler ve bu proteinlerin birbirleri ile etkileşimi, aktive edilecek tamir mekanizmasını belirlemektedir (Ceccaldi ve ark., 2016; Chapman ve ark., 2012; Her ve Bunting, 2018 ve Scully ve ark., 2019).

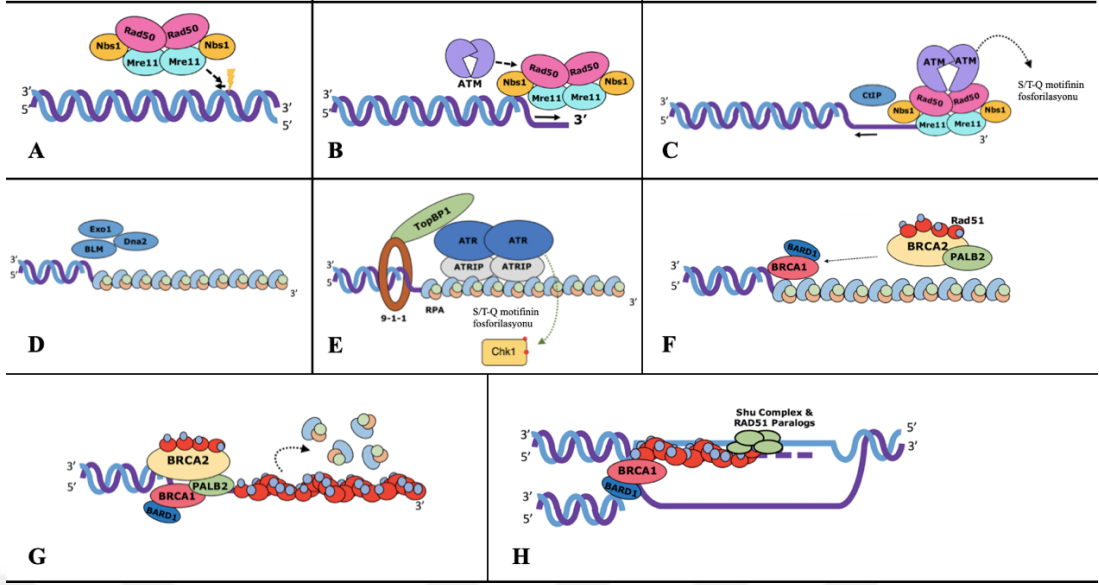
HR mekanizmasında tamir reaksiyonundan önce DNA hasar tespiti ve tamir proteinlerinin devreye sokulabilmesi için fosforilasyon, ubikuitinasyon, ribozilasyon ve asetilasyon gibi bir seri kromatin ve protein modifikasyonları gerçekleştirilir (Murphy ve Moynahan, 2010). Kırık bölgesi kromatinle ilişkili MRN (MRE11/RAD50/NBS1) kompleksi tarafından tespit edilir ve ATM olarak adlandırılan ve sinyal iletiminde görev yapan bir serin-treonin kinaz aktivitesinde artış görülür (Sun ve ark., 2020). PAR, RAD17, MDC1, CtIP, CHK1, CHK2, H2AX, BRCA1, CDK, ATR, RPA ve TOPB1 proteinleri, ATM aktivitesi ile fosforillenir. MRN kompleksinin hasarlı bölgede tutulması ve toplanması H2AX'in MDC1, CtIP, PAR ve RAD17'ye bağlanmasına bağlıdır. ATR-CHK1 yapısı RPA proteinlerinin RAD17'den bağımsız bir şekilde fosforilasyonunu uyararak hasarlı DNA'nın rezeksiyonundan sonra zincir tamirini yönetir. S/G2 fazında sinyal iletimi sonrasında CtIP BRCA1'den ayrılarak MRN kompleksine bağlanır. BRCA1, RAD50 komponenti üstünden MRN kompleksine bağlanır. MRE11'in ve MRN kompleksine bağlı CtIP'nin 5'→3' ekzonükleaz aktivitesinin ardından BLM, EXO1 ve DNA2 aktiviteleri ile DNA'da yaklaşık 1 kilobaz (kb) uzunluğunda tek zincirli kuyruklar oluşturulur (Abass ve ark., 2016; Krejci ve ark., 2012 ve Marini ve ark., 2019).

RAD51 proteini HR'de sinaps öncesi aşamada, sinaps aşamasında ve sinaps sonrası aşamada görev yapmaktadır (Bhattacharjee ve Nandi, 2016). Sinaps öncesi aşamada RAD51 MRN kompleksi tarafında oluşturulmuş ve sonrasında RPA proteiniyle kaplanmış tek zincirli DNA molekülüne bağlanır ve sinaps öncesi filamenti

oluşturur. BRCA2-PALB2 kompleksi, BRCA1'in BARD1 ile oluşturduğu heterodimer yapıya bağlanabilir. RAD50 dimerlerinin *coiled-coil* domainleri aracılığıyla DNA uçları arasında bir köprü oluşturulur. Tek zincirli DNA kuyrukları RAD52 (memelilerde bu fonksiyonu BRCA2 gerçekleştirmektedir) tarafından tanınır (Zhao ve ark., 2019). Sinaps aşamasında RAD51 homolog DNA dubleks ve tek zincirli DNA arasında fiziksel bağlantı kurulmasını ve *D-loop* (yer değişimi ilmeği) formasyonu oluşumunu sağlar (Abass ve ark., 2016 ve Krejci ve ark., 2012). BRCA2'nin yardımıyla RAD51 nükleoproteini tek zincirli DNA'ya yüksek derecede affinitesi olan ve tek zincirli DNA uçlarında bulunan RPA proteini ile yer değiştirir (Murphy ve Moynahan, 2010). Bu sayede RAD51 tarafından 3' kuyruklar sağlam diziler ile buluşturulur ve homolog rekombinasyon aracılı DNA tamiri başlatılır. HR mekanizması sırasında sinaps aşamasına kadar gerçekleşen basamaklar Şekil 1.1'de de görüldüğü gibidir (Sun ve ark., 2020).

Sinaps sonrası aşamada, hasarsız homolog kromozoma ait DNA zincirleri kalıp olarak kullanılır, tek zincirli DNA'nın 3' ucu primer görevi görerek zincirin onarımı gerçekleşir, RAD51 DNA sentezi için gerekli 3'-OH grubuna maruz kaldığında çift zincirli DNA'dan ayrılır. Daha sonra *Holliday* bağlantısı adı verilen heterodubleks yapı ayrılarak tamir edilen DNA zincirleri ligasyonla birleştirilir (Abass ve ark., 2016; Krejci ve ark., 2012 ve Murphy ve Moynahan, 2010).

BRCA2 proteini insanlarda RAD51'in ana mediatörüdür ve aralarında herhangi bir homoloji bulunmamasına rağmen; mayadaki RAD52 proteininin fonksiyonunu üstlenerek, RAD51'in nükleoprotein filamentlerini oluşturmasını kontrol etmektedir. BRCA2'nin C-terminusu RAD51 ile etkileşime girerek tek zincirli DNA'ya bağlanma affinitesini artırmakta ve RPA ile yer değişimini sağlamaktadır. Yeni sentezlenen DNA'nın degradasyonunun önlenmesi için BRCA2 proteini kritik bir rol oynamaktadır (Krejci ve ark., 2012).



Şekil 1.1. HR basamakları sinaps aşaması (Sun ve ark., 2020; düzenlenmiş ve Türkçeleştirilmiştir).

A: Çift zincir kırığı ve MRN kompleksinin bölgeye gelişi. **B:** MRN kompleksi sayesinde ATM'in kırık bölgesine gelmesi. **C:** ATM substratlarının fosforilasyonu ve kısa rezeksiyon. **D:** BLM, EXO1 ve Dna2 ile zincirin uzun rezeksiyonu ve tek zincirli DNA'nın RPA ile kaplanması. **E:** ATR-ATRIP, RAD9-HUS1-RAD1(9-1-1) ve TOPBP1'in bölgeye gelmesi ve CHK1 fosforilasyonu. **F:** BRCA1-BARD1 kompleksi ve BRCA2'nin PALB2 aracılığıyla bölgeye gelişi. **G:** RAD51'in BRCA2 aracılığıyla RPA ile yer değiştirmesi. **H:** Homoloji araması ve zincir invazyonu ile *D-loop* formasyonu oluşumu (İnsanlarda Shu kompleksinin yerini SWS1 ve SWSAP1 kompleksleri almaktadır).

PALB2 proteini BRCA1 ve BRCA2 arasında köprü görevi görerek BRCA2'nin kırık bölgesine gelmesini sağlamaktadır (Chapman ve ark., 2012). BRCA2'nin N-terminusu ile etkileşime giren PALB2 proteini, BRCA2 regülasyonu ve direkt olarak RAD51 fonksiyonunu etkileyerek homolog rekombinasyonda oldukça önemli roller oynamaktadır. PALB2, BRCA2'nin biyokimyasal ve tümör baskılayıcı işlevlerinde anahtar regülatör görevi görmektedir. Çekirdekte BRCA2 ile birlikte bulunan PALB2, kromatin dağılımını yöneterek BRCA2'nin stabilizasyonunu sağlar. PALB2 oligomerizasyonu ise RAD51'in DNA hasar bölgesine gelişini ve bölgede stabilize olmasını yönetmektedir. PALB2, RAD51 ile birlikte DNA'ya bağlanarak *D-loop* formasyonunun oluşumunu yönetir (Krejci ve ark., 2012 ve Prakash ve ark., 2015). Bununla birlikte hücre döngüsünün G1 fazında BRCA1-PALB2-BRCA2-RAD51 rekombinaz kompleksi PALB2'nin proteozom degradasyonuna uğraması sonucunda baskılanmaktadır (Scully ve ark., 2019). Bu durum *PALB2* geninin HR mekanizmasındaki önemini gözler önüne sermektedir.

Köpeklerde ve insanlarda görülen meme tümörü, prostat kanseri, osteosarkoma, cilt kanseri ve bazı hematolojik kanserlerin bir bölümü DNA tamir

mekanizmalarındaki aksaklıklar ile ilişkilendirilmektedir (Grosse ve ark., 2014). Çift zincir kırıklarının onarımında meydana gelen bozukluklar insanlarda meme ve ovaryum kanserlerine ailesel yatkınlıkla ilişkilendirilmiştir (O’Kane ve ark., 2017 ve Roy ve ark., 2012). Örneğin; insanlarda germ hattında *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine ait mutasyonların meme tümörü riskini popülasyondaki diğer bireylere göre %20-30 artırdığı; Finlandiya’da ise *PALB2* genindeki bir kurucu mutasyonunun bu riski iki-üç kat artırdığı bilinmektedir. Bu genler hasarlı genlerin tamirinde rol oynamakta olan tümör baskılayıcı genlerdir (Murphy ve Moynahan, 2010). Rivera ve ark. (2009)’nın yapmış oldukları çalışmada *English springer spaniel* ırkı köpeklerde de *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin tümör oluşumuna katıldığı gösterilmiştir. Ailesel meme kanserlerinin geri kalan kısmının ise HR aracılı DNA tamir mekanizmasında görevli *CHK2* (*CHEK2*), *ATM*, *PALB2*, *BARD1*, *RAD51C* ve *BRIP1* gibi genlerdeki mutasyonlardan kaynaklandığı ifade edilmektedir (O’Kane ve ark., 2017 ve Roy ve ark., 2012).

1.6.1. BRCA2, RAD51 ve PALB2 Tümör Baskılayıcı Kompleksi

HR mekanizmasında görevli BRCA2, RAD51 ve PALB2 tümör baskılayıcı komplekse ilişkin çeşitli çalışmalar yapılmış ve bu proteinlerin birbirleri ile olan etkileşimleri araştırılmıştır. Köpeklerde ise yapılmış çalışmalar ve bu proteinlere ilişkin bilgiler kısıtlıdır. Bu bölümde insanlarda bu kompleksin yapısına ve etkileşimlerine ilişkin genel bilgiler verilmiştir. Köpeklerdeki etkileşim bölgelerine ilişkin veriler ise 1.6.2.1; 1.6.2.2. ve 1.6.2.3 başlıklarında sunulmuştur.

İnsanlarda RAD51 proteini tek zincirli ve çift zincirli DNA’ların fosfat iskeletini tanımakla görevli yaklaşık 84 rezidüye sahip amino ucu ve ATP bağlanması ile hidrolizinden sorumlu 240 rezidülük bir karboksil ucu olmak üzere 339 amino asitten oluşmaktadır. Sinaps öncesi komplekste her bir RAD51 proteini üçlü DNA yapıları ile etkileşim kurar. Fiziksel olarak RPA70’in 168-327 rezidüleri ile etkileşime girmektedir (Sun ve ark., 2020).

RAD51'in tek zincirli DNA'ya bağlanmasını sağlayan en önemli aracı 3418 amino asitten oluşan BRCA2 proteindir (Prakash ve ark., 2015). BRCA2, PALB2 proteini ile direkt etkileşime geçer bu sayede kırık bölgesine gelerek PALB2 aracılığıyla BRCA1 ile dolaylı olarak etkileşimde bulunur. Karboksil ucundaki DNA bağlanma bölgeleri ile tek zincirli DNA'ya bağlanır (Prakash ve ark., 2015; Roy ve ark., 2012 ve Sun ve ark., 2020). BRCA2 proteininin RAD51 ile etkileşime geçen ve bu proteinin oligomerizasyonunu inhibe eden bir BRC4 motifi, PALB2 proteininin *WD40* domaini ile etkileşime geçen amino bölgesi, karboksil ucunda ise heliks domaini ve tek zincirli DNA'ya ve DSS1 proteinine bağlanmasını sağlayan üç adet DNA bağlanma bölgesi bulunmaktadır (Murphy ve Moynahan, 2010; Prakash ve ark., 2015; Roy ve ark., 2012 ve Sun ve ark., 2020). BRCA2, RAD51 ile karboksil ucundaki 36 amino asitlik diziden oluşan sekiz adet BRC tekrarı ile etkileşime geçmekte; ilk dört BRC tekrarı RAD51'in ATPaz aktivitesini baskılayarak tek zincirli DNA'ya bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Diğer BRC tekrarları ise RAD51 filamentinin stabilizasyonunu sağlamaktadır. Bunun yanı sıra karboksil ucunda 3265-3330 amino asitleri arasında başka bir RAD51 bağlanma bölgesi mevcuttur (Roy ve ark., 2012 ve Sun ve ark., 2020).

PALB2 proteini BRCA1 ve BRCA2 ile kompleks oluşturarak BRCA2'nin kırık bölgesine gelişini sağlamaktadır (Sun ve ark., 2020). Amino bölgesinde BRCA1'in *coiled-coil* yapısı ile etkileşime geçtiği bir *coiled-coil* domaini; proteinin merkezinde 395-446 amino asitleri arasında PALB2'nin kromatinde lokalizasyonunu sağlayan *ChAM* (kromatin bağlama motifi) ile, karboksil ucunda ise BRCA2'nin 18 amino asitlik bölgesi ile etkileşime geçtiği *WD40* domaini bulunmaktadır (Buisson ve ark., 2014; Prakash ve ark., 2015 ve Sun ve ark., 2020). BRCA2, *WD40* domaininin β -yaprak (β -*propeller*) yapısının dış kısmı ile polar etkileşimler kurar, RAD51 proteiniyle ise hem amino ucundaki 1-200 arası rezidüleri ile hem de karboksil ucundaki 853-1186 rezidüleri ile etkileşime geçer. Hem PALB2 hem de BRCA1-BARD1 kompleksinin rekombinasyon ve zincir değişimi sırasında RAD51 nükleoprotein filamentlerinin stabilizasyonunu sağladığı düşünülmektedir (Sun ve ark., 2020). Bununla birlikte PALB2 ve BRCA2 komplekslerinin çökmüş replikasyon çatallarına HR mekanizmasında aktif görev yapan üç DNA polimerazdan biri olan

Polh'nın (DNA polimeraz eta) birikimini sağladığı ve DNA sentezi için Polh ve PALB2 arasındaki direkt etkileşimin gerekli olduğu bildirilmiş; Polh ile etkileşime geçen bölgelerin PALB2 için *WD40* domaini; BRCA2 için ise BRC3, BRC4 ve BRC5 domainlerini kapsayan bölge olduğu tespit edilmiştir (Buisson ve ark., 2014).

RAD51, BRCA2 ve PALB2 mutasyonları insanlarda incelendiğinde sırasıyla BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu taşıyanlarda meme tümörü; meme, prostat, ovaryum kanseri; meme ve pankreas kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Bunun haricinde PALB2 ve BRCA2 mutasyonlarında *fanconi* anemi de görülmektedir (Krejci ve ark., 2012).

1.6.2. *PALB2* Geni ve Proteini

PALB2 (*Partner and Localizer of BRCA2*) proteini HR mekanizmasında, DNA iplikçikleri arasında görülen çapraz bağların tamiratında ve replikasyon çatalı çökmesinde aktif rol oynamakta, bunun yanı sıra *fanconi* anemi, tümör oluşumuna yatkınlık gibi çeşitli fenotiplerle ilişkilendirilmektedir (Nepomuceno ve ark., 2017 ve Park ve ark., 2014a). Bunun yanı sıra, 2010 yılında yapılan bir çalışma (Rantakari ve ark., 2010) homozigot olarak *PALB2* geni susturulmuş (*knockout*) farelerde erken embriyonik ölüm görüldüğünü, 2014 yılında yapılan bir çalışma ise (Simhadri ve ark., 2014) BRCA1-PALB2 etkileşimlerinin sekteye uğratılması sonucunda erkek farelerde mayoz bölünmede sorun yaşanması nedeniyle fertilitate problemleri oluştuğunu göstermiştir. Bipolar bozukluk ve şizofreni hastalıklarına ilişkin örnekleme yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmasında *PALB2* genine ait rs420259 kodlu TNP'nin bipolar bozukluk ile ilişkili bulunduğu bildirilmiştir (Tesli ve ark., 2010). DNA hasarında önemli rol oynadığı bilinen PALB2, hasarsız kromatin ile MRG15 sayesinde etkileşime geçmekte ve kararlı durumdaki kromomatine bağlanması sayesinde transkribe olmuş aktif genleri replikasyon stresinden korumaktadır (Bleuyard ve ark., 2017).

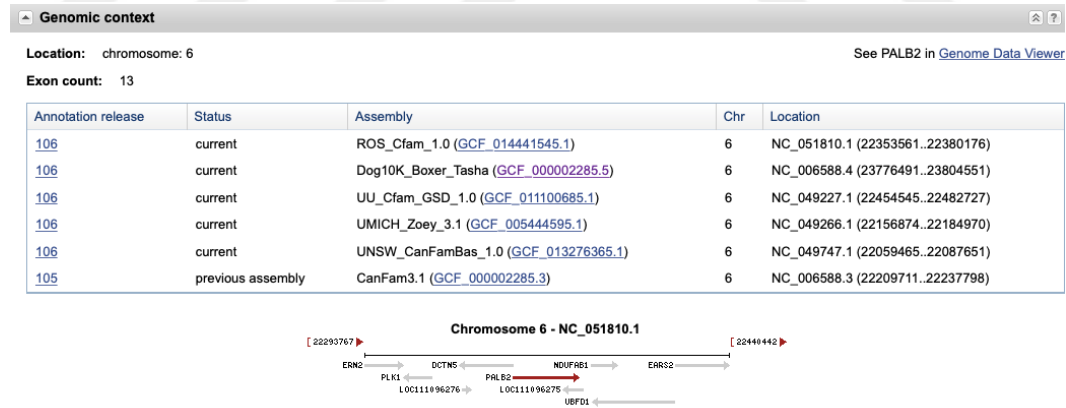
İnsan *PALB2* geni ilk kez Xia ve ark. (2006) tarafından tanımlanmış, 16'ncı kromozomun p kolunda (16p12.2) 13 ekzondan oluşan bir gendir ve 131 kDa

ağırlığında, 1186 amino asitlik (aa) bir protein üretiminden sorumludur (Nepomuceno ve ark., 2017; Park ve ark., 2014a ve Pauty ve ark., 2014). *NCBI* veri tabanında *FANCN* ve *PNCA3* olarak da bilinmekte, “*Gene ID: 79728*” ile kayıtlı; 16p12.2 bölgesinde komplement zincirde 23,603,162-23,641,337 pozisyonunda 14 ekzonluk bir gen olarak görülmektedir, ancak 14 ekzon görülmesinin nedeni X6 transkript varyantıdır; primer transkriptinde ise 13 ekzon olduğu görülmektedir (NCBI, 2021b). *Ensembl* veri tabanında ise ENSG00000083093 kodu ile kayıtlı bu gen yine 16. kromozomun komplementer zincirinde 23,603,160-23,641,310 pozisyonunda bulunmakta; primer transkriptinde (ENST00000261584.9) 13 ekzon olduğu görülmektedir (Ensembl, 2021j).

Biyoinformatik analizler insan PALB2 proteininin amino bölgesi, karboksil bölgesi ve merkezinde türler arasında yüksek oranda korunmuş bölgeler olduğunu göstermiştir (Sy ve ark., 2009a). PALB2 proteini yapısında iki adet DNA bağlanma bölgesi, iki adet RAD51 etkileşim bölgesi, *ChAM* domaini, bir adet *WD40* domaini ve kendisi ile etkileşime geçtiği bir bölge bulundurmaktadır (Buisson ve Masson, 2012). Amino bölgesinde BRCA1 proteini (1364-1437 aa) ile etkileşime geçtiği *coiled-coil* yapısı (9-42 aa) bulunmaktadır (Sy ve ark., 2009b). Bu yapı aynı zamanda PALB2 proteininin oligomerizasyonundan sorumludur (Buisson ve Masson, 2012 ve Sy ve ark., 2009c). Amino bölgesinde 88-94 amino asitleri arasında KEAP1 proteini ile etkileşime geçtiği bir *ETGE* motifi bulunmaktadır (Ma ve ark., 2012). İki DNA bağlanma bölgesinden ilki 146-149 rezidüleri arasında bulunmaktadır; bu bölge iplikçik değişimi için RAD51'i uyarmakla birlikte, RAD51 yokluğunda iplikçik değişimini yönetme ve DNA ve RNA substratlarını kullanarak ters iplikçik değişimini uyarmaktadır (Deveryshetty ve ark., 2019). Amino bölgesindeki ilk 200 amino asitlik bölüm RAD51 proteininin 184-257 amino asitleri arasındaki bölge ile etkileşime geçtiği bölgelerden birisidir (Buisson ve ark., 2010). 611 ve 764 amino asitleri arasındaki merkezi bölgede kromatinin yapısının regülasyonundan sorumlu MRG15 ve MRGX proteinlerinin etkileşim bölgesi bulunmaktadır (Sy ve ark., 2009a). Bleuyard ve ark. (2017), MRG15 bağlanma bölgesinin 611-629 ve 724-737 amino asitleri arasında olduğunu bildirmişlerdir. Yedi yapraklı pervane (*seven bladed propeller*) yapısına sahip *WD40* domaininin bulunduğu karboksil ucu (Xia ve ark.,

2006 ve Zhang ve ark., 2009a) 1010-1109 rezidüleri arasında bulunan (Ducy ve ark., 2019 ve Pauty ve ark., 2014) dördüncü ve beşinci yapraklar aracılığıyla BRCA2 proteininin 21-39 rezidüleri ile etkileşime geçmektedir (Oliver ve ark., 2009). 853-1186 amino asitleri aralığı ise RAD51 proteini ile esas etkileşimde bulunduğu ikinci bölgedir (Buisson ve ark., 2010). Bu bölge aynı zamanda RAD51 paraloğu olan RAD51C ve XRCC3 ile (Park ve ark., 2014b) ve Polh ile de etkileşime geçmektedir (Buisson ve ark., 2014). *WD40* domaininin 925-948 amino asitleri arasında proteinin doğru şekilde lokalizasyonunun sağlanması için CRM1 ile etkileşime geçen nükleer çıkış sinyali (*Nuclear export signal*) olduğu tespit edilmiştir (Pauty ve ark., 2017).

Köpeklerde ise *NCBI* veri tabanında köpek *PALB2* geni “*Gene ID: 608527*” kodlu gendir. Bu gen köpek genomunun 6. kromozomunda pozitif iplikçikte bulunmakta ve 13 ekzondan oluşmaktadır. Genomik pozisyona ilişkin veriler Şekil 1.2’de görüldüğü gibi beş farklı güncel sekans verisinden elde edilebilmektedir. Sekanslanan bireylere ait genomik pozisyonlarda bazı farklılıklar görülebilmektedir (NCBI, 2021a).



Şekil 1.2. *NCBI* veri tabanında köpek *PALB2* genine ilişkin genomik pozisyon bilgileri. (NCBI, 2021a).

RefSeq transkriptleri kontrol edildiğinde ise Şekil 1.3’te görüldüğü gibi bu gene ait beş farklı transkript bildirildiği görülmüştür (NCBI, 2021a): XM_038540031.1, XM_038604106.1, XM_038478784.1 kayıtlarının genom anotasyonu işlemleri sırasında kaldırıldığı; yalnızca XM_845578.6 ve XM_038668831.1 mRNA’larının aktif olduğu görülmektedir. Aktif olan iki mRNA dizisinde (XM_845578.6 ve

XM_038668831.1) nükleotit sayıları sırasıyla 3395 ve 4023 olmalarına karşın her iki dizi 1195 amino asit uzunluğundaki “*Partner and Localizer of BRCA2*” proteinini kodlamaktadır. Bu proteinler sırasıyla XP_850671.2 ve XP_038524759.1 protein kodlarına sahip ürünlerdir. Her iki transkripte ait CDS bölgeleri 153-3740 nükleotitleri aralığında olup bu aralıktaki nükleotit dizileri birebir örtüşmektedir (NCBI, 2021a).

PALB2 Transcripts BETA

PALB2 — partner and localizer of BRCA2 (*Canis lupus familiaris*)

5 transcripts

← SWITCH TO GENE VIEW

EDIT

DOWNLOAD

SELECT COLUMNS

☐	Gene ID	Symbol	Transcript	Length (nt)	Protein	Length (aa)	Protein name	Isoform	Organism
☐	608527	PALB2	XM_845578.6	3995	XP_850671.2	1195	partner and localizer of BRCA2		Canis lupus familiaris
☐	608527	PALB2	XM_038540031.1	3995	XP_038395959.1	1195	partner and localizer of BRCA2		Canis lupus familiaris
☐	608527	PALB2	XM_038604106.1	3995	XP_038460034.1	1195	partner and localizer of BRCA2		Canis lupus familiaris
☐	608527	PALB2	XM_038478784.1	4023	XP_038334712.1	1195	partner and localizer of BRCA2		Canis lupus familiaris
☐	608527	PALB2	XM_038668831.1	4023	XP_038524759.1	1195	partner and localizer of BRCA2		Canis lupus familiaris

Şekil 1.3. NCBI veri tabanındaki köpek *PALB2* genine ait transkriptler (NCBI, 2021a).

Ensembl veri tabanında Şekil 1.4’te görüldüğü gibi köpek *PALB2* genine ait üç farklı kayıt bulunmakta, bu kayıtlardan biri referans genomu ait olup, diğerleri *Basenji* ve *Great dane* ırklarına ait tüm genom sekanslarına aittir (Ensembl, 2021f).

[PALB2 \(Dog Gene, Breed: reference\)](#)

ENSCAFG00000030772 6:22209384-22237745:1

Partner and localizer of BRCA2 [Source:VGNC Symbol;Acc:VGNC:44245]

PALB2-201 (VGNC transcript name record; description: partner and localizer of BRCA2,) is an external reference matched to Transcript ENSCAFT00000049192

[Variant table](#) • [Phenotypes](#) • [Location](#) • [External Refs.](#) • [Regulation](#) • [Orthologues](#) • [Gene tree](#)

[novel gene \(Dog Gene, Breed: basenji\)](#)

ENSCAFG00030020559 6:55528757-5557259:-1

Partner and localizer of BRCA2 [Source:NCBI gene;Acc:608527]

PALB2 (NCBI gene (formerly Entrezgene) record; description: partner and localizer of BRCA2,) is an external reference matched to Gene ENSCAFG00030020559

[Variant table](#) • [Phenotypes](#) • [Location](#) • [External Refs.](#) • [Regulation](#) • [Gene tree](#)

[novel gene \(Dog Gene, Breed: great dane\)](#)

ENSCAFG00040003287 6:22156546-22184915:1

Partner and localizer of BRCA2 [Source:NCBI gene;Acc:608527]

PALB2 (NCBI gene (formerly Entrezgene) record; description: partner and localizer of BRCA2,) is an external reference matched to Gene ENSCAFG00040003287

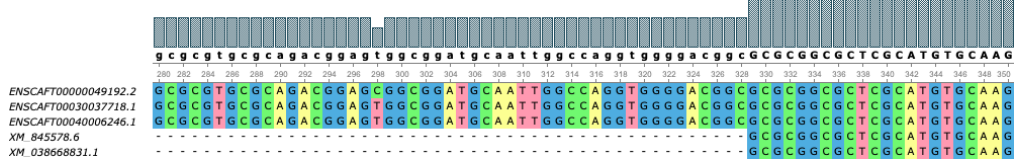
[Variant table](#) • [Phenotypes](#) • [Location](#) • [External Refs.](#) • [Regulation](#) • [Gene tree](#)

Şekil 1.4. *Ensembl* veri tabanında *PALB2* genine ilişkin kayıtlar (Ensembl, 2021f).

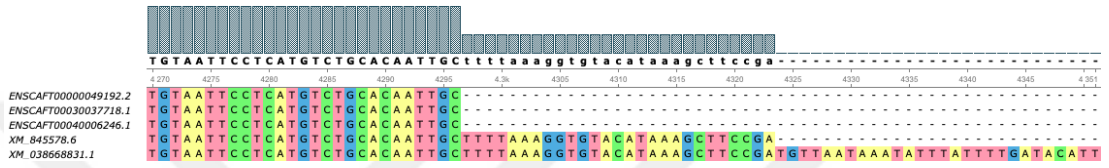
Tez önerisinin verildiği dönemde yalnızca referans genomla ilişkin veriler bulunmaktaydı; 2020 yılı Ocak ayından itibaren ise *Basenji* ve *Great dane* ırklarına ait genomlar da veri tabanına eklenmiş bulunmaktadır. Referans genomla ait ENSCAFG00000030772 kodlu genin ENSCAFT00000049192.2 kodlu tek bir transkripti bulunmaktadır. 4296 nükleotit uzunluğundaki bu transkriptten 1355 amino asitlik bir protein sentezlenmektedir (Ensembl, 2021i). *Basenji* ırkına ait ENSCAFG00030020559 kodlu genin ENSCAFT00030037718.1 kodlu tek bir transkripti bulunmaktadır. Referans genomda olduğu gibi bu transkriptin de 4296 baz çifti uzunluğunda olduğu ve 1355 amino asitlik bir protein sentezlediği görülmektedir (Ensembl, 2021g). *Great dane* ırkına ait genomda ise ENSCAFG00040003287 kodlu *PALB2* genine ait üç farklı transkript olduğu görülmektedir. ENSCAFT00040006246.1 kodlu transkript referans genom ve *Basenji* ırkına ait genomdaki gibi genin 13 ekzonunu da içeren, 4296 nükleotitlik bir diziye ve 1355 amino asitlik bir protein ürününe sahiptir. ENSCAFT00040006272.1 transkriptinde genin yedinci ekzonu bulunmamakta ve bu transkript 4134 nükleotit uzunluğunda olup, 1301 amino asitlik bir protein ürünü sentezlemektedir. ENSCAFT00040006296.1 transkriptinde ise genin bir, dokuz ve onuncu ekzonları bulunmamakta, 3507 nükleotit uzunluğundaki bu transkript 1092 amino asit uzunluğundaki bir protein ürünü sentezlemektedir (Ensembl, 2021h).

NCBI ve *Ensembl* veri tabanlarında farklı *PALB2* transkriptleri olduğu görülmektedir. Her iki veri tabanındaki primer transkriptler karşılaştırıldığında başlangıç ve bitiş pozisyonları ve bazı tekli nükleotit varyantları haricinde dizilerin örtüştüğü görülmüştür. Şekil 1.5'te *NCBI* ve *Ensembl* veri tabanlarında sunulan referans transkriptlerin başlangıç noktalarındaki farklılık gösterilmektedir. *NCBI* veri tabanındaki diziler *Ensembl* veri tabanındaki dizilerin 329'uncu nükleotidinden itibaren başlamaktadır. Bitiş noktaları karşılaştırılığında ise Şekil 1.6'da *Ensembl* veri tabanında kayıtlı üç transkript 4296. pozisyonda sonlanırken; XM_845578.6 dizisi 4323. pozisyonda (hizalamadaki cetvele göre), XM_038668831.1 dizisi ise 4951. pozisyonda (hizalamadaki cetvele göre) sonlanmaktadır. Tez çalışmasında referans dizi olarak primer tasarımının da yapıldığı *Ensembl* veri tabanındaki

ENSCAFT00000030772 kodlu gen ve ENSCAFT00000049192.2 kodlu transkript kullanılmıştır.



Şekil 1.5. Ugene programında ClustalW ile hizalanmış primer transkriptlere ait bir görsel. 280-350 nt aralığı.



Şekil 1.6. Ugene programında ClustalW ile hizalanmış primer transkriptlere ait bir görsel. 4270-4351 nt aralığı.

Uniprot protein veri tabanında köpek (*Canis familiaris*) türüne ait iki adet PALB2 protein dizisi bulunmaktadır. Bu dizilerden biri J9NVL4 kodlu 1355 amino asit uzunluğunda; diğeri ise A0A5S9I5Z8 kodlu 1195 amino asit uzunluğundaki proteindir. Tez önerisi ve proje yazım aşamasında bu proteinlerden yalnızca J9NVL4 kodlu protein dizisi veri tabanında bulunmaktaydı (The Uniprot Consortium, 2021c).

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism	Length
Q95153	BRCA1_CANLF	Breast cancer type 1 susceptibility...	BRCA1	Canis lupus familiaris (Dog) (Canis familiaris)	1,878
Q8MKI8	RAD51_CANLF	DNA repair protein RAD51 homolog 1	RAD51	Canis lupus familiaris (Dog) (Canis familiaris)	339
J9NVL4	J9NVL4_CANLF	Partner and localizer of BRCA2	PALB2	Canis lupus familiaris (Dog) (Canis familiaris)	1,355
A0A5F4CQK7	A0A5F4CQK7_CANLF	Breast cancer type 1 susceptibility...	BRCA1	Canis lupus familiaris (Dog) (Canis familiaris)	1,878
F1PAI7	F1PAI7_CANLF	Breast cancer type 1 susceptibility...	BRCA1	Canis lupus familiaris (Dog) (Canis familiaris)	1,756
J9NXD4	J9NXD4_CANLF	Breast cancer type 1 susceptibility...	BRCA1	Canis lupus familiaris (Dog) (Canis familiaris)	1,772
A0A5F4CPK1	A0A5F4CPK1_CANLF	Breast cancer type 1 susceptibility...	BRCA1	Canis lupus familiaris (Dog) (Canis familiaris)	1,764
A0A5F4D6C9	A0A5F4D6C9_CANLF	Breast cancer type 1 susceptibility...	BRCA1	Canis lupus familiaris (Dog) (Canis familiaris)	712
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	Partner and localizer of BRCA2	PALB2	Canis lupus familiaris (Dog) (Canis familiaris)	1,195
A0A2S1CND5	A0A2S1CND5_CANLF	RAD51 protein	RAD51	Canis lupus familiaris (Dog) (Canis familiaris)	83
A0A2S1CNC5	A0A2S1CNC5_CANLF	RAD51 protein	RAD51	Canis lupus familiaris (Dog) (Canis familiaris)	37

Şekil 1.7. Uniprot veri tabanında köpek PALB2 proteinlerine ilişkin arama sonuçları (The Uniprot Consortium, 2021c).

Her iki proteine ait amino asit dizileri karşılaştırıldığında J9NVL4 proteinine ait ilk 160 amino asitlik bölge haricindeki tüm dizinin birebir örtüştüğü Şekil 1.8’de görülmektedir.

J9NVL4 kodlu proteine bakıldığında *Ensembl* veri tabanından ENSCAFP00000037206 kodlu protein olduğu görülmektedir. Bu protein referans genoma ait ENSCAFG00000030772 kodlu gen ve ENSCAFT00000049192 kodlu transkript ile bağlantılıdır (The Uniprot Consortium, 2019). A0A5S9I5Z8 kodlu proteinin ise BBK93983 kodu ile GenBank’ta kayıtlı olduğu görülmektedir. Bu kayıt *NCBI* veri tabanındaki XM_038668831.1; XM_845578.4 mRNA’ları ve XP_038524759.1; XP_850671.2 protein dizileri ile ilişkilidir (The Uniprot Consortium, 2021d).

J9NVL4	J9NVL4 CANLF	1	MGTSASGRGGQMRARAPSRCTRTCKKAARPTFWPPTLFRSSRSQGCACQPVSRGWADGYF	60
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	1	-----	0
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	61	RPLLHFRSRRPPRSSAARPSARRPRSITRPSRAARAQTERRMQLARWGRRAALACASWWR	120
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	1	-----	0
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	121	AGGAPRPLFGRPRPAQGRPRPLPASPGFGVGDGCSFRSAAGP	180
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	1	-----	20
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	181	LAFLKREYSKTLARLQRAQRAEKFKNSIKKTAEEHDCLLQDQTLPLQNHSESKNKVSPCD	240
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	21	LAFLKREYSKTLARLQRAQRAEKFKNSIKKTAEEHDCLLQDQTLPLQNHSESKNKVSPCD	80
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	241	TLQISTHLDEETGEKTFVPTFDIEPESFNPEHGSVELLHIQRTGDIQEHFPYVWGPGVEX	300
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	81	TLQISTHLDEETGEKTFVPTFDIEPESFNPEHGSVELLHIQRTGDIQEHFPYVWGPGVEX	140
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	301	QSKLPGRRKKQCKRTFTSQARDSLFDTSLLISGKRLKEQEEENNGENPRTPITKRTYLS	360
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	141	QSKLPGRRKKQCKRTFTSQARDSLFDTSLLISGKRLKEQEEENNGENPRTPITKRTYLS	200
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	361	SSMSDIPGSPSPVMEINVRGILIPPTAKPQRDQDALVRGNPFPMVPTLASFTLSNSSSSH	420
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	201	SSMSDIPGSPSPVMEINVRGILIPPTAKPQRDQDALVRGNPFPMVPTLASFTLSNSSSSH	260
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	421	HLHKPPKDDWELITHSLKNINPASFVNLEAQVKKITVSKDNFGISASGQLPQSPDLEPD	480
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	261	HLHKPPKDDWELITHSLKNINPASFVNLEAQVKKITVSKDNFGISASGQLPQSPDLEPD	320
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	481	NSCSPDKLIYDNLSADGNQNLKGQNHTEESLKFPHNTLDGRNESLQNEVLSQSKLSPE	540
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	321	NSCSPDKLIYDNLSADGNQNLKGQNHTEESLKFPHNTLDGRNESLQNEVLSQSKLSPE	380
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	541	VISPASTENQTYSTCVLEGLLPFAEYVVRTTRMSNCCQKVALEAVIQSHLVGRKKEFKN	600
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	381	VISPASTENQTYSTCVLEGLLPFAEYVVRTTRMSNCCQKVALEAVIQSHLVGRKKEFKN	440
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	601	KSKDATKNLNLCSSEETDQSEIRTSCTCTKQSSRRRSQKHLSTLTVHSPTGPTEDNLPKKA	660
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	441	KSKDATKNLNLCSSEETDQSEIRTSCTCTKQSSRRRSQKHLSTLTVHSPTGPTEDNLPKKA	500
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	661	VTQPSGGRHRRKRSICPPVLDHHELLPTFSTSGVNRSKKEITLHKDQNEKVIIQGGKD	720
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	501	VTQPSGGRHRRKRSICPPVLDHHELLPTFSTSGVNRSKKEITLHKDQNEKVIIQGGKD	560
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	721	HCQKEDSLSRKNGYIALDSAVFKASPHENEMLSLKQLSSFLKTTDFQLPDEIFGFLKLE	780
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	561	HCQKEDSLSRKNGYIALDSAVFKASPHENEMLSLKQLSSFLKTTDFQLPDEIFGFLKLE	620
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	781	KLKSYSEKTVFPIVSKMYAQKHLKEGNCIVLEELTPTQIDTEMKDLEELIIVLPEKAQFK	840
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	621	KLKSYSEKTVFPIVSKMYAQKHLKEGNCIVLEELTPTQIDTEMKDLEELIIVLPEKAQFK	680
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	841	MPSLTSRSQKKGLSSSILLPTPLNTSAPENSNRPTADMCSPTFPI LGTTTAPFGSQALSEK	900
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	681	MPSLTSRSQKKGLSSSILLPTPLNTSAPENSNRPTADMCSPTFPI LGTTTAPFGSQALSEK	740
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	901	VCTETVRPTCSTPQLPHLKSDHVLASAAHTLKDSQKQLDNWNTNLSKPGGTLVVSGRDG	960
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	741	VCTETVRPTCSTPQLPHLKSDHVLASAAHTLKDSQKQLDNWNTNLSKPGGTLVVSGRDG	800
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	961	QPSDCDCSGPQATPLPTESVFPKDNQLCGNFQPESSWKQSTEQEQSASLTEVAELPACQSS	1020
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	801	QPSDCDCSGPQATPLPTESVFPKDNQLCGNFQPESSWKQSTEQEQSASLTEVAELPACQSS	860
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	1021	NPGHLQVLVSKLKNFSGSCSVDSAMMWEIAGFKPCIIITACEYVVSIMKPIINTLQWEKLY	1080
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	861	NPGHLQVLVSKLKNFSGSCSVDSAMMWEIAGFKPCIIITACEYVVSIMKPIINTLQWEKLY	920
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	1081	BWHFTEVFLQIVFVFDVNCNLVCVALGNLEIREIRSLLCSSDGGKREKQVLLSSGNIAVL	1140
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	921	BWHFTEVFLQIVFVFDVNCNLVCVALGNLEIREIRSLLCSSDGGKREKQVLLSSGNIAVL	980
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	1141	GLTGRRLVSSSGTLCQQQVEIMTFAEDGRSKEKQFLMPPEETVLTFAEVQGMQEAALLGTI	1200
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	981	GLTGRRLVSSSGTLCQQQVEIMTFAEDGRSKEKQFLMPPEETVLTFAEVQGMQEAALLGTI	1040
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	1201	IMNNIVIMNLKTGQLLKKMHIGDRYQASVCRKAYSEMGLLFVVLSHPCAKESSELLGSPVF	1260
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	1041	IMNNIVIMNLKTGQLLKKMHIGDRYQASVCRKAYSEMGLLFVVLSHPCAKESSELLGSPVF	1100
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	1261	QLIVINPKTTLSVGVMLYCLPQGGAGRFLEGDVKDHFAAAVLTSGTIAIWDLGLGHCTAL	1320
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	1101	QLIVINPKTTLSVGVMLYCLPQGGAGRFLEGDVKDHFAAAVLTSGTIAIWDLGLGHCTAL	1160
J9NVL4	J9NVL4 CANLF	1321	LPFISDQHWSIVKNSGTCDSHLLAGCKDGNIPVYRY	1355
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	1161	LPFISDQHWSIVKNSGTCDSHLLAGCKDGNIPVYRY	1195

Şekil 1.8. J9NVL4 ve A0A5S9I5Z8 kodlu PALB2 proteinlerinin karşılaştırılması (The Uniprot Consortium, 2021e).

Şekil 1.9’da *Uniprot* veri tabanındaki her iki köpek PALB2 proteinine ait *WD40* domaininin pozisyonu görülmektedir. J9NVL4 kodlu proteinde domain 1018-1354; A0A5S9I5Z8 kodlu proteinde ise 858-1194 rezidülerini kapsamaktadır (The Uniprot Consortium, 2021e).

J9NVL4	J9NVL4_CANLF	961	QPSDCDCSGPQATPLPTESVPFKDNQLCGNPQESWKQSTEQEQSASLTEVAELPACQSS	1020
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	801	QPSDCDCSGPQATPLPTESVPFKDNQLCGNPQESWKQSTEQEQSASLTEVAELPACQSS	860
J9NVL4	J9NVL4_CANLF	1021	NPGHLQLVSKLKNPSGSCSVDSAMWWEIAGFKEPCIITACEYVVSLLWKPLNTLQWEKLY	1080
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	861	NPGHLQLVSKLKNPSGSCSVDSAMWWEIAGFKEPCIITACEYVVSLLWKPLNTLQWEKLY	920
J9NVL4	J9NVL4_CANLF	1081	SWHFEVPVLQIVPVPDVCNLVCVALGNLEIREIRSLCSDSGKREKQVLLSSGNIKAVL	1140
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	921	SWHFEVPVLQIVPVPDVCNLVCVALGNLEIREIRSLCSDSGKREKQVLLSSGNIKAVL	980
J9NVL4	J9NVL4_CANLF	1141	GLTGRRLLVSSSGTLCDDQVEIMTFAEDGRSKEKQFLMPPEETVLTFAEVQGMQEALLGTT	1200
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	981	GLTGRRLLVSSSGTLCDDQVEIMTFAEDGRSKEKQFLMPPEETVLTFAEVQGMQEALLGTT	1040
J9NVL4	J9NVL4_CANLF	1201	IMNNIWIWNLKTGQLLKKMHIGDRYQASVCRKAYSEMGLLFVVLSHPCAKESELLGSPVF	1260
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	1041	IMNNIWIWNLKTGQLLKKMHIGDRYQASVCRKAYSEMGLLFVVLSHPCAKESELLGSPVF	1100
J9NVL4	J9NVL4_CANLF	1261	QLIVINPKTTLVSGVMLYCLPQGGAGRFLEGDVKDHFAAAVLTSGTIAIWDLLGHCTAL	1320
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	1101	QLIVINPKTTLVSGVMLYCLPQGGAGRFLEGDVKDHFAAAVLTSGTIAIWDLLGHCTAL	1160
J9NVL4	J9NVL4_CANLF	1321	LPPISDQHWSEFVKWSGTDSHLLAGQKDGNIIFYRY	1355
A0A5S9I5Z8	A0A5S9I5Z8_CANLF	1161	LPPISDQHWSEFVKWSGTDSHLLAGQKDGNIIFYRY	1195

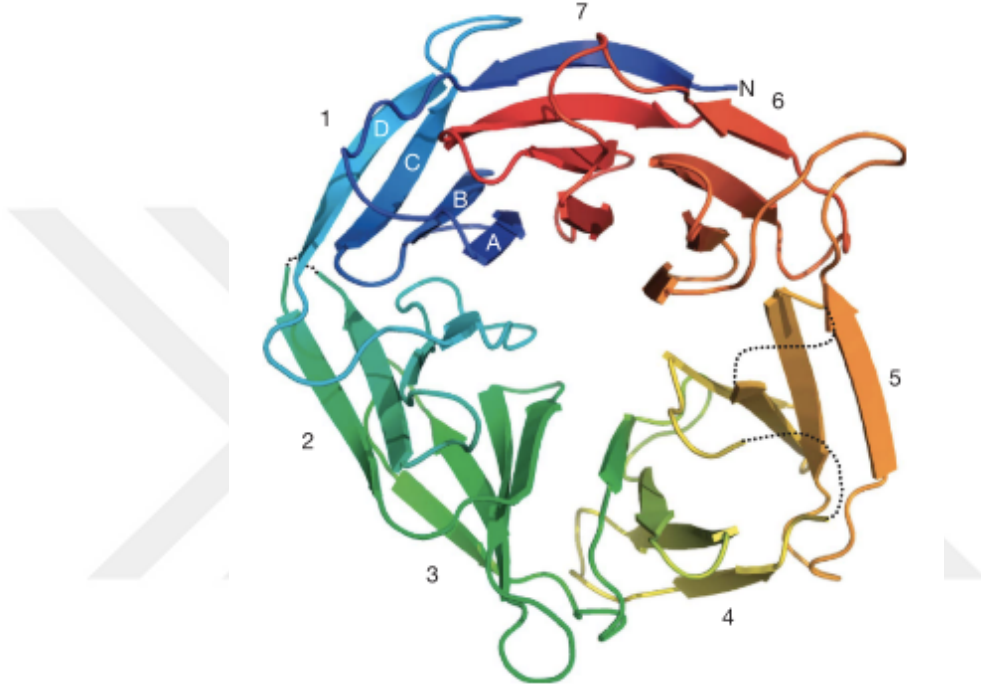
Şekil 1.9. Köpek türüne ait PALB2 proteinlerinde *WD40* domaini bölgeleri (The Uniprot Consortium, 2021e).
WD40 domaini sarı renk ile işaretlidir.

1.6.2.1. *PALB2* Geni *WD40* Domaini ve İşlevleri

WD40 domainleri ökaryot organizmalarda sinyal üretimi, hücre bölünmesi, hücre iskeletindeki değişiklikler, kemotaksis ve RNA işlenmesi gibi çeşitli fonksiyonlarda görev almaktadır (Stirnimann ve ark., 2010). Protein-protein etkileşimleri, ubikuitinasyon ve histon metilasyonu gibi çeşitli görevlerde de etkinlik gösteren (Xu ve Min, 2011) bu domain, PALB2 proteininde protein-protein etkileşimlerini sağlamakla görevlidir (Pauty ve ark., 2014).

WD40 β -pervane yapıları yaklaşık 300 amino asitten oluşan ve üç farklı yüzeyi ile protein-protein etkileşimlerini gerçekleştiren yapılardır (Stirnimann ve ark., 2010). Amino bölgesinin 11-24 rezidülerinde GH dipeptidi, karboksil bölgelerinde ise *WD40* dipeptidi içeren yaklaşık 44-60 rezidüden oluşan bu domainler her bir *WD40* tekrarında dört zincirli antiparalel β -yapraktan oluşmaktadır. *WD40* domainlerinin

çoğunlukla yedi yapraklı β -pervane yapısında oldukları bildirilmiştir (Xu ve Min, 2011). Protein-protein ve protein-peptit etkileşimlerinin çoğuna β -pervane yapılarının merkezindeki kanallar dahil olmaktadır (Stirnemann ve ark., 2010). PALB2 proteinine ait *WD40* yedi yapraklı β -pervane domaini yapısı Şekil 1.10'da görüldüğü gibidir (Oliver ve ark., 2009).



Şekil 1.10. *PALB2* geni *WD40* domaini yapısı (Oliver ve ark., 2009).

İnsan PALB2 proteinine ait WD tekrarlarına ait amino asit pozisyonları *UniProt* veri tabanı, Q86YC2 kodlu proteinde Şekil 1.11'deki gibi görünmektedir (The Uniprot Consortium, 2021g). Köpekte ise J9NVL4 kodlu proteinde WD tekrarlarına ilişkin herhangi bir bilgi bulunmamakta ancak domaine ait başlangıç ve bitiş pozisyonlarının bulunduğu Şekil 1.12'de görülmektedir (The Uniprot Consortium, 2021f).

Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
854 – 915	WD 1	Add BLAST		62
917 – 961	WD 2	Add BLAST		45
962 – 1009	WD 3	Add BLAST		48
1010 – 1052	WD 4	Add BLAST		43
1058 – 1109	WD 5	Add BLAST		52
1115 – 1153	WD 6	Add BLAST		39
1155 – 1186	WD 7	Add BLAST		32

Şekil 1.11. İnsan PALB2 proteini WD tekrarlarının amino asit pozisyonları (The Uniprot Consortium, 2021g).

Position(s)	Description	Actions	Graphical view	Length
1018 – 1354	PALB2_WD40 InterPro annotation	Add BLAST		337

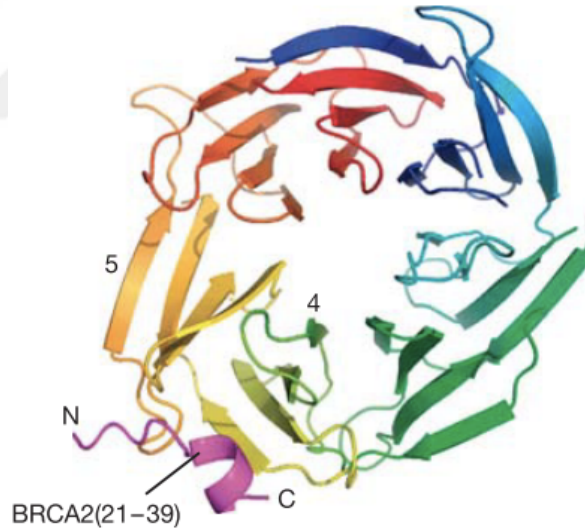
Şekil 1.12. Köpek PALB2 proteini *WD40* domaini amino asit pozisyonları (The Uniprot Consortium, 2021f).

İnsanda 853-1186 rezidüleri (Pauty ve ark., 2017), köpekte ise J9NVL4 kodlu proteinde 1018-1354 rezidüleri arasında bulunan (The Uniprot Consortium, 2021e) *WD40* domaini insanda BRCA2 (Oliver ve ark., 2009), RAD51 (Buisson ve ark., 2010), RAD51C, XRCC3 (Park ve ark., 2014b) ve Polh ile etkileşime geçmektedir (Buisson ve ark., 2014). Köpeklerde ise veri tabanlarında protein etkileşimlerine ilişkin bilgi verilmesine karşın domainin etkileşim halinde olduğu proteinlere ait veri bulunmamaktadır. *STRING* veri tabanında RAD51, BRCA1, BRCA2, BRIP1 ve RAD51C proteinleri ile etkileşim halinde görülen PALB2 (STRING CONSORTIUM 2020, 2020); muhtemeldir ki *WD40* domaini aracılığıyla insan ile benzer şekilde BRCA2, RAD51 ve RAD51C proteinleri ile etkileşime geçmektedir.

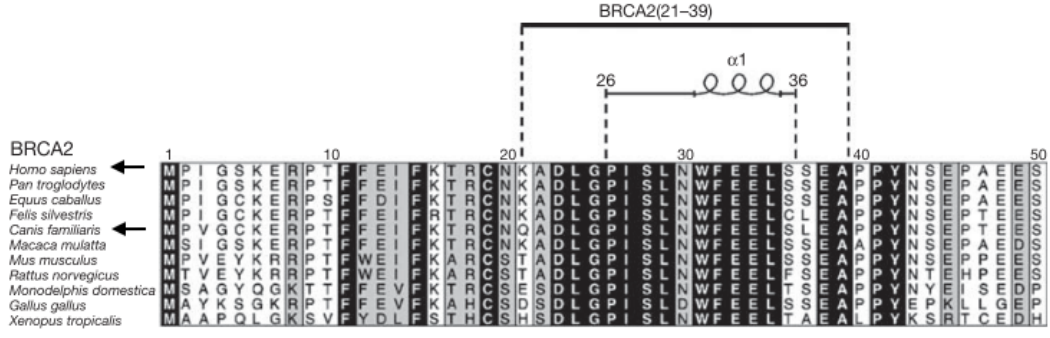
1.6.2.2. PALB2 ve BRCA2 Proteinleri Arasındaki Etkileşim

Xia ve ark. (2006), tarafından insan PALB2 proteininin karboksil ucu vasıtasıyla BRCA2 ile etkileşim halinde olduğu bildirilmiş; Zhang ve ark. (2009a; 2009b), ise bu etkileşim bölgesinin *WD40* domaini olduğunu belirtmişlerdir. Oliver ve ark. (2009), PALB2-BRCA2 kompleksinin yapısını ortaya çıkarmış ve etkileşim bölgelerinin pozisyonlarını bildirmişlerdir. BRCA2 proteininin 21-39 amino asitleri arasındaki

bölge, PALB2 proteininin *WD40* domaininin dördüncü ve beşinci yapraklarının arasında kalan oluk ile etkileşime geçmekte (Oliver ve ark., 2009); bu WD tekrarlarının bulunduğu bölge ise 1010-1109 amino asitleri arasındaki bölgeye denk gelmektedir (Ducy ve ark., 2019 ve The Uniprot Consortium, 2021g). Şekil 1.13 BRCA2-PALB2 kompleksini göstermekte; Şekil 1.14 ise BRCA2 proteinine ait etkileşim bölgesinin farklı türler arasındaki amino asit dizilerinin karşılaştırılmasını göstermektedir (Oliver ve ark., 2009). Köpek PALB2 proteinine ait dördüncü ve beşinci yaprakların pozisyonları veri tabanında bildirilmediği için *UniProt* veri tabanında insan PALB2 proteinine ait Q86YC2 ve köpek PALB2 proteinine ait J9NVL4 kayıtlarına ilişkin diziler hizalanmış ve insandaki etkileşim bölgesi ile köpek dizisindeki olası etkileşim bölgesi tespit edilmeye çalışılmıştır. Köpek dizisinde ilgili etkileşim bölgesi Şekil 1.15'teki gibi 1180-1279 amino asitlerini kapsamaktadır (The Uniprot Consortium, 2021a). Üçüncü satırda aynı amino asit dizisine sahip bölgeler (*) ile işaretlidir.



Şekil 1.13. BRCA2-PALB2 kompleksinin yapısı (Oliver ve ark., 2009).



Şekil 1.14. BRCA2 etkileşim bölgesinin farklı türlerde amino asit dizileri (Oliver ve ark., 2009).

Yukarıdaki siyah okla işaretli dizi insan, aşağıdaki siyah okla işaretli dizi ise köpek türüne ait diziyi göstermektedir.

Q86YC2	PALB2	HUMAN	962	KSGNIKAVLGLTKRRLVSSSGTLS	DOQVEVMTFAEDGG	KENQFLMP	EETILTFAEVOG	1021
J9NVL4	J9NVL4	CANLF	1132	SSGNKAVLGLTKRRLVSSSGTLC	DOQVEIMTFAEDGR	SKEQFLMP	EETVLTFAEVOG	1191
				*****	*****	*****	*****	
Q86YC2	PALB2	HUMAN	1022	QOEALLGTTIMNNIVINNLKTGQLLKKMHI	DSYQASVCHKAYSEMGLLE	IVLSHPCAKE		1081
J9NVL4	J9NVL4	CANLF	1192	QOEALLGTTIMNNIVINNLKTGQLLKKMHI	DRYQASVCRKAYSEMGLLE	IVLSHPCAKE		1251
				*****	*****	*****	*****	
Q86YC2	PALB2	HUMAN	1082	SESIRSPVVFOLIVINPKTTLSVGVMLYC	FPQAGRFLEGDVKDHC	AAAILTSGTIAIWD		1141
J9NVL4	J9NVL4	CANLF	1252	SELGSPVVFOLIVINPKTTLSVGVMLYC	FPQAGRFLEGDVKDHC	AAAVLTSGTIAIWD		1311
				*****	*****	*****	*****	

Şekil 1.15. UniProt veri tabanında dördüncü ve beşinci WD tekrarı bölgelerinin insan ve köpek türlerindeki pozisyonları (The Uniprot Consortium, 2021a).

Kırmızı çerçeve içindeki bölgeler BRCA2 ile etkileşim bölgesini kapsayan WD4 ve WD5 dizilerini, * işaretleri birebir örtüşen amino asitleri, renkler ise koyu griden beyaza gidildikçe rezidüler arasındaki benzerliğin azaldığını göstermektedir.

1.6.2.3. PALB2 ve RAD51 Proteinleri Arasındaki Etkileşim

PALB2 proteininin RAD51 proteini ile etkileşime geçtiği iki farklı bölge bulunmaktadır. İnsanda amino bölgesindeki 1-200 aa arasındaki *coiled-coil* yapısı PALB2 proteini üzerindeki etkileşim bölgelerinden birisidir; ikinci ve HR mekanizmasında esas fonksiyonel olan etkileşim bölgesi ise 853-1186 pozisyonları arasında kalan *WD40* domainidir (Buisson ve ark., 2010). UniProt veri tabanında ilgili bölge insan ve köpek türleri arasında Şekil 1.16'daki gibi görünmektedir (The Uniprot Consortium, 2021a). İnsan dizisinde yeşil renk ile işaretli kısım 853 numaralı rezidü ile başlamakta ve bu bölge 1186'ncı amino asite kadar *WD40* domaini olarak bildirilmektedir ancak köpek türüne ait dizide *WD40* domaini veri tabanındaki araç ile işaretlendiğinde sarı renkle işaretli bölge olarak görülmektedir. İnsan RAD51 etkileşim bölgesinin başlangıç noktası baz alındığında köpekte bu bölge 1023'üncü

rezidüye denk gelmektedir ancak *WD40* domaini köpek türünde işaretlendiğinde başlangıç bölgesi 1018. rezidü olarak görülmektedir.

Q86YC2	PALB2_HUMAN	842	AELPASDSINP	GNLQLVSELKNPSGSCSVDSAMFWERAGCKEPCIIITACEDVVSILWKAL	901
J9NVL4	J9NVL4_CANLF	1012	AELPACQSSNPGHLQLVSKLKNPSGSCSVDSAMWWEIAGFKKEPCIIITACEYVVSILWKPL	1071	*****:.*:***:*****:

Şekil 1.16. PALB2 proteini *WD40* domaininin insan ve köpek türlerinde karşılaştırılması (The Uniprot Consortium, 2021a).

Köpek RAD51 proteinindeki etkileşim bölgesi ise 184-257 olarak tespit edilmiştir (Buisson ve ark., 2010). *UniProt* veri tabanında RAD51 proteini üstündeki PALB2 etkileşim bölgesi Şekil 1.17’de de görüldüğü üzere hem insan, hem de köpek türlerinde aynı pozisyonlara denk gelmektedir (Ozmen ve ark., 2017a ve The Uniprot Consortium, 2021b).

Q06609	RAD51_HUMAN	181	SGSDVLDNVAYARAFNTDHQTQLLYQASAMMVESRYALLIVDSATALYRTDYSGRGELSA	240
Q8MKI8	RAD51_CANLF	181	SGSDVLDNVAYARAFNTDHQTQLLYQASAMMVESRYALLIVDSATALYRTDYSGRGELSA	240
Q06609	RAD51_HUMAN	241	ROMHLARFLRMLRLADEFGVAVVITNQVVAQVDGAAMFAADPKKPIGGNIIAHASTTRL	300
Q8MKI8	RAD51_CANLF	241	ROMHLARFLRMLRLADEFGVAVVITNQVVAQVDGAAMFAADPKKPIGGNIIAHASTTRL	300

Şekil 1.17. RAD51 proteininin PALB2 ile etkileşim bölgesinin insan ve köpek türlerinde karşılaştırılması (The Uniprot Consortium, 2021d).

Kırmızı çerçeve içindeki bölgeler PALB2 proteini ile etkileşim bölgesini, * işaretleri birebir örtüşen amino asitleri, renkler ise koyu griden beyaza gidildikçe rezidüler arasındaki benzerliğin azaldığını göstermektedir.

1.6.2.4. Köpeklerde *PALB2* Genine İlişkin Yapılmış Çalışmalar

Köpek türünde *PALB2* genine ilişkin doğrudan yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır ancak HR mekanizmasında etkinlik gösteren genlere ilişkin yapılmış çalışmalar mevcuttur. *BRCA1*, *BRCA2* ve *RAD51* genleri HR

mekanizmasında aktif görev yapan ve köpeklerde çeşitli çalışmalarda araştırılmış genlerdir. Yapılan çalışmaların sonuçları incelendiğinde PALB2 proteini ile etkileşim bölgeleri nedeniyle ilişki kurulabilecek yalnızca iki çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan ilki Özmen ve ark. (2017b)'nın tez projesinin örnekleminin de içinden seçildiği KMT hastası bireylerde *RAD51* geninin BRCA2 ve PALB2 proteinleri ile etkileşime girdiği bölgeleri kapsayan ekzon 6-9 bölgelerinin DNA dizi analizi ile araştırılmasını kapsayan çalışmadır. Bu çalışma kapsamında p.N196D, p.H199D, p.A209S, p.T225S varyantları tespit edilmiş, *in silico* analizler sonucunda p.N196D, p.H199D ve p.T225S varyantlarının HR mekanizmasını etkileyebilecek zararlı varyantlar olabileceği bildirilmiştir. P.A209S, p.T225S varyantlarının etkisi Uemura ve ark. (2019), tarafından iki hibrit analizi ile araştırılmış; her iki varyantın da RAD51-PALB2 etkileşimini zayıflattığı bildirilmiştir.

1.6.2.5. İnsan Meme Tümöründe *PALB2* Genine İlişkin Yapılmış

Çalışmalar

Yapılan tez çalışması KMT vakalarında *PALB2* geni ve meme tümörü arasındaki ilişkinin araştırıldığı ilk çalışmadır, ancak insanlarda *PALB2* geni mutasyonları ve meme tümörü arasındaki ilişki yapılan birçok çalışmada ortaya konmuştur (Nepomuceno ve ark., 2021). Tez çalışması kapsamında KMT hastası örneklerde *PALB2* geni *WD40* domaininde mutasyon taranmasının yanı sıra, tespit edilen varyantların insanlarla homolog olup olmadığı ve homolog olması durumunda ise meme tümörüne ilişkin iki türde de benzer etkilere neden olup olmadığı da araştırma hedefleri arasında yer almaktadır. Elde edilen veriler ışığında köpeklerin diğer hayvan modellerine karşın tümör çalışmaları için daha uygun olduğu görüşü (Waters ve Wildasin, 2006) değerlendirilebilecektir. *PALB2* mutasyonları ile ilişkili KMT vakalarının insan meme tümörlerinde model olarak kullanımı ve *PALB2* mutasyonları ile ilişkili insan meme tümörlerinde kullanılan tedavi stratejilerinin köpeklerde kullanılma potansiyelinin değerlendirilebilmesi için, insan meme tümörü vakalarında yapılan *PALB2* genine ilişkin çalışmalar bu bölümde sunulmuştur.

İnsan BRCA2 proteininin %50'den fazlası PALB2 ile kompleks oluşturduğu ve PALB2'nin homolog rekombinasyon ve S fazı kontrol noktasında BRCA2 aktivitesini yönettiği bildirilmiştir (Xia ve ark., 2006). Homolog rekombinasyon sırasında BRCA2'nin çekirdekte uygun yerde konumlanabilmesi için PALB2 proteini ile etkileşime geçmesi gerektiği vurgulanmış, iki proteinin etkileşime geçtikleri PALB2 karboksil ucu yapısı ortaya konmuş ve bu bölge ile BRCA2 amino ucunu kodlamakla görevli bölgelerde meydana gelen mutasyonların kansere yakınlıkla ilişkili oldukları belirtilmiştir (Oliver ve ark., 2009). PALB2 proteininin BRCA1 ile de etkileşime geçtiği, BRCA1'in PALB2 üzerinden BRCA2 ile ilişki kurduğu ve PALB2 ile BRCA2'nin DNA hasarı olan bölgeyi hedeflemeleri için BRCA1 ile ilişki kurmaları gerektiği ortaya konulmuştur (Zhang ve ark., 2009b). Bowman-Colin ve ark. (2013), insanlarda germ hattı kaynaklı *PALB2* mutasyonlarının ailesel meme ve pankreas kanserlerine yakınlıkla ilişkili olduğunu bildirmiş ve farede *Palb2* ve *Trp53*'ün birlikte delesyon gösterdikleri vakalarda meme tümörü oluşumunun hızlandığını deneysel olarak göstermişlerdir. Buisson ve ark. (2014), *PALB2* ve *BRCA2* genlerinin homolog rekombinasyonda D-loop formasyonu oluşumundaki fonksiyonlarının yanı sıra, Polh-bağımlı DNA sentezini uyararak bloke olmuş replikasyon çatallarında rekombinasyon aracılı DNA sentezini başlattıklarını göstermişlerdir. Obermeier ve ark. (2016), *PALB2* c.1592delT mutasyonuna sahip lenfoblastoit hücre hattı ve kontrol grubunda mutasyona sahip hücre hatlarında çift zincir kırıklarında HR mekanizması yerine tek zincir bağlanması ve mikrohomojoloji aracılı uç birleştirme mekanizmalarında artış görüldüğünü bildirmiş, hataya açık bu tamir mekanizmalarının tümör gelişimini tetikleyebileceği üzerinde durulmuştur. Caleca ve ark. (2018), *BRCA2* ve *PALB2* genleri etkileşim bölgelerinde tespit edilmiş olan iki mutasyonun (*BRCA2*; c.91T >G ve *PALB2*; c.3262C >T) etkilerini fonksiyonel test ile araştırmış, test edilen mutasyonların bu iki proteinin birbirine bağlanmasına engel olduğu tespit edilmiştir. Boonen ve ark. (2020), *PALB2* geninde tespit edilen etkisi bilinmeyen mutasyonların fonksiyonel etkilerine ilişkin yapılan çalışmaları bir araya getirmişlerdir. *WD40* domainine odaklanıldığında bu mutasyonlardan bazılarının protein ifadesinde düşüşe neden olduğu, bazılarının diğer proteinler ile etkileşimi sekteye uğrattığı, bir kısmının proteinin sitoplazmada yanlış bölgede konumlanmasına neden olduğu, bazılarının ise proteinin sitoplazmada degradasyonuna neden olan bir

sinial meydana getirmiş olabileceği bildirilmiştir. Çalışmada yapılan fonksiyonel analizlere ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunduğu ve farklı yöntemler kullanılarak yapılan bu çalışmaların karşılaştırılmasındaki güçlüğü dikkat çekilmiştir.

Rahman ve ark. (2007), ailesel meme tümörü gözlenen ailelerde yaptıkları çalışma sonucunda tek bir allelde meydana gelen ve erken *stop* kodonu oluşumuna neden olan *PALB2* mutasyonlarının meme tümörü riskini iki-üç kat artırdığını bildirmişlerdir. Erkko ve ark. (2007), Finlandiya’da c.1592delT mutasyonunun ailesel meme tümörü vakalarında anlamlı derecede yüksek olduğunu; aynı mutasyonun ayrıca birkaç nesilde prostat kanseri görülen bir ailede de tespit edildiğini ifade etmişlerdir. Erkko ve ark. (2008), başka bir çalışmada bu mutasyonunun meme tümörü riskini 6,1 oranında artırdığını, erken yaşlarda riskin daha yüksek olup, ilerleyen yaşlarda daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Heikkinen ve ark. (2009) ise aynı mutasyonun tümör fenotipi ve prognozu ile ilişkisini araştırmış, ailesel meme tümörü vakalarının %2’sinde; sporadik vakaların ise %0,6’sında bu mutasyonun bulunduğunu bildirmiş, bu vakaların genellikle tümör derecelerinin yüksek olduğunu ve yüksek oranda Ki-67 ifade ettiklerini belirtmişlerdir. Özellikle HER2 negatif ailesel meme tümörü vakalarında hayatta kalma oranının diğer örneklerle nazaran oldukça azaldığını ve bu mutasyonun agresif bir tümör fenotipine neden olduğunu ifade etmişlerdir.

PALB2 geninde tespit edilen mutasyonların meme tümörü ile ilişkilendirilmesi sonrasında birçok ülkede *PALB2* geninde mutasyon taranması, panel testleri, vaka-kontrol çalışmaları ve *PALB2* varyantlarının meme tümörü riskini nasıl etkilediğinin araştırılması söz konusu olmuştur.

Tischkowitz ve ark. (2007), meme tümörü görülen ailelerde tespit ettikleri *PALB2* mutasyonlarının meme tümörü riskini artırabileceğini ifade etmişlerdir. Peterlongo ve ark. (2011), aile geçmişlerinde pankreas kanseri olan ailesel meme tümörü hastalarında her iki kanserin görüldüğü iki bireyden birinde proteinin kısa kalmasına neden olan bir mutasyon bulunduğunu bildirmişlerdir. *PALB2* mutasyonu bulunan dört ailede ince bağırsak karsinoması, meme tümörü, pankreas kanseri, çoklu kolorektal kanser ve gastrointestinal kanser gibi çeşitli kanser tipleri görüldüğü tespit

edilmiş, ayrıca *PALB2* mutasyonlarının kolorektal kanser olasılığını da artırabileceği üzerinde durulmuştur. Wong ve ark. (2011), *PALB2* mutasyonlarının düşük frekansına karşın meme tümörü riskini artırabileceği üzerinde durmuştur. Casadei ve ark. (2011), ailesel meme tümörü hastası bireylerde yaptıkları çalışmada *PALB2* germ hattı mutasyonlarının 55 yaş için tümör riskini 2,3 kat artırdığı 85 yaş için ise 3,4 kat artırdığını hesaplamışlardır. Tespit edilen mutasyonların Afrika kökenli Amerikan, İngiliz, Fransız, Alman, İrlandalı ve İskoç kökenli bireylerde görüldüğü bildirilmiştir. Antoniou ve ark. (2014), *PALB2* mutasyonu taşıyan ailelerde 40 yaş altındaki *PALB2* mutasyonu taşıyan bireylerde meme tümörü oluşumu riskinin sekiz ile dokuz kat, 40-60 yaş arası bireylerde altı ile sekiz kat, 60 yaş üstü bireylerde ise beş kat daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Ailelerinde meme tümörü geçmişi olmayan fakat *PALB2* mutasyonunu bulunduran bireylerin 70 yaşına geldiklerinde meme tümörüne yakalanma risklerinin %33 olduğu, birinci derece akrabalarında meme tümörü geçmişi bulunan ve *PALB2* mutasyonu taşıyan bireylerin ise 50 yaşına geldiklerinde meme tümörü risklerinin %58 olduğu hesaplanmıştır. Shimelis ve ark. (2018), *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* ve *RAD51D* genlerinin Kafkaslarda yaşayan popülasyon genelinde ve Afrika kökenli Amerikalı popülasyonlarda üçlü negatif meme tümörü için yüksek riskli genler olduğunu bildirmiştir. Bu genlerdeki germ hattı mutasyonlarının meme tümörü gelişimi riskini hayat boyu %20 oranında artırdığı ifade edilmiştir.

Pauty ve ark. (2014), derleme yayınlarında insan *PALB2* geninde meme tümörü ile ilişkili olarak protein düzeyinde yaklaşık 48, DNA düzeyinde ise yaklaşık 49 mutasyon olduğunu, çalışılan bu hastalarda *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde ise herhangi bir mutasyon bulunmadığını bildirmişler ve popülasyon düzeyinde yapılan çalışmalarda bu mutasyonların ailesel meme tümörü geçmişi olan popülasyonlarda frekansının %0,6 ve %4,8 arasında değiştiğini ifade etmişlerdir. Tavtigian ve Chenevix-Trench (2014) ise, yine aynı yıl yayınlanan derlemelerinde *PALB2* genini meme tümöründe orta derecede risk teşkil eden genler arasında saymışlar ve riskli görülen mutasyonların erken *stop* kodonu oluşumu ile ilişkin mutasyonlar olduklarını bildirmişlerdir. Couch ve ark. (2015), üçlü negatif meme tümörü hastası bireylerde *PALB2* geninde hastaların %1,2'sinde zararlı mutasyon bulunduğunu bildirmiştir.

Tung ve ark. (2015), *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları yönünden test edilecek meme tümörü hastaları ve daha önce bu genlerdeki mutasyonlar açısından negatif bulunmuş ayrıntılı aile öyküsü alınmış olan ikinci bir meme tümörü hastası grubunda 25 geni kapsayan bir panel ile germ hattı mutasyonlarını taramıştır. İlk grupta *PALB2* geninde 10 farklı zararlı mutasyon ile 33 adet etkisi bilinmeyen varyant tespit edilmiş, diğer grupta ise bir adet zararlı mutasyon ile dokuz adet etkisi bilinmeyen varyant bildirilmiştir.

Ronowicz ve ark. (2015), meme tümörü hastası bireylere ait sağlıklı dokularda tespit ettikleri kopya sayısı değişiklikleri ile genom stabilitesini sağlamakla görevli genler olan *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PALB2* ve *NCOR1* gibi genlerde tespit ettikleri mutasyonların birlikte görüldüğünü bildirmişlerdir.

Lefebvre ve ark. (2016), metastatik meme tümörü vakalarında erken yaşta meydana gelen meme tümörü vakalarına nazaran *ESR1*, *FSIP2*, *FRAS1*, *OSBPL3*, *EDC4*, *PALB2*, *IGF1* ve *AGRN* genlerinde daha sık mutasyon görüldüğünü bildirmiştir. Çalışmada kullanılan örneklerin %4'ünde *PALB2* geninde mutasyon tespit edilmiş, Kanser Genom Atlasında (TCGA) ise örneklerin yalnızca %0,1'inde *PALB2* mutasyonu görüldüğü belirtilmiştir.

Li ve ark. (2016), *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonu bulunmayan ailesel meme tümörü hastalarında *PALB2* geninde 14 ailede sekiz farklı mutasyon tespit etmiş, risk hesaplamasında *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2* ve *TP53* genlerinin meme tümörü riskini anlamlı derecede artırdığını belirtmiştir. Tung ve ark. (2016), meme tümörü hastalarına ait kan örneklerinde meme tümörüne yatkınlık ile ilişkilendirilmiş 25 gende mutasyon taramış, *PALB2* geninde mutasyon olduğu tespit edilen yalnızca bir birey (%0,2) olduğunu bildirmişlerdir.

Bunnell ve ark. (2017), kanser hastalarında dört farklı panel testi uygulamıştır. Çalışmada orta derecede penetrans gösteren genlerde tespit edilen mutasyonların da tedavide değişikliklere yol açabildiği görülmüş, panel testlerinde orta ve bilinmeyen penetransa sahip genlerin de kontrol edilmesinin gerekliliği üzerinde durulmuştur.

Rummel ve ark. (2017), genç invaziv meme tümörü hastalarında yaptıkları çalışmada 94 gende germ hattı mutasyonu taramış, 27 hastada patolojik germ hattı mutasyonları bulunduğunu (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CHEK2*, *APC* ve *MUTYH*) tespit etmiştir. *ATM*, *BRCA2*, *CDH1*, *CHEK2* ve *PALB2* genlerinde ise etkisi bilinmeyen varyantlar olduğu bildirilmiş, *PALB2* geninde bir hastada tespit edilen p.E892K varyantı *SIFT* ve *PolyPhen* algoritmalarına göre zararlı ve hasar vermesi muhtemel olarak değerlendirilmiştir. Ailesel meme tümöründe *BRCA1* ve *BRCA2* negatif bireylerde yapılan bir çalışmada (Slavin ve ark., 2017) *PALB2* ve *TP53* genleri yüksek riskli, *ATM* ve *BARD1* genleri orta derecede riskli, *CHEK2* geni ise düşük derecede riskli meme tümörü yatkınlık genleri olarak bildirilmiştir. Lee ve ark. (2018), invaziv meme tümörü hastalarında *PALB2* ve diğer 486 hedeflenmiş gende mutasyon ve kopya sayısındaki değişiklikleri araştırmıştır. Hastaların (n=15) beşinde *PALB2* heterozigot mutasyonları tespit edilmişken, 10 hastada ise *null* mutasyon görüldüğü bildirilmiştir. Yayında bu genin her iki allelinin de inaktive olmasının tümör oluşumunu tetikleyebileceğine değinilmiştir. Girard ve ark. (2019), GENESIS projesinde ailesel meme tümörü ile ilişkili yaptıkları çalışma kapsamında *BRCA1* ve *BRCA2* genleri haricindeki DNA tamir mekanizmasında görevli 113 gende fonksiyon kaybı mutasyonları ve yanlış anlam mutasyonlarını taramış, DNA tamir mekanizmasında görevli bu genlerde tespit edilen varyantların meme tümörü ile ilişkisini araştırmışlardır. *PALB2*, *ATM*, *CHEK2*, *FANCI*, *MAST1*, *POLH*, *RTEL1* ve *CHEK2* genleri meme tümörü ile ilişkili bulunmuştur. *PALB2* geninde hem fonksiyon kaybı mutasyonlarının hem de yanlış anlam mutasyonlarından zararlı olanların meme tümörü riskini artırdığı bildirilmiştir. Petridis ve ark. (2019a), sporadik lobuler meme tümörü hastalarında *PALB2* geninin de dahil olduğu altı gende patolojik germ hattı varyantlarını araştırmışlardır. İnvaziv lobuler meme tümörü vakaları ve *in situ* lobuler karsinoma vakalarında yapılan çalışma sonucunda invaziv lobuler meme tümörü vakalarında çok sayıda patolojik *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2* ve *CDH1* varyantı tespit edilmiştir. İnvaziv lobuler meme tümörü vakalarında yedisi yeni tespit edilmiş olmak üzere 11 bireyde; *in situ* lobuler karsinoma vakalarında bir bireyde; kontrol grubunda ise bir bireyde patolojik *PALB2* varyantı bulunduğu bildirilmiştir. Aynı ekibin yürüttüğü bir başka çalışmada (Petridis ve ark., 2019b) *in situ* duktal karsinoma hastalarında *PALB2* geninin dahil olduğu beş gene ait germ hattı mutasyonları

araştırılmış, *PALB2* geninde üçü yeni olmak üzere, beş patolojik varyant tespit edilmiştir. Shahi ve ark. (2019), *BRCA1* ve *BRCA2* negatif ailesel meme tümörü hastalarında ekzom dizileme ile predispozisyona neden olan aday genleri belirlemeye çalışmış, *PALB2* genini meme tümörü predispozisyonu için aday gen olarak göstermiştir. Li ve ark. (2019), *PALB2* geninde patolojik germ hattı mutasyonu bulunan bireylerde somatik değişiklikleri araştırmıştır. Somatik mutasyonlardan en çok etkilenen genlerin *PIK3CA* (%29), *PALB2* (%21), *TP53* (%21) ve *NOTCH3* (%17) olduğu tespit edilmiş, 16 vakada heterozigotluk kaybı veya ikinci bir mutasyon nedeniyle her iki allelin de *PALB2* geninde inaktif hale geldiği bildirilmiştir. Ekzom dizileme yapılan bireylerden bazılarında (12/16) geniş çaplı transisyonlar görüldüğü belirtilmiştir.

Panel testi ile primer meme tümörleri ve sekonder meme tümörü vakalarındaki mutasyonlar araştırılmıştır (Yao ve ark., 2020). Patolojik ve patolojik olması muhtemel (*likely pathogenic*) mutasyonların frekansları primer ve sekonder meme tümörleri için *PALB2* geni için sırasıyla %0,9 ve %1,4 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada elde edilen veriler zararlı mutasyona sahip bireylerin ikinci kez meme tümörüne yakalanma riskinin mutasyon taşımayan bireylere nazaran daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bergstrom ve ark. (2020), meme tümörü hastalarında *ATM* (n=24), *CHEK2* (n=26) ve *PALB2* (n=24) genlerine ait mutasyon taraması yapmış, mutasyon tespit edilen 74 hastayı mutasyon tespit edilmeyen hastalarla karşılaştırmıştır. Tümör histopatolojisi, tedavi, klinik sonuç ve popülasyona ilişkin verilerle birlikte değerlendirerek bu mutasyonların etkilerini araştırmışlardır. Bu mutasyonların bulunduğu hastaların aile geçmişinde kanser öyküsünün anlamlı derecede daha yüksek olduğu ve teşhis döneminde tümör boyutunun daha büyük olduğu bildirilmiş, tedavi sürecinde bu grupta cerrahi müdahale seçiminde daha kapsamlı operasyonların tercih edildiği ifade edilmiştir. Bodily ve ark. (2020), Kanser Genom Atlasında kayıtlı hasta verileri ile yaptıkları çalışmada meme tümörüne yatkınlığa neden olan 61 gene ilişkin mutasyonların profilini araştırmışlardır. *PALB2* geninde mutasyon profilinin BRCA mutasyonları ile benzerlik göstermesine karşın vaka sayısının düşük olduğu ifade edilmiştir.

Fanale ve ark. (2020), çift taraflı meme tümörü hastalarında yaptıkları çalışmada panel testi ile patolojik mutasyonların etkilerini araştırmışlardır. Sekiz hastada *PALB2* geninde patolojik varyant tespit edilen çalışmada *PALB2* ve *CHEK2* geninde tespit edilen patolojik mutasyonlar ile çift taraflı meme tümörü arasında korelasyon görüldüğü ifade edilmiştir. Corredor ve ark. (2020), çoklu meme tümörü görülen hastalarda yaptıkları panel testinde mutasyon tespit edilen hastaların %17,6'sının *BRCA1/2* dışı mutasyon taşıdığını bildirmişlerdir. Bu hastalardan ikisinde *PALB2* geninde mutasyon tespit edilmiştir. Aynı yıl Maxwell ve ark. (2020), yüksek riskli meme tümörü vakaları ve ailesel meme tümörü vakalarından oluşan iki farklı toplulukta *BRCA1/2* dışındaki 17 genin mutasyonlarını taramış ve *ExAC* (Ekzom Toplama Konsorsiyumu) konsorsiyumuna ait kontrol grubu ile karşılaştırmışlardır. Her iki toplulukta da çoklu meme tümörü hastalarında patolojik mutasyon oranı tekli meme tümörü hastalarına göre daha yüksek olarak tespit edilmiş, *ATM* ve *PALB2* mutasyonlarının her iki hasta grubunda kontrol grubuna oranla daha fazla görüldüğü bildirilmiştir. Yüksek riskli meme tümörü hastalarından oluşan toplulukta *PALB2* mutasyon oranları çoklu meme tümörlerinde %0,54; tekli meme tümörlerinde %0,22 olarak bildirilmiştir. Ailesel meme tümörü vakalarından oluşan grupta ise çoklu meme tümörü vakalarında %1,47; tekli vakalarda ise %0,89 olarak bulunmuştur.

Hu ZY ve ark. (2020), germ hattı *PALB2* mutasyonları görülen tümörlerde somatik mutasyonların durumunu araştırmışlardır. Ailesel meme tümörü hastası 143 hastadan 10'unda fonksiyon kaybına neden olan heterozigot *PALB2* germ hattı mutasyonları olduğu tespit edilmiştir. Aynı hastalarda somatik mutasyonlar araştırıldığında yalnızca birinde somatik mutasyon, iki hastada ise heterozigotluk kaybı varlığı bildirilmiştir. Ayrıca ailesel ve sporadik vakalarda mutasyon imzalarındaki dağılımın farklılık gösterdiği ifade edilmiştir. Kwong ve ark. (2020), meme ve ovaryum tümörü hastalarında *BRCA1/2*, *TP53* ve *PTEN* mutasyonları negatif olarak tespit edilen örneklerde panel testi ile mutasyon taramışlardır. En yaygın mutasyona uğramış genler *PALB2* (%1,4), *RAD51D* (%0,8) ve *ATM* (%0,8) olarak bildirilmiştir. *PALB2* genindeki patolojik mutasyonların bulunduğu bireylerin hepsi meme tümörü hastasıdır ve 18 hastadan 14'ünün aile geçmişinde meme tümörü veya diğer tümör vakaları olduğu bildirilmiştir. Patolojik varyantların haricinde etkisi

bilinmeyen *PALB2* mutasyonlarının da görüldüğü ifade edilmiştir. Mutasyon görülen hastaların %77,8'i 45 yaşın altındaki hastalardır ve hastaların %33,3'ünde her iki memede de tümör oluşumu bildirilmiştir. Evans ve ark. (2021), 30 yaş altı meme tümörü hastalarında yaptıkları vaka-kontrol çalışmasında *PALB2* geninde meme tümörü hastalarının %2,17'sinde, kontrol grubunun ise %0,19'unda patolojik varyant tespit edildiğini bildirmiştir. Bu çalışmada *PALB2* geni patolojik mutasyonlarının istatistiksel olarak anlamlı derecede erken yaşta gelişen meme tümörü vakalarında önemli olduğu ifade edilmiştir. Van Veen ve ark. (2021), panel testi sonrasında yapılan risk hesaplamasında *PALB2* geninin lobüler meme tümörü riskinde artışa neden olmadığını bildirmiştir. Chávarri-Guerra ve ark. (2021), 60 yaş üstü, üçlü negatif meme tümörü hastalarında mutasyon dağılımını araştırmışlardır. *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* ve *RAD51C* genlerinde patolojik varyantlar tespit edilmiştir. Bu yaş grubundaki hastalarda patolojik *PALB2* mutasyonlarının %12,5 oranında görüldüğü bildirilmiştir.

Tümör alt tiplerine bakıldığında, Hu C ve ark. (2020), ER, PR ve HER2 açısından klinik olarak sınıflandırılmış tümör tiplerine özgü germ hattı mutasyonlarını araştırmışlardır. Tümörler ER+/HER2-, ER-/HER2+, ER+/HER2+, ER-/HER2- ve üçlü negatif (ER-/HER2-/PR-) olarak sınıflandırılmış ve panel testine tabi tutulmuştur. En çok germ hattı mutasyonu görülen grup üçlü negatif olarak sınıflandırılan gruptur (%14,4), bu grubu ER+/HER+ grup izlemekte (%8,9), ardından ER+/HER2- grup gelmekte (%8,6), en düşük germ hattı mutasyonu görülen grup ise ER-/HER2+ olan grup olarak görülmektedir. *PALB2* mutasyonlarının frekansı örnekleme %1 olarak hesaplanmış ve en çok mutasyon tespit edilen dördüncü gen olarak bildirilmiştir. Gruplara bakıldığında, ER+/HER2- grubunda %0,9 frekansı ile *BRCA1* geni ile birlikte üçüncü sırada, ER+/HER2+ grubunda %0,7 frekansı ile *BRCA1* geni ile birlikte beşinci sırada, ER-/HER2+ grubunda %0,5 frekansı ile altıncı sırada, üçlü negatif tümör grubunda ise %1,4 frekans ile üçüncü sırada en çok mutasyon bildirilen gen olarak gösterilmiştir. Tümör tiplerine göre risk hesaplaması yapıldığında ise ER+/HER2- tümör tipinde *PALB2* germ hattı mutasyonlarının tümör riskini 5,15 kat, ER+/HER2+ tümör tipinde 3,74 kat, ER2-/HER2+ tümör tipinde 3,49 kat, üçlü negatif tümör tipinde ise 7,88 kat artırdığı görülmüştür (Hu C ve ark., 2020). Heeke ve ark.

(2020), meme tümörü örneklerinde HR mekanizmasında görevli genlerdeki somatik mutasyonları araştırmışlardır. Tümör örneklerinin %0,8'inde *PALB2* mutasyonu tespit edilmiştir. Tümör alt tiplerine bakıldığında ise ER+/PR+/HER2- grubunda mutasyon frekansı %1, üçlü negatif meme tümöründe ise %0,8 olarak bildirilmiş, ER+/PR+/HER2+ ve ER-/PR-/HER2+ gruplarında ise *PALB2* mutasyonu görülmemiştir.

Birçok ülkede *PALB2* varyantlarının meme tümörü üzerine etkisi araştırılmıştır. Kanada'da Foulkes ve ark. (2007), *PALB2* geninde p.Q775X kurucu mutasyonunu tespit etmiş ve 50 yaşın altındaki Fransız asıllı Kanada vatandaşlarında meme tümöründe %0,5 oranında bu mutasyonun görüldüğünü ifade etmişlerdir. Aynı mutasyon yine Fransız asıllı Kanada vatandaşlarından oluşan meme tümörü hastalarında tespit edilmiştir, bu mutasyonun görülme olasılığı hesaplanamamış ancak penetransı yüksek bir allel olduğu ifade edilmiştir (Ghadirian ve ark., 2009). Guénard ve ark. (2010), *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde herhangi bir mutasyon bulunmayan Fransız asıllı Kanada vatandaşlarında *PALB2* geninde varyantlar tespit etmiş, *STK11* ve *PALB2* genlerindeki varyantların ilgili popülasyon için meme tümörü yatkınlığına orta veya zayıf derecede etki edebileceklerini ifade etmişlerdir. Ancot ve ark. (2015), Fransız asıllı Kanadalı ailesel meme tümörü hastaları ve meme ve ovaryum tümörlerinin birlikte görüldüğü hastalarda yaptıkları çalışmada, bu popülasyonda tanımlanmış tek *PALB2* mutasyonu olan p.Q775X'in *BRCA1/BRCA2* mutasyonlu bireylerde görülme sıklığını araştırmış, örneklem grubunda ilgili mutasyonun bulunmadığını ifade etmişlerdir.

Amerika'da yapılan çalışmalara bakıldığında, Ding ve ark. (2011b), Afrika kökenli Amerikan vatandaşı kadın meme tümörü hastalarında yaptıkları bir çalışmada toplamda 12 varyant tespit etmiş ve bu varyantlar arasından üç varyantın patolojik olduğunu tespit etmiş, meme tümörü araştırmalarında her ne kadar frekansları düşük olsa da *PALB2* mutasyonlarının da oldukça önemli olduğu vurgusunu yapmışlardır. Churpek ve ark. (2015), Afrika kökenli Amerikalı hastalarda meme tümörüne yatkınlığa neden olan mutasyonları araştırmışlardır. Çalışmada üç hastada *PALB2* geninde sırasıyla c.758insT, c.1479delC, c.3048delT mutasyonları tespit edilmiştir.

c.758insT ve c.1479delC mutasyonlarına sahip bireylerin aile hikayesinde meme tümörü bulunduğu; ayrıca c.1479delC mutasyonu görülen bireyde tümör teşhisinin 45 yaşından önce yapıldığı bildirilmiştir. Ding ve ark. (2018), çalışmalarında Afrika kökenli Amerikalı kadınlarda meme tümörü ile ilişkili homolog rekombinasyon genlerinde mutasyon taramışlardır. *PALB2*, *RAD51*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2* ve *XRCC3* genlerinin araştırıldığı çalışmada, *PALB2* geninde iki varyantın hasara neden olabileceği bildirilmiştir. Kurian ve ark. (2019), Amerika'nın iki eyaletinde meme tümörü ve ovaryum tümörü hastası popülasyonlarda yapılan bir çalışmada meme tümörü hastalarının %24,1'inde genetik test sonucu bulunduğunu, bu sonuçlara göre *PALB2* patolojik mutasyonlarının prevalansının %1,0 olarak hesaplandığını bildirmişlerdir. Lu ve ark. (2019), Amerika'da meme tümörü, ovaryum tümörü ve her iki tümör teşhisinin de konulduğu vakalarda yapılan ekzom dizilemede meme tümörü hastalarında *PALB2* geninin tümör oluşturma riskini %5,53 olarak, erkek meme tümörü riskini ise %22,73 olarak hesaplamışlardır. Caskey ve ark. (2020), Alabama Üniversitesinde "Kadın Kanserlerinde Önleyici Bakım Programı"na kayıtlı kadınlardan *BRCA1/2* genleri haricinde mutasyon bulunan kadınlarda yürüttükleri çalışma kapsamında en yaygın görülenleri *ATM*, *CHEK2* ve *PALB2* genlerinde olan 16 mutasyon tespit etmiştir. Hastaların %11,5'i profilaktik cerrahi geçirmiş, %88,5'i ise aktif olarak izlenmiştir. Popülasyonun yalnızca %11,6'sında biyopsi sonucu malign olarak tespit edilmiştir. *PALB2* mutasyonu olan bir bireyde invaziv meme tümörü görüldüğü bildirilmiştir. Palmer ve ark. (2020), Afrika Kökenli Amerikalı meme tümörü hastalarında yaptıkları vaka-kontrol çalışmasında panel testi ile mutasyon taraması yapmış ve mutasyonların meme tümörü riski ile ilişkisini değerlendirmiştir. *PALB2* geni mutasyon frekansı meme tümörü hastası bireylerde %1,05; kontrol grubunda ise %0,10 olarak hesaplanmıştır. *BRCA1*, *BRCA2* ve *PALB2* genlerindeki mutasyonlar yüksek meme tümörü riskleri ile ilişkili bulunmuş, riskler sırasıyla *BRCA1* için 47,55 kat, *BRCA2* için 7,25 kat ve *PALB2* için 8,54 kat olarak hesaplanmıştır. Walsh ve ark. (2021), "Carolina Breast Cancer Study" isimindeki çalışmalarında invaziv meme tümörüne yatkınlığa neden olan biyolojik ve sosyal risk faktörlerini araştırmışlardır. Hastaların %5,6'sında *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* ve *TP53* genlerinden birinde patolojik varyant tespit edilmiştir. *PALB2* mutasyonlarının riski tüm tümör tipleri için 9,04 kat olarak hesaplanmış ve *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinden

sonra üçüncü sırada risk teşkil ettiği bildirilmiş, üçlü negatif meme tümörü için ise risk oranı 10,78 kat olarak hesaplanmıştır. Afrika kökenli Amerikalı hastalarda üçlü negatif meme tümörü ve *BRCA2* ve *PALB2* genleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunduğu bildirilmiştir.

Orta ve Güney Amerika’da yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, Brezilyalı ailesel ovaryum ve meme tümörü hastalarında yapılan çalışmada (Silva ve ark., 2014) *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* ve *CHEK2* genlerinde mutasyon taranmış ve *PALB2* dahil olmak üzere kansere yakınlıkla ilişkilendirilmiş 14 farklı gende kopya sayısı varyasyonu (CNV) araştırılmış ancak *PALB2* geninde herhangi bir farklılık görülmemiştir. Encinas ve ark. (2018), Brezilyalı hastalarda erken yaşta meydana gelen luminal (HER2 negatif) meme tümörlerinde BRCA germ hattı mutasyonları ve somatik mutasyonları araştırmışlardır. 36 luminal tümörün 16’sında *PALB2* geninin de dahil olduğu farklı DNA tamir mekanizmalarında görevli birçok gende varyant tespit edilmiş, bu varyantların %54’ünün patolojik olduğu bildirilmiştir. Gomes ve ark. (2021), Brezilya’da *BRCA1/2* negatif ailesel meme tümörü ve ovaryum kanseri hastalarında yüksek ve orta penetranslı genlerde mutasyon taramışlardır. Çalışma kapsamında 488 varyant tanımlanmış, hastaların %3,97’sinde patolojik veya patolojik olması muhtemel varyantlar tespit edilmiştir. Bu genler *ATM* (1), *CHEK2* (2), *PALB2* (1) ve *TP53* (1) genleri olarak bildirilmiştir. *PALB2* geninde bir patolojik varyant ve iki önemi bilinmeyen varyant bildirilmiştir.

Jara ve ark. (2017), Orta Amerika ve Güney Amerika’da meme tümörüne yakınlık ile ilişkili genlerdeki mutasyonların araştırıldığı çalışmaları bir araya getirerek bu bölgedeki genel durumu gözler önüne sermek istemiş, yapılan çalışmalar içinde yalnızca Şili’de *PALB2* geninde rs152451 ve rs45551636 varyantlarının aile hikayesinde meme tümörü geçmişi bulunan vakalarda meme tümörü riskini artırdığını ifade etmişlerdir. Cock-Rada ve ark. (2018), Kolombiya’da 85 hasta üstünde ailesel meme ve ovaryum tümörlerini incelemek üzere bu tümör oluşumu ile ilişkili 25 gen içeren panel ile çalışmış; *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ATM*, *MSH2* ve *PMS2* genlerinde delesyon nedeni ile germ hattında patolojiye sebep olan mutasyonlar tespit etmişlerdir. *PALB2* genindeki zararlı mutasyonun c.1240C>T (p.R414X) pozisyonunda

bulunduğu, ayrıca etkisi bilinmeyen iki varyantın daha tespit edildiği (c.23C>T ve c.483C>G) bildirilmiştir. Urbina-Jara ve ark. (2019), Latin Amerika’da meme tümörü hastalarında yapılmış çalışmalarda DNA tamir mekanizmasında aktif görev yapan genlere ilişkin germ hattı mutasyonu verilerini bir araya getirmişlerdir. *PALB2* genine ilişkin incelenen 11 Latin Amerika ülkesi içinden yalnızca Şili ve Kolombiya’da varyant tespit edildiği, toplamda altı adet *PALB2* varyantı bildirildiği tespit edilmiştir. Üç varyant yalnızca Şili’de, diğer üç varyant ise yalnızca Kolombiya’da bildirilmiştir. Oliver ve ark. (2019) ise yine Latin Amerika’da yürütülen ailesel meme tümörü ve ovaryum tümörü çalışmasının (LACAM) ilk fazı kapsamında genomik epidemiyolojik bir yaklaşım izlemişlerdir. Proje kapsamında *PALB2* geninde Kolombiya’da bir, Meksika’da bir varyant olmak üzere toplamda iki patolojik varyant tespit edilmiştir. Patolojik varyantların içinde *PALB2* genindeki varyantların frekansı %5,1 olarak hesaplanmıştır. George ve ark. (2021), Karayipler’de meme tümörü ve ovaryum kanseri hastalarında panel testi ile yaptıkları çalışmada hastaların %14,2’sinde germ hattında patolojik veya patolojik olması muhtemel mutasyon tespit etmişlerdir. Tespit edilen varyantların dağılımı *BRCA1* (%64), *BRCA2* (%23), *PALB2* (%9) ve *RAD51C*, *CHEK2*, *ATM*, *STK11*, *NBN* genleri (%4) olarak bildirilmiştir. Çalışma yapılan yedi ülkeden Bahamalar ve Cayman Adaları’nda hiç patolojik *PALB2* varyantına rastlanmazken, Barbados ve Jamaika’da dört, Dominik Cumhuriyeti ve Trinidad Tobago’da iki, Haiti’de ise bir patolojik varyant görüldüğü ifade edilmiştir.

İspanya’da García ve ark. (2009), İspanyol meme tümörü hastası ailelerde daha önce *fanconi* anemi çalışmalarında bildirilmiş yanlış anlam mutasyonları, c.1056_1057delGA yeni varyantı, 5’ UTR bölgesi varyantı ve intronik varyantlar tespit etmiş, ayrıca c.1056_1057delGA varyantına sahip ve *BRCA1* ile *BRCA2* mutasyonu görülmeyen bireyde heterozigotluk kaybı olduğunu bildirmişlerdir.

İrlanda’da McInerney ve ark. (2010), meme tümörü hastalarında *CHEK2*, *BRIP1* ve *PALB2* geni varyantlarını araştırmışlardır. Yapılan çalışmada genin tamamı sekanslanmamış, yalnızca Rahman ve ark. (2008)’in İngiltere’de bildirmiş olduğu beş *PALB2* mutasyonunun varlığı incelenmiş, bu mutasyonların meme tümörü

predispozisyonuna neden olduğunu önerebilecekleri sağlam kanıtlar elde edemediklerini bildirmişlerdir. Aloraifi ve ark. (2015) ise İrlandalı BRCA1/2 mutasyonu bulunmayan ailesel meme tümörü hastası bireylerde 312 geni kapsayan çalışmada yalnızca bir hastada *PALB2* mutasyonu saptayabilmişlerdir.

İtalya’da Papi ve ark. (2010), *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonu bulunmayan bireylerden oluşturulmuş İtalyan popülasyonunda *PALB2* genindeki mutasyonları taramış ve tespit ettikleri varyantlar arasından p.R753X mutasyonunun anne ve kızında görüldüğünü ayrıca zararlı bir mutasyon olduğunu bildirmişlerdir. Aynı yıl İtalya’da yapılan bir başka çalışmada (Balìa ve ark., 2010), örneklemdeki ailelerden birinde *PALB2* geninde 10 adet varyant tespit etmiş, p.L451X mutasyonunun İtalya popülasyonu için risk oluşturabileceği ifade edilmiştir.

Polonya’da Dansonka-Mieszkowska ve ark. (2010), Polonyalı meme tümörü ve ovaryum kanseri hastaları ile sağlıklı kontrollerde yaptıkları çalışmada *PALB2* geninde dördü ilk kez tespit edilmiş olmak üzere 10 adet varyant ve hasarlı protein üretimine neden olan c.509_510delGA (p.R170fs) mutasyonunu tespit etmişlerdir. Tespit edilen delesyon iki ovaryum kanseri hastasında, dört ailesel meme tümörü hastasında ve kontrol grubunda bulunan sağlıklı bir bireyde görülmüştür, sporadik meme tümörü vakalarında ise bu mutasyon görülmemiştir. Cybulski ve ark. (2019), Polonya’da meme tümörü için aile hikayesi bulunan popülasyonda yaptıkları taramada probandların %50,3’ünde germ hattı mutasyonu tespit etmiştir. Çalışmada altı gendeki (*BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2*, *NBN* ve *RECQL*) 20 kurucu mutasyonun Polonya’daki ailesel meme tümörü görülen ailelerin %82’sinde görüldüğü bildirilmiş, ailesel meme tümörü riski *PALB2* geni mutasyonları için %15,4 olarak hesaplanmıştır. *PALB2* geninde tespit edilen altı mutasyondan c.509_510delGA ve c.172_175delTTGT kurucu mutasyonlarının *PALB2* pozitif vakaların %83’ünü oluşturduğu bildirilmiştir.

Hollanda’da Adank ve ark. (2011), Amsterdam’da birbirleri ile akrabalık ilişkileri bulunmayan ancak aile geçmişlerinde tümör hikayesi bulunan, farklı kanser türlerinden muzdarip (meme tümörü, ovaryum kanseri, erkek meme tümörü ve

pankreas kanseri) kanser hastalarında yaptıkları çalışmada, *PALB2* geninde kodlanan bölgede yedi yanlış anlam mutasyonu, üç sinonim mutasyon ve bir delesyon tespit etmiş; intronik bölgelerde ise 11 varyant bulduklarını bildirmişlerdir.

Bogdanova ve ark. (2011), Alman ve Rus asıllı bilateral meme tümörü hastalarında *PALB2* varyantlarını taramış, toplamda 15 varyant tespit etmiştir. Alman hastalarda ve Rus hastalarda farklı mutasyonlar bildirilmiştir. Aynı yıl Hellebrand ve ark. (2011), Almanya’da ailesel meme tümörü hastalarında yaptıkları çalışmada altısı yeni olmak üzere hasarlı protein üretimine neden olan yedi farklı mutasyon tespit etmiş, hastalıkla ilişkili olabileceği düşünülen yanlış anlam mutasyonları görüldüğünü bildirmişlerdir. Hauke ve ark. (2018), Almanya’da yaşayan *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları yönünden negatif oldukları tespit edilmiş meme tümörü hastalarında *PALB2* geni mutasyonlarının prevalansının %1,2 oranı ile *CHEK2* ve *ATM* genlerinin ardından en yüksek sırada geldiğini bildirmiştir.

Finlandiya’da *PALB2* genine ilişkin tekrarlayan kurucu mutasyonun tanımlanmasının ardından (Erkko ve ark., 2007 ve Heikkinen ve ark., 2009), Kuusisto ve ark. (2011), ailesel meme ve/veya ovaryum tümörü hastası bireyde yaptıkları çalışmada *PALB2* geninin de dahil olduğu yedi gende mutasyon taraması yapmış, *PALB2* geninde üçü yeni olmak üzere dokuz farklı varyant olduğunu tespit etmişlerdir. Daha önce Çin popülasyonunda bildirilmiş olan c.2586+58C>T varyantı hastaların %43,9’unda tespit edilmiş ve bu varyantın Çin popülasyonunda meme tümörü riskini %36 artırdığı belirtilmiştir. Önceden bildirilen diğer varyantların meme tümörü riskini artırmadığı, yeni tespit edilen varyantların ise protein tahminlerinde nötral olarak değerlendirildiği ifade edilmiştir. Nurmi ve ark. (2019), Finlandiya’da orta derecede risk genlerinde tekrarlayan mutasyonların meme tümörü hastalarındaki frekansını araştırmışlardır. *PALB2* geni c.1592delT mutasyonunun da araştırıldığı çalışmada ailesel meme tümörü hastalarında bu mutasyonun frekansını %2,37; sporadik vakalarda %0,75; kontrol grubunda ise %0,16 olarak hesaplamışlardır. Tüm meme tümörü hastaları göz önünde bulundurulduğunda ise frekansın 1,45 olarak hesaplandığı bildirilmiştir.

Goidescu ve ark. (2018), Romanya’da *PALB2* geninin de dahil olduğu panel testine yönlendirilen meme tümörü hastalarında tespit ettikleri mutasyonların prevalansını araştırmışlardır. Çalışma sonuçları popülasyonun %62’sinin penetransı yüksek genlerde, %29’unun orta derecede penetrans gösteren genlerde, %9’unun ise diğerk genlerde olduğunu göstermiştir. *PALB2* geninde dört patolojik varyant ve etkisi bilinmeyen bir varyant çalışmadaki 82 hastadan altısında tespit edilmiştir.

Hilz ve ark. (2019), Letonya popülasyonunda *PALB2* ve *RECQL* meme tümörü yatkınlık genlerindeki varyantları araştırmışlardır. *PALB2* genine ait iki varyantın tarandığı çalışmada c.509_510delGA varyantına ilişkin göreceli risk 7,18 olarak, c.172_175delTTGT varyantına ilişkin göreceli risk ise 1,5 olarak hesaplanmıştır.

Zanti ve ark. (2020), Güney Kıbrıs Rum Yönetimi’ndeki *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde mutasyon bulunmayan üçlü negatif meme tümörü hastalarında yaptıkları panel testi ile *BRCA1* ve *BRCA2* genleri haricindeki tümör yatkınlık genlerinin prevalansını araştırmışlardır. Çalışmaya dahil edilen hastaların %4,3’ünde *PALB2* geninde patolojik varyant tespit edilmiştir. *PALB2* geninde tespit edilen mutasyonların prevalansının diğerk popülasyonlara nazaran daha yüksek olduğu üstünde durulmuştur.

Fostira ve ark. (2020), Yunanistan’da bir kısmı aile öyküsünde kanser bulunan hastalardan, diğerk bölümü ise erken yaşta tanımlanan meme tümörü vakalarından oluşan vakalarda panel testi ile mutasyon taramış ve gene özgü riskleri hesaplamışlardır. *PALB2* geninde mutasyon frekansı %0,8 olarak hesaplanmış ve meme tümörüne yatkınlık için anlamlı derecede ilişkili bulunan genler arasında gösterilmiştir.

Akçay ve ark. (2021), Türkiye’de meme tümörü ve kolorektal kanser hastalarında kanser yatkınlık genlerinde varyant dağılımını araştırmışlardır. Yüksek riskli meme tümörü hastalarının %17,2’sinde patolojik germ hattı varyantı tespit edilen çalışmada dokuz *PALB2* mutasyonu bildirilmiştir. Etkisi bilinmeyen varyantlar ise 19 yanlış anlam mutasyonu ve bir intronik varyant olarak bildirilmiştir. *PALB2* genine

ilişkin risk oranı ise meme tümörü için çalışmadaki kontrol grubuna oranla 8,23 kat olarak hesaplanmıştır.

Çin’de yapılan çalışmalara bakıldığında, Chen ve ark. (2008), rs249954, rs249935, rs120963 ve rs16940342 kodlu TNP’lerin Çin popülasyonunda düşük penetrans ile meme tümörü oluşumunu etkilediklerini bildirmişlerdir. Cao ve ark. (2009), Çin’de ailesel meme tümörü geçmişi olan meme tümörü hastası kadınlarda dokuzu kodlanan bölge, biri 5’ UTR bölgesi, biri intronik bölge olmak üzere toplamda 11 varyant tespit etmişlerdir. Cao ve ark. (2010), Doğu Çin’de meme tümörlü ve sağlıklı bireylerde popülasyonda yaygın olarak görülen altı adet *PALB2* TNP’sinin meme tümörüne yakınlıkla ilişkisini araştırmışlardır. rs249935 varyantındaki G alleli, taşıyan her bir A alleli için meme tümörü riskinde 1,21 kat artışla ilişkilendirilmiştir. rs447529 varyantı için ise dominant kalıtım modeline göre yabancı tip CC homozigotları ile karşılaştırıldığında, varyant homozigot GG ve heterozigot GC taşıyıcılarının 0,43 kat daha düşük meme kanseri riskine sahip olduğu bildirilmiştir. Jian ve ark. (2017), Çin popülasyonunda panel testi ile ailesel meme tümörünü klinik ve genetik açıdan araştırmışlardır. Yarısı meme tümörü hastası; diğer yarısı ise meme tümörü açısından yüksek riskli kabul edilen bireylerde yapılan çalışmada *PALB2* genine ilişkin mutasyonlara bakıldığında, meme tümörü hastası bireylerin ikisinde (%1,7) mutasyon tespit edilmiş, riskli grupta ise herhangi bir mutasyon görülmediği bildirilmiştir. Han ve ark. (2017), Meme Kanseri Derneği Konsorsiyumu (*Breast Cancer Association Consortium / BCAC*) içindeki Asya kökenli bireyler ve Şangay Meme Kanseri Genetiği Çalışması (*Shanghai Breast Cancer Genetics Study / SBCGS*) dahilindeki meme tümörü hastası ve kontrol grubu bireylerde yapılan çalışma sonucunda *PALB2* geninde rs13330119 intronik bölge varyantının tümör riski ile istatistiksel olarak anlamlı derecede ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Xie ve ark. (2018), Çinli meme tümörü hastalarında tümör yakınlığı ile ilişkilendirilmiş 10 gen ile yaptıkları somatik ve germ hattı mutasyonu taramasında *PALB2* geninde popülasyonun %0,3’ünde patolojik germ hattı mutasyonu bulunduğunu, etkisi bilinmeyen varyantlar için ise hem somatik hem de germ hattı varyantları içinde zararlı olmayan varyantların %4,8 oranında görüldüğünü bildirmişlerdir. Lang ve ark. (2020), Çin’de meme tümörü açısından iki yüksek risk faktörüne sahip ve BRCA mutasyonu

bulunmayan meme tümörü hastalarında 30 kanser yatkınlık geninde mutasyon taramışlardır. *PALB2* geninde tespit edilen patolojik ve patolojik benzeri mutasyonlar popülasyonun %1,3'ünde tespit edilmiş, *PALB2* geni en çok mutasyon görülen dördüncü gen olarak bildirilmiştir. *PALB2* mutasyonu tespit edilen beş bireyden dördünün aile hikayesinde meme tümörü olduğu görülmüştür. Zhou ve ark. (2020), BRCA negatif Çinli meme tümörü hastaları ile yaptıkları vaka-kontrol çalışmasında *PALB2* germ hattı mutasyonlarının dağılımlarını ve etkilerini araştırmışlardır. *PALB2* mutasyonları meme tümörü hastası grubun %0,97'sinde, kontrol grubunun ise %0,19'unda saptanmıştır. *PALB2* mutasyonlarının meme tümörü riskini 5,23 kat artırdığı bildirilmiş, 30 yaş altındaki kadınlarda ise bu risk 10,09 kat olarak hesaplanmıştır. Aile öyküsü, tümör boyutunun büyüklüğü, üçlü negatif meme tümörü, lenf düğümlerine metastazis ve çift taraflı meme tümörü gibi klinik özellikler *PALB2* mutasyonları ile ilişkilendirilmiştir.

Japonya'da Momozawa ve ark. (2018), yaptıkları vaka-kontrol çalışmasında Japon popülasyonu için ailesel meme tümörü ile ilişkili en önemli genlerin *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* ve *TP53* genleri olduğunu bildirmişlerdir. *PALB2* geninde p.G559X varyantının ilk kez bu çalışmada tespit edildiği ve tekrarlayan bir mutasyon olduğu bildirilmiş, bu gende toplamda 21 patolojik varyant tespit edildiği ifade edilmiştir. Kaneyasu ve ark. (2020), güçlü aile öyküsü bulunan, *BRCA1/2* mutasyonları yönünden negatif, Japon ailesel meme ve ovaryum kanseri sendromu hastalarında panel testi ile yatkınlığa neden olan genleri araştırmışlardır. 12 gende fonksiyon kaybına neden olan 38 germ hattı mutasyonu tespit edilmiştir. *PALB2*, *BARD1* ve *BLM* mutasyonlarının sağlıklı popülasyonlar ile karşılaştırıldığında oldukça önemli oldukları bildirilmiştir. *PALB2* geninde bildirilen patolojik ve patolojik olması muhtemel mutasyonların yalnızca meme tümörü vakalarında görüldükleri bildirilmiştir. Bununla birlikte *PALB2* geni için germ hattı mutasyonu tespit edilen bireylerde heterozigotluk kaybı ve somatik mutasyonlar olduğu da (test edilen beş bireyin birinde heterozigotluk kaybı, dördünde somatik mutasyonlar) bildirilmiştir.

Kim ve ark. (2010), Kore’de meme tümörü hastalarında *PALB2* geninde c.1592delT ve c.229delT mutasyonlarını taramış ve ilgili popülasyonda bu mutasyonların görülmediğini bildirmişlerdir.

Singapur’da Wong ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada Asya kökenli bireylerin ailesel meme tümörüne yatkınlıkları panel testi ile araştırılmış, hastaların %30’unda 67 patolojik varyant tanımlanmış; bu varyantlardan altısının *PALB2* geninde bulunduğu (*PALB2* mutasyonları hastaların %9’unda) tespit edilmiştir.

Lolas Hamameh ve ark. (2017), meme tümörü hastası Filistinli kadınlarda yaptıkları çalışmada 11 farklı gende (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *ATM*, *CHEK2*, *BARD1*, *BRIP1*, *PALB2*, *MRE11A*, *PTEN* ve *XRCC2*) mutasyon taramış ve hastalardan birinde *PALB2* geninde mutasyon tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Moradian ve ark. (2021), Ermenistan’daki ailesel meme ve ovaryum kanseri sendromundan şüphelenilen meme tümörü hastalarında germ hattı mutasyonlarının dağılımını araştırmışlardır. Hastaların %58’inde altı gende (*BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2*, *NBN*) 26 patolojik ve altı patolojik olması muhtemel varyant tespit edilmiş, *PALB2* geninde iki patolojik varyant ve etkisi bilinmeyen üç varyant tespit edildiği bildirilmiştir.

Afrika’da yapılan çalışmalara bakıldığında, Sluiter ve ark. (2009) Güney Afrikalı 29-45 yaş aralığında 48 meme tümörü hastası kadında *PALB2* varyantlarını araştırmış, c.697delG ve *in silico* analizlerde patolojik olmadığı görülen p.E211G varyantlarını ilk kez tespit etmişlerdir. c.697delG mutasyonunu taşıyan bireyin İngiliz kökenli olduğu bildirilmiştir. Bunun haricinde çalışmada daha önce tespit edilmiş, biri patolojik olan beş yanlış anlam mutasyonu ve üç intronik varyant tespit edilmiştir. Zheng ve ark. (2018), Nijeryalı meme tümörü hastalarında yaptıkları çalışmada panel testi ile kalıtsal meme tümörü yatkınlığı ile ilişkilendirilebilecek genleri taramış, hastaların %1’inde *PALB2* geninde fonksiyon kaybına neden olan mutasyon tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* ve *TP53* genleri anlamlı derecede meme tümörü riski ile ilişkilendirilmiştir. Adedokun ve ark. (2020),

Uganda ve Kamerunlu kadınlarda meme tümöründe predispozisyona neden olan genlerde germ hattı mutasyonlarının prevalansını araştırmışlardır. *PALB2* geni prevalansı patolojik ve patolojik olması muhtemel mutasyonlar açısından %1 olarak hesaplanmış ve en sık mutasyon tespit edilen dördüncü gen olarak bildirilmiştir.

Southey ve ark. (2010), Avustralya'daki kadın popülasyonunda görülen meme tümörü vakalarında *PALB2* geninde p.W1038X mutasyonunun penetrans ve prevalansını araştırmışlardır. Mutasyon tespit edilen bireylerin aile geçmişlerinde tümör hikayesi bulunmuş ve aynı mutasyonun birden fazla birinci derece veya ikinci derece yakınarda saptandığı bildirilmiştir. Risk oranı %30,1 olarak, 50 yaş için kümülatif risk %49; 70 yaş için ise %91 olarak hesaplanmıştır.

Lattimore ve ark. (2021), Yeni Zelanda'da yaptıkları panel çalışmasında meme tümörü hastalarının %3,5'unda *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* veya *PTEN* genlerinde zararlı mutasyon bulunduğunu bildirmişlerdir. *PALB2* geninde yalnızca p.Q66* varyantı tespit edilmiştir.

Suszynska ve ark. (2019), yaptıkları meta-analizde meme tümörü ve ovaryum tümörü çalışmalarını incelemiştir. İncelenen 48 meme tümörü çalışmasında *PALB2* geninin dahil edildiği 46 panel testi bulunmuştur. Meme tümörü vakaları değerlendirildiğinde mutasyon frekansı en yüksek beşinci genin %8'lik frekansla *PALB2* geni olduğu görülmüştür. Meta-analiz sonucunda *PALB2* geni meme tümörü için yüksek risk grubuna dahil edilmiştir.

PALB2 mutasyonları da *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları gibi meme tümörü vakalarında hastalık yönetimi, tedavi seçimi, kısa dönemli ve hayat boyu risk hesaplanması ve genetik danışmanlık amacıyla etkin biçimde kullanılmakta ve meme tümörünün genetik alt yapısının araştırılması için geliştirilen panellerde özellikle aile hikayesinde meme tümörü vakası bulunan bireylerde rutin olarak kullanılmaktadır (Clifford ve ark., 2016 ve Kwong ve ark., 2016). Frey ve ark. (2017), *PALB2* mutasyonu bulunan bireylerde cerrahi girişim ve tedavi yöntemlerine dikkat çekmiş, manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ve aile hikayesi ışığında profilaktik

mastektomi uygulanabileceği ve ölüm oranlarının kemoterapi ile azaltılabileceğini ifade etmiştir. Rosenthal ve ark. (2017), meme tümörü hastası kadınlarda *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin de dahil olduğu 25 geni kapsayan ailesel kanser panelini kullanmış, bunun yanı sıra meme tümörü ile ilişkili olduğu ortaya konmuş yedi gende (*CDH1*, *PTEN*, *STK11*, *TP53*, *ATM*, *CHEK2* ve *PALB2*) de patolojik varyantları taramışlardır. *ATM*, *CHEK2* ve *PALB2* genlerinde tespit edilen varyantların *BRCA1* ve *BRCA2* yönünden negatif olan bireylerin %94,8'ini oluşturduğu bildirilmiş, hayat boyu meme tümörü riski %20'nin üzerinde hesaplanan kadınlardan %1,2'sinin patolojik varyant taşıdığı, bu hastaların %26,9'unda *PALB2* geni varyantı olduğu bildirilmiştir. MRG gerektiren hastaların oranında bu genlerin (*ATM*, *CHEK2* ve *PALB2*) kontrol edilmesi sonucunda %68'lik bir artış görüleceğini ve panellere bu genlerin dahil edilmesi gerektiği ifade edilmiştir. Manahan ve ark. (2019), *ATM*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBN*, *NF1*, *PALB2* ve *STK11* genlerinde mutasyon tespit edilen meme tümörü hastalarında gelişmiş tarama yapılması gerektiğini bildirmiş, güçlü bir aile hikayesi bulunmayan hastalarda mastektomiye desteklememiş ancak yıllık tarama, MRG ve tomosentez mamografi yapılmasını önermiştir. Teoh ve ark. (2020) ise tek taraflı meme tümörü görülen hastalarda *PALB2* genindeki mutasyonların iki memede de risk teşkil etmesi nedeniyle profilaktik mastektomi önerilmesine ilişkin herhangi bir veri bulunmadığını bildirmişlerdir.

Yalnızca kadınlarda değil, erkeklerde de meme tümörüne yatkınlıkta *PALB2* germ hattı mutasyonlarına ilişkin yapılmış çalışmalar mevcuttur (Ding ve ark., 2011a; Scarpitta ve ark., 2019; Silvestri ve ark., 2010 ve Tedaldi ve ark., 2020) ancak tez konusu erkek bireyleri kapsamadığı için bu çalışmalara değinilmemiştir. Ayrıca, yapılan araştırmalar arasında yalnızca *PALB2* mutasyonlarının taranması yönelik çalışmalar değil, aynı zamanda promotor bölgesi metilasyonu (Scott ve ark., 2016), *PALB2* gen ifadesinin prognoza yönelik araştırılması (Li ve ark., 2018 ve Pereira-Veiga ve ark., 2019) gibi çalışmalar da mevcuttur.

İnsan meme tümörü vakalarında *PALB2* geni mutasyonlarının etkilerine ilişkin yapılmış çalışmalar özetlendiğinde; *PALB2* geninde tespit edilmiş birçok varyant bulunduğu, bu varyantların bazılarının patolojik, bazılarının patolojik olması

muhtemel varyantlar olduğu ve bir kısmının ise etkisinin bilinmediği bildirilmiştir. Farklı popölasyonlarda yapılan çalışmalarda, *PALB2* mutasyonlarının bazı popölasyonlarda sık görölmesine karşın, bazı popölasyonlarda hiç görölmemesi dikkat çekmektedir. Benzer şekilde, meme tümörü riskinin hesaplandığı çalışmalar göz önüne alındığında, *PALB2* geninin bazı popölasyonlarda meme tümörü için orta dereceli risk teşkil eden genlerden biri olduğu, yapılan son çalışmalara ve meta-analizlere göre ise yüksek derecede risk oluşturan genler arasında bulunduğu görölümüştür.

Tez alışması, *PALB2* geni *WD40* domaininde meydana gelen germ hattı mutasyonlarının HR mekanizması üstünden KMT vakalarının gelişimi ve malignitesinde etkili olabileceği hipotezi üstüne kurulmuştur. Bu amaçla KMT hastası bireyler ve sağlıklı kontrolde *PALB2* geni *WD40* domainini kodlayan bölgeler DNA dizi analizine tabi tutularak tespit edilen varyantların KMT gelişimi ve malignitesine etkilerinin *in silico* analizlerle araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında yalnızca KMT vakaları ele alınmamış, *PALB2* varyantlarının insan ve köpek türlerinde karşılaştırılması ile karşılaştırmalı onkoloji alanında bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda HR mekanizmasında *PALB2* proteini ile doğrudan etkileşime geçen *BRCA2* ve *RAD51* proteinlerine ilişkin veriler de değerlendirilerek HR mekanizmasında görevli bu üç proteinde tespit edilen mutasyonların KMT hastası bireylerdeki kümülatif etkileri araştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nın 06.02.2013 tarihli, 2013/01 toplantı sayılı, 02 karar numaralı onayı ile gerçekleştirilen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiş VF1311 kodlu projede kullanılan örneklemden seçilen KMT (n=20) ve sağlıklı (n=1) bireylere ait kan örnekleri Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 17.07.2018 tarihli, 2018-15-94 numaralı izni ile kullanılmıştır.

Tez önerisinde sağlıklı birey sayısı üç olarak bildirilmesine karşın, iki sağlıklı bireyde (33 ve 35 numaralı bireyler) fibroadenoma ve lipoma vakaları görüldüğü tespit edilmiş, Tez İzleme Komitesi'nin onayı ile bu iki birey örneklem dışı bırakılarak çalışmaya bir sağlıklı birey ile devam edilmiştir.

Örnekleme dahil edilen KMT'li bireylerin seçiminde Türkiye'de KMT'ye ilişkin yapılmış çalışmalar göz önünde bulundurulmuştur (Atalay Vural ve Aydın, 2001; Erer ve Kıran, 1993 ve Gülçubuk ve Gürel, 2003). Özmen ve ark. (2017a;b)'nın *BRCA2* ve *RAD51* genlerinde buldukları varyantlar da dikkate alınarak örneklem oluşturulmuştur. Örnek dağılımı ve bireylere ait bilgiler Çizelge 2.1 ve 2.2'deki gibidir.

Çizelge 2.1. Örneklerin dağılımı.

Çalışmada İncelenen Tümör Tipleri ve Birey Sayıları		
Sağlıklı (n=1)	Benign Tümör (n=7)	Malign Tümör (n=13)
Polimorfizmlerin validasyonu; 32 no'lu birey	Benign miks tümör (n=3); 26, 29, 30 no'lu bireyler	Malign miks karsinoma (n=3); 16, 17 ve 20 no'lu bireyler
	Papiller kistik adenoma (n=2); 22, 24 no'lu bireyler	Kompleks adenokarsinoma (n=2); 1, 21 no'lu bireyler
	Fibroadenoma (n=2); 25, 31 no'lu bireyler	Karsinosarkoma (n=2); 2, 3 no'lu bireyler
		Solid karsinoma (n=2); 5, 11 no'lu bireyler
		Anaplastik karsinoma (n=2); 6, 12 no'lu bireyler
		Tübüler adenokarsinoma (n=2); 10, 13 no'lu bireyler

Çizelge 2.2. Seçilen KMT vakalarına ilişkin bilgiler.

Vaka Kodu	İrk	Yaş	Tümör Tipi	Histolojik Derece	Akciğer Metastazisi	Kısırlaştırma Durumu
1	<i>Golden retriever</i>	13	Kompleks adenokarsinoma	II	-	-
2	Melez	9	Karsinosarkoma	II	-	-
3	<i>Rottweiler</i>	12	Karsinosarkoma	III	+	-
5	<i>Tibetan terrier</i>	12	Solid karsinoma	II	-	+
6	<i>Pinscher</i>	15	Anaplastik karsinoma	III	-	-
10	<i>Tibetan terrier</i>	13	Tubuler adenokarsinoma	I	-	-
11	<i>Rottweiler</i>	13	Solid karsinoma	II	-	-
12	<i>Tibetan terrier</i>	7	Anaplastik karsinoma	III	+	-
13	<i>Golden retriever</i>	11	Tubuler adenokarsinoma	I	-	-
16	Melez	13	Malign miks karsinoma	II	-	-
17	<i>English setter</i>	9	Malign miks karsinoma	II	-	-
20	Kangal	8	Malign miks karsinoma	II	+	-
21	<i>Golden retriever</i>	12	Kompleks adenokarsinoma	II	-	-
22	<i>Boxer</i>	6	Papiller kistik adenoma	-	-	-
24	<i>Husky</i>	10	Papiller kistik adenoma	-	-	-
25	<i>Yorkshire terrier</i>	8	Fibroadenoma	-	-	-
26	<i>Tibetan terrier</i>	16	Benign miks tümör	-	-	-
29	Melez	7	Benign miks tümör	-	-	-
30	<i>Tibetan terrier</i>	9	Benign miks tümör	-	-	+
31	<i>English cocker spaniel</i>	10	Fibroadenoma	-	-	-

Bu çalışmada KMT hastası ve sağlıklı bireylere ait kan örneklerinden DNA izolasyonları yapılmış, *PALB2* geninin BRCA2 ve RAD51 proteinleri ile etkileşime geçtiği fonksiyonel bölge olan *WD40* domainini kodlayan ekzon 6, ekzon 7, ekzon 8, ekzon 9, ekzon 10, ekzon 11, ekzon 12'nin tamamı ve ekzon 13'ün bir kısmı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile yükseltgenmiş ve ABI*Prism* 310 genetik analizör platformunda Sanger DNA dizileme metodu ile DNA dizileri elde edilmiştir.

Proje kapsamında bulunmamasına karşın, elde edilen verilerin güçlendirilmesi amacıyla HR mekanizmasında *PALB2* proteini *WD40* domaini ile etkileşime geçen BRCA2 proteininin ekzon 2 ve ekzon 3 bölgelerinin bir kısmı tarafından kodlanan 21-39 amino asitleri arasındaki fonksiyonel bölgesi DNA dizi analizine tabi tutulmuştur.

DNA dizi analizlerinden elde edilen veriler biyoinformatik analizler için hazırlanmış, ardından protein yapısı ve fonksiyonuna ilişkin verilerin elde edilebilmesi amacıyla *in silico* analizleri yapılmış ve projenin hedefleri kapsamında karşılaştırmalı onkoloji alanına katkı sağlamak için insanlardaki benzer varyasyonlar ile karşılaştırılmıştır.

2.1. DNA İzolasyonu, DNA Kalite ve Kantitesi ile Bütünlüğün Kontrolü

VF1311 numaralı çalışmadan kalan DNA örnekleri spektrofotometre (*Nanodrop2000, Thermo*) ile kontrol edilmiştir. DNA yoğunluklarının düşük olması ve sekiz farklı reaksiyon için gerekmeleri nedeni ile KMT vakalarına (n=20) ait kanlardan tekrar DNA izolasyonu yapılmış, tüm aşamalar ticari kit (*Qiagen, Blood and Tissue DNA extraction kit, Hilden, Germany*) protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

DNA kalitesi ve kantitesi spektrofotometre (*Nanodrop2000, Thermo*) ile ölçülmüştür. DNA bütünlüğü ise Tris Borik Asit EDTA (TBE) çözeltisi içinde *SYBRTM Safe Gel Stain (Thermo Fisher)* ile boyanmış %1'lik agaroz jele 1 mikrolitre (µl) 2X *loading dye (Thermo Fisher)*-2µl DNA yüklenerek, 1 kilobazlık (kb) *ladder* ile, 80 Volt elektrik akımına tabi tutularak, 25-30 dakika yürütülerek görüntülenmiştir (*Kodak Gel Logic 2200 Imaging System*). Sonrasında her bir primer çifti için PZR işlemlerine geçilmiştir.

2.2. Gen Bölgelerinin Yükseltgenmesi ve Saflaştırılması

Yükseltgenecek bölgeler 257 ve 550 baz çifti (bç) uzunluğunda olduğu için standart bir DNA polimeraz enzimi seçilmiştir (*Taq DNA Polymerase, recombinant (5U/µl) 500 units, Thermo Fisher*). Çalışılacak bölgelere özgü primerler *PALB2* geni referans dizisi (ENSCAFG00000030772) ve *BRCA2* geni referans dizisi

(ENSCAFG00000006383) kullanılarak *Primer-BLAST* web aracında tasarlanmıştır. *Primer-BLAST* aracında bölgeye özgü olup olmadıkları, *IDT OligoAnalyzer* aracında ise dimer ve heterodimer yapıları ile saç tokası yapısı oluşturup oluşturmadıkları kontrol edilerek primer çiftlerinin bölgeleri yükseltgemek için uygun olduklarına karar verilmiştir. Primerler 50 nanomol (nm) sentez skalasında *desalting* saflaştırma metodu ile sipariş edilmiştir.

Farklı sıcaklık ve $MgCl_2$ konsantrasyonları ile *gradient* PZR kurularak her bir primer çifti için optimum çalışma koşulları tespit edilmiştir. Tasarlanan oligonükleotitler ve yükseltgedikleri bölgeler Çizelge 2.3'te görülmektedir.

Çizelge 2.3. *PALB2* geni *WD40* domainini ve *BRCA2* geni etkileşim bölgesini kodlayan bölgelerin yükseltgenmesi amacıyla tasarlanmış primer setleri.
bç: baz çifti.

Primer ismi	Gen	Primer dizisi (5'-3' yönünde)	Amplikon uzunluğu	Bölge
WD40D1_F	<i>PALB2</i>	GATGATGAATGAGCAATGCAGGA	257 bç	Ekzon 6 parsiyel, intron 6 parsiyel
WD40D1_R	<i>PALB2</i>	AGAATGAGGGGAACGCCTG		
WD40D2_F	<i>PALB2</i>	GAAACAGATCCCAAGTATGGCTTT	280 bç	İntron 6 parsiyel, ekzon 7, intron 7 parsiyel
WD40D2_R	<i>PALB2</i>	TGCCCAGCGACATTACCAT		
WD40D3_F	<i>PALB2</i>	AGAGGATGCTGAACTTTCTCA	319 bç	İntron 7 parsiyel, ekzon 8, intron 8 parsiyel
WD40D3_R	<i>PALB2</i>	AAACCTACTTTACAACCTGCACT		
WD40D4_F	<i>PALB2</i>	TGAAAAGGCTTACTCCTGAT	302 bç	İntron 8 parsiyel, ekzon 9, intron 9 parsiyel
WD40D4_R	<i>PALB2</i>	CCTAAAGCCCAGAAAAACAA		
WD40D5_F	<i>PALB2</i>	AAGGCAAGGGCTGCTTAGAA	289 bç	İntron 9 parsiyel, ekzon 10, intron 10 parsiyel
WD40D5_R	<i>PALB2</i>	CCCCCAAACAGTCATATTACAGTC		
WD40D6_F	<i>PALB2</i>	TTCTCCCTTGGTCACTTCCT	259 bç	İntron 10 parsiyel, ekzon 11, intron 11 parsiyel
WD40D6_R	<i>PALB2</i>	CAGTGGGACCATTAGCAACA		
WD40D7_F	<i>PALB2</i>	ACCCTTTGTTTTCCCCACCG	269 bç	İntron 11 parsiyel, ekzon 12, intron 12 parsiyel
WD40D7_R	<i>PALB2</i>	TTGCACACGTGCCTTCCA		
WD40D8_F	<i>PALB2</i>	CAGGGACTGGACACATGATTGC	550 bç	İntron 12 parsiyel, ekzon 13 parsiyel
WD40D8_R	<i>PALB2</i>	TGGTGCCACTACCATCAGAA		
E2_F	<i>BRCA2</i>	TGCATCCCTGTGAAGTGTATT	240 bç	Ekzon 2, intron 2 parsiyel
E2_R	<i>BRCA2</i>	ATGTTGGCTTCTTTTCAGCAA		
E3_F	<i>BRCA2</i>	ACAGATTGAAAGGAGAATAGGTT	279 bç	İntron 2 parsiyel, ekzon 3 parsiyel
E3_R	<i>BRCA2</i>	GGTTTGGTTCATAGCTGATTTT		

PZR reaksiyonlarında kullanılan kimyasalların konsantrasyonları ve PZR protokolü çizelge 2.4 ve çizelge 2.5'te görülmektedir. PZR reaksiyonları her bir primer çifti için ısı-döngü cihazında (*Mastercycler epgradient, Eppendorf*) gerçekleştirilerek agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur.

Çizelge 2.4. PZR'larda kullanılan kimyasalların konsantrasyon ve miktarları.

Kimyasal	Stok Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Miktar (Hacmen)
10X Buffer (KCl içeren)	10X	1X	2,5 µl
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2,5 µl
dNTP	10 mM	200 µM	0,5 µl
İleri yönlü primer	10 pikamol/µl	0,2 pikamol/µl	0,5 µl
Geri yönlü primer	10 pikamol/µl	0,2 pikamol/µl	0,5 µl
Taq polimeraz	5IU/µl	0,06IU/µl	0,3 µl
Kalıp DNA	13,7-45,2 ng/µl	1-3,6 ng/µl	2 µl
Toplam	25 µl'ye tamamlayacak hacimde ddH ₂ O eklenir		

Çizelge 2.5. PZR reaksiyonları için ısı-döngü cihazı protokolü.

Aşama	Sıcaklık	Süre	
Başlangıç denatürasyonu	94°C	4 dk	
Denatürasyon	94°C	15 sn	X39 döngü
Primer bağlanması	53-62°C*	20 sn	
Zincir uzaması	72°C	30 sn	
Son uzama	72°C	2 dk	

*WD40D1 için 59°C; WD40D2 için 58°C; WD40D3 için 62°C; WD40D4 için 53°C; WD40D5 için 62°C; WD40D6 için 57°C; WD40D7 için 59,5°C; WD40D8 için 59°C; E2 ve E3 için 56°C.

PZR ürünleri Tris Borik Asit EDTA (TBE) çözeltisi içinde *SYBRTM Safe Gel Stain (Thermo Fisher)* ile boyanmış %2'lik agaroz jele 2µl 2X loading dye (*Thermo Fisher*)-2µl DNA yüklenerek, 100 bç ladder ile, 120 Volt elektrik akımına tabi tutularak, 20 dakika yürütülerek görüntülenmiştir (*Kodak Gel Logic 2200 Imaging System*).

PZR ürünleri Zincir sonlandırma reaksiyonu öncesinde İzopropanol Presipitasyonu ile PZR sonrası saflaştırmaya tabi tutulmuştur. Saflaştırma protokolünün aşamaları aşağıdaki gibidir;

1. Bilinen hacimde PZR ürününe 1/5 hacimde 3M sodyum asetat eklenir.
 2. PZR ürünü hacminin %80-100'ü oranında izopropanol eklenir.
 3. Ürünler 15 dakika boyunca -80°C'de bekletilir.
 4. 20 dakika boyunca maksimum devirde santrifüj uygulanır.
 5. Süpernatant dikkatlice pipetasyonla uzaklaştırılır, bu aşamada PCR ürünü görmek zor olabilir.
 6. Tuzları uzaklaştırmak için pelet %70'lik etanol ile yıkanır (PZR ürünü 200 bç'den kısa ise %95'lik etanol kullanılır).
 7. Santrifüj işlemi tekrarlanır (adım 4 ve adım 5).
 8. PZR ürünü su veya tercih edilen çözelti içinde çözündürülür.
- İzopropanol ile PZR ürünlerinin saflaştırılmasının ardından ürünler zincir sonlandırma reaksiyonlarına tabi tutulmuştur.

2.3. Zincir Sonlandırma Reaksiyonları

Zincir sonlandırma reaksiyonları WD40D8 primer çifti haricinde Çizelge 2.3'teki primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. WD40D8_F ve WD40D8_R primerleri ile yapılan zincir sonlandırma reaksiyonları çoklu adenin ve timin bölgeleri nedeniyle düzgün şekilde okunamadığından *PALB2* genine ait ekzon 13 için yeni ileri ve geri primerler sentezlenmiştir (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.6 Ekzon 13 için tasarlanan sekans primerleri.

Primer ismi	Primer dizisi (5'-3' yönünde)
WD8_SeqF	GATCATTTTGCAGCCGCAGT
WD8_SeqR	GCTGTGTTTTTCATATCAGTAGCGG

Her bir PZR ürünü; Çizelge 2.7'deki protokole göre dilue edilerek hazırlanan *mastermix* protokolü ile Çizelge 2.8'deki ısı-döngü cihazı protokolüne uygun olarak yükseltgenmiştir.

Çizelge 2.7. BigDye reaksiyonu için *mastermix* protokolü.

Kimyasal	Stok Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Miktar
BigDye premix	2,5X	0,25X	1 µl
5X Buffer	5X	1X	2 µl
Primer	3,2 pmol/µl	0,64 pmol/µl	2 µl
PZR ürünü	100-250 ng/µl	20-50 ng/µl	2 µl*
Toplam	10 µl'ye tamamlayacak hacimde ddH ₂ O eklenir		

*Genellikle 2µl kullanılmakla birlikte, ürün hacmi agaroz jel elektroforezindeki görüntülerine göre kullanılmıştır.

Çizelge 2.8. BigDye reaksiyonu için ısı-döngü cihazı protokolü.

Aşama	Sıcaklık	Süre	
Başlangıç denatürasyonu	96°C	1 dk	
Denatürasyon	96°C	10 sn	X25 döngü
Primer bağlanması	50°C	5 sn	
Zincir uzaması	60°C	4 dk	

Yükseltgenen ürünler daha sonra ticari kit protokolü (*Zymo DNA sequencing clean-up kit*) ile sekans öncesi kolon temelli saflaştırma işlemine tabi tutulmuş ve genetik analizöre yüklenmiştir. *Zymo DNA sequencing clean-up kit* ile yapılan saflaştırma işleminde kullanılan modifiye edilmiş protokol aşağıdaki gibidir;

1. 5-20 µl PZR ürününe 240 µl *Binding Buffer* eklenerek pipete edilir ve toplama tüplerine yerleştirilen kolonlara yüklenir.

2. Kolonlar 30 saniye boyunca 13 000 rpm devirde santrifüj edilir.
3. Kolonların üzerine 180 µl *Wash Buffer* eklenir ve 30 saniye boyunca 13 000 rpm devirde santrifüj edilir.
4. Kolonlar yeni toplama tüplerine aktarılır ve membranlarının kuruması için yaklaşık 1 dk boyunca beklenir.
5. Kolonlara 60 µl distile su konularak 15 saniye boyunca 13 000 rpm devirde santrifüj edilir.
6. Tüpte toplanan sıvı sekans tüpüne aktarılarak *ABIPrism310* cihazına yüklenir.

2.4. Kapiller Jel Elektroforezi

Her bir örneğin iki yönlü dizilemeleri *ABIPrism310* cihazında, 37 cm'lik kapiller kullanılarak yapılmıştır. DNA dizileme işlemleri sırasında 310 Data Collection Software-Version 3.1.0 yazılımı kullanılmış; örnekler “Pop6 Rapid E modülü (1ml)” seçilerek, değişen enjeksiyon süreleri, akımları ile yükseltgenen bölgenin uzunluğuna göre farklı sürelerde yürütülerek dizilenmiştir. Değişen enjeksiyon süreleri, akımları ve yürütme süreleri Çizelge 2.9'daki gibidir.

Çizelge 2.9. Kapiller jel elektroforezinde kullanılan enjeksiyon süreleri, akımı ve yürütme süresi bilgileri.

Primerler	Enjeksiyon süresi	Enjeksiyon akımı	Yürütme süresi
WD40D1 F ve R	20 sn	3 kV	22 dk
WD40D2 F ve R	25 sn	3 kV	22 dk
WD40D3 F ve R	20 sn	2 kV	23 dk
WD40D4 F ve R	20 sn	3 kV	24 dk
WD40D5 F ve R	18 sn	3 kV	23 dk
WD40D6 F ve R	20 sn	3 kV	22 dk
WD40D7 F ve R	20 sn	3 kV	23 dk
WD8 Seq F ve R	30 sn	4 kV	28 dk
E2 F ve R	25 sn	3 kV	21 dk
E3 F ve R	25 sn	3 kV	20 dk

Elde edilen ham veriler *Sequencing Analysis 5.3.1* yazılımı ile kullanılan kapillerin boyutu, *BigDye terminator* versiyonu ve DNA dizi analizi için kullanılan matriks dosyası seçilerek görsel hale getirilmiştir.

2.5. Elektroferogramların Kontrolü ve Hazırlanması

DNA dizilerinin hizalanması ve polimorfizmlerin saptanması amacıyla *BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.2.5 (BioEdit, Carlsbad, USA)* yazılımı kullanılmıştır. Elde edilen diziler köpek *PALB2* referans dizileri ile (ENSCAFT00000049192.1 ve ENSCAFG00000030772) ve *BRCA2* referans dizileri ile (ENSCAFG00000006383 ve ENSCAFT00000010309.4) karşılaştırılmıştır.

Elektroferogramlar göz ile kontrol edilerek hatalı atanan nükleotitler düzeltilmiş, “*Cap Contig Assembly*” aracı kullanılarak aynı örneğe ait ileri ve geri diziler birleştirilmiştir. Elde edilen diziler referans diziler ile “*ClustalW Multiple Alignment*” aracı kullanılarak hizalanmış, kırılmış ve nükleotit varyantları tespit edilmiştir. Ekzon ve intron bölgeleri belirlenmiş, protein sentezinde görevli bölgelerdeki olası amino asit değişiklikleri tespit edilmiştir.

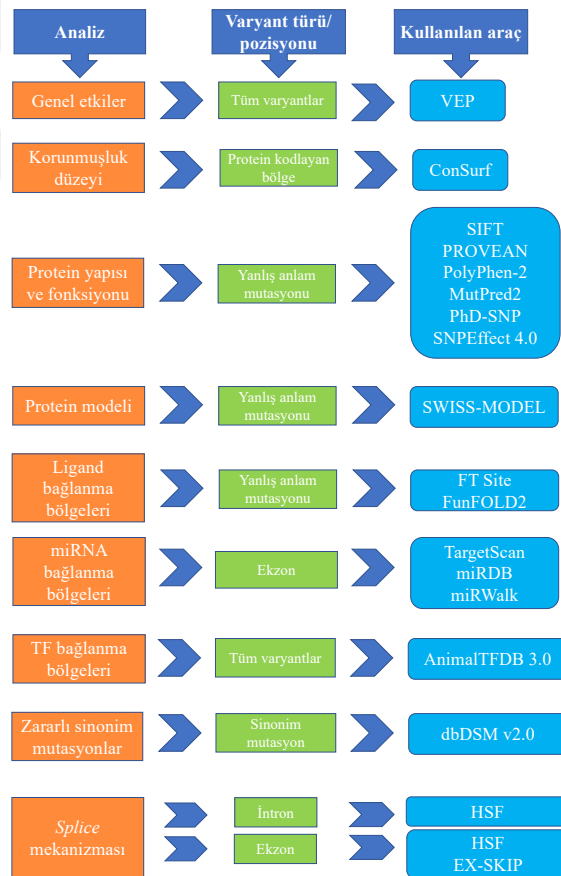
2.6. Biyoinformatik Analizler

Tespit edilen mutasyonların etkilerinin araştırılması için mutasyon türüne bağlı olarak Çizelge 2.10’da görülen *in silico* analizler gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.10. Varyant türleri için kullanılan *in silico* analizler.

Varyant türü	Kullanılan Araçlar
Yanlış anlam mutasyonu	VEP, ConSurf, SIFT, PROVEAN, PolyPhen-2, MutPred2, PhD-SNP, SNPEffect 4.0, SWISS-MODEL, FTSite Binding Site Prediction, FunFOLD2, TargetScan, miRDB, miRWalk, AnimalTFDB3.0, Human Splicing Finder, EX-SKIP
Sinonim mutasyon	VEP, ConSurf, TargetScan, miRDB, miRWalk, AnimalTFDB3.0, dbDSM v2.0, Human Splicing Finder, EX-SKIP
İntronik varyant	VEP, AnimalTFDB3.0, Human Splicing Finder
3'UTR varyantı	VEP, TargetScan, miRDB, miRWalk, AnimalTFDB3.0, Human Splicing Finder, EX-SKIP

Biyoinformatik analizlerde yapılan araştırmalar, ilgili varyant türleri ve kullanılan araçlar Şekil 2.1’de görüldüğü gibidir.



Şekil 2.1. Biyoinformatik analiz basamakları ve kullanılan araçlar.

Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) yazılımı büyük ve küçük ölçekli analiz çalışmalarında tekli nükleotit varyantları, kısa insersiyon ve delesyonlar, kopya sayısı değişiklikleri ve yapısal değişikliklerde transkriptler, düzenleyici bölgeler, daha önce gözlemlenen varyantların frekansları, yayınlar, klinik önem bilgileri ve varyantların biyofiziksel sonuçlarının tahminleri dahil olmak üzere çok çeşitli referans verilerini kullanarak varyantları açıklamaktadır (McLaren ve ark., 2016). VEP aracına (<https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>) web adresinden erişim sağlanabilmektedir. DNA dizi analizi ile tespit edilen tüm varyantlara ilişkin bilgiler varyant pozisyonları girilerek VEP aracında ayrıntılı olarak incelenmiş, bu araç aynı zamanda köpek türünde tespit edilen varyantların insan türü ile karşılaştırılmasında ve tümör oluşumu ile olası ilişkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır.

ConSurf sunucusu, yapı ve işlev için önemli olan bölgeleri ortaya çıkarmak için makromoleküle ait amino asitlerin veya nükleik asitlerin evrimsel modelini analiz eder. Analiz edilmek istenen diziden veya yapıdan başlayarak, homolog dizileri otomatik olarak toplar, çoklu dizi hizalamalarını çıkarır ve evrimsel ilişkilerini yansıtan bir filogenetik ağaç oluşturur. Bu veriler daha sonra, her dizi pozisyonunun evrimsel oranlarını tahmin etmek için olasılık çerçevesi içinde kullanılır. Evrimsel hız farklılıklarının araştırılması, yapı analizi ve tahmini, mutasyonların yorumlanması ve tasarımı, doğal peptitlerin tanımlanması, sistemler ve genom çapında çalışmalar ve son ortak ataya ilişkin çalışmalar dahil olmak üzere çeşitli araştırmalarda kullanılmaktadır. Bu sunucuya (<https://consurf.tau.ac.il>) web adresinden erişim sağlanabilmektedir. PALB2 proteinine (UniprotKB: J9NVL4) ait yabancı tip protein dizisi *fasta* formatında *ConSurf* sunucusuna girilmiş ve proteine ait amino asit dizilerinin korunmuşluk düzeyi tespit edilmiştir (Ashkenazy ve ark., 2016).

DNA dizi analizi sonucunda tespit edilen yanlış anlam mutasyonlarının protein yapısı ve fonksiyonuna olan etkileri *SIFT* (Kumar ve ark., 2009), *PROVEAN* (Choi ve Chan, 2015), *PolyPhen-2* (Adzhubei ve ark., 2010), *MutPred2* (Pejaver ve ark., 2020), *PhD-SNP* (Capriotti ve ark., 2006), *SNPEffect 4.0* (De Baets ve ark., 2012) araçları ile tespit edilmiştir.

SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) aracı bir amino asit değişikliğinin etkisini değerlendirmek için bir protein dizisindeki önemli pozisyonların evrimsel süreçte korunmuş olduğunu ve bu nedenle ilgili pozisyonlardaki amino asit değişikliklerinin protein fonksiyonunu etkileyebileceğini varsayar. Dizi homolojisini kullanarak protein dizisindeki her bir pozisyonda tüm olası değişikliklerin etkilerini tahmin etmekte kullanılır. (<https://sift.bii.a-star.edu.sg>) *web* adresinden bu araca erişim sağlanabilmektedir. *SIFT* aracında “*Single Protein Tools*” başlığı altındaki “*SIFT Sequence*” bölümüne yabancı tip proteine ait amino asit dizisi *fasta* formatında girilmiş ve yanlış anlam mutasyonunun etkilerinin “*UniProt-SwissProt_2010_09*” veri tabanlarında “*Median sequence conservation*” değeri 4,32 olacak şekilde araştırılması istenmiştir. *SIFT* algoritmasında eşik değeri 0,05’tir ve bu değerin altında kalan değerlere sahip varyantlar protein fonksiyonunu etkileyen “*deleterious*”; yani zararlı varyantlar olarak değerlendirilmektedir (Kumar ve ark., 2009).

PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) insan ve insan türüne ait olmayan protein dizilerinde tek veya çoklu amino asit değişiklikleri ve okuma çerçevesi içi insersiyon ve delesyonlar dahil olmak üzere protein dizisi varyasyonlarının fonksiyonel etkilerinin tahmini için geliştirilmiş bir algoritmadır (Choi ve ark., 2012). Kullanılan üç araçtan biri olan “*PROVEAN Protein*” aracının birincil işlevi, herhangi bir organizmadan kaynaklanan bir protein dizisi için bir tahmin sağlamaktır. Araç girdi olarak bir protein dizisini ve amino asit varyasyonlarını kabul eder, homolog dizileri tanımlamak için bir *BLAST* araması yapar ve *PROVEAN* puanları üretir. Araca (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php) *web* adresinden erişim sağlanabilmektedir. *PROVEAN* aracına *fasta* formatındaki yabancı tip protein dizisi ve yanlış anlam mutasyonuna ilişkin amino asit pozisyonu girilerek değişikliklerin protein fonksiyonuna etkilerinin araştırılması istenmiştir. *PROVEAN* skoru -2,5’tan düşük skorlar zararlı olarak, daha yüksek skorlar ise nötral olarak nitelendirilmektedir (Choi ve Chan, 2015).

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) sunucusu basit fiziksel ve evrimsel karşılaştırmalı değerlendirmeleri kullanarak amino asit değişikliklerinin insan proteinlerinin yapısı ve işlevi üzerindeki olası etkisini tahmin eden bir yazılım aracıdır.

HumDiv veri seti *UniProt* veri tabanında insanlarda Mendel kalıtımı gösteren hastalıklara neden olan ve protein stabilitesi veya işlevinin etkilendiği insan proteinleri ve bunlarla yakından ilişkili memeli homologları ile zarar vermediği varsayılan zararlı alleller derlenerek oluşturulmuştur. *HumVar3* veri seti ise *UniProt* veri tabanında insanlarda hastalığa neden olan tüm mutasyonlar ve insanlarda zararsız olarak ele alınan, hastalıkla ilişkilendirilmemiş sinonim olmayan tekli nükleotit polimorfizmlerinden oluşturulmuştur. Araç sinonim olmayan varyantların fonksiyonel etkilerini *Possibly Damaging* (zararlı olabilir) ve *Probably Damaging* (zararlı olma ihtimali oldukça yüksek) ya da *Benign* (iyi huylu) olarak nitelendirmektedir. *Probably Damaging* ifadesi *Possibly Damaging* ifadesinden daha kuvvetli bir ifadedir ve fonksiyonel etkinin zararlı olabileceği ihtimalinin daha kuvvetli olduğunu belirtir. (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) web adresinden bu araca erişim sağlanabilmektedir. *PolyPhen-2* sunucusuna yabancı tip protein dizisi *fasta* formatında yüklenmiş, varyant pozisyonu ve rezidü değişikliğine ilişkin bilgiler sisteme girilmiş ve substitüsyonun etkilerinin araştırılması istenmiştir. Sinonim olmayan varyantların fonksiyonel etkileri “*Possibly Damaging*” ve “*Probably Damaging*” (PSIC>0,5) ya da “*Benign*” (PSIC<0,5) olarak değerlendirilmektedir. “*Probably Damaging*” ifadesi “*Possibly Damaging*” ifadesinden daha kuvvetli bir ifadedir ve fonksiyonel etkinin zararlı olabileceği ihtimalinin daha kuvvetli olduğunu belirtir (Adzhubei ve ark., 2010).

MutPred2 makine öğrenimine dayalı, amino asit değişikliklerinin patojenitesi hakkında olasılıksal olarak tahmin yürütmek için genetik ve moleküler verileri bütünleştiren bir yazılım paketidir. Bu tahminler sadece patojenite ve moleküler değişiklik skorlarının yorumlanmasını kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda altta yatan mekanizmaları titizlikle sıralamak için bir çerçeve sağlar. *MutPred2*, ikincil yapı, sinyal peptidi ve transmembran topolojisi, katalitik aktivite, makromoleküler bağlanma, translasyon sonrası modifikasyonlar, metal bağlama ve allosteri dahil olmak üzere çok çeşitli yapısal ve fonksiyonel özellikleri modeller. (<http://mutpred.mutdb.org/>) web adresinden *MutPred2* yazılımına erişim sağlanabilmektedir. Yabancı tip proteine ait amino asit dizisi *fasta* formatında varyant bilgileri eklenerek *MutPred2* sistemine girilmiş ve sonuçları araştırılmıştır. MutPred

uygulamasında varyantın patojenite ve fenotipe etkilerinin hesaplanabilmesi için eşik değeri 0,05'tir (Pejaver ve ark., 2020).

Predictor of Human Deleterious Single Nucleotide Polymorphisms (PhD-SNP) uygulaması protein sekansı ve profil bilgileri üzerine geliştirilmiş ve test edilmiş tek bir destek vektör makinesine dayalı tahmin edici bir araçtır. Araç, sekans temelli metot, hibrit metot, sekans ve profil temelli metotlar ile tahminde bulunmaktadır. Sekans temelli metotta destek vektör makinesi hastalıkla ilişkili mutasyonlara 0, nötral mutasyonlara ise 1 değerlerini atar ve karar eşiğini 0,05 olarak belirler. Profil temelli metot mutasyonları hastalık ve nötral polimorfizm olarak sınıflandırır. Hastalık, *BLAST* programı çıktısında ilgili pozisyonda mutasyona uğramış rezidüye karşı yabancı allelin frekansının oranıdır. Nötral polimorfizm ise eldeki mutasyona göre hizalanmış dizilerin sayısıdır. Hibrit metot sekans temelli metot ve profil temelli metotlar kullanılarak oluşturulan bir karar ağacını temel alarak tahmin yürütür. Uygulamaya (<https://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html>) web adresinden erişim sağlanabilmektedir. *PhD-SNP* aracına yabancı tip diziye ait amino asitler yalnızca rezidüler olacak şekilde girilmiş; varyant pozisyonu ve oluşan yeni rezidü ilgili kısımlara yazılarak sekans temelli metot, hibrit metot, sekans ve profil temelli metotlar kullanılarak sonuçların araştırılması istenmiştir (Capriotti ve ark., 2006).

SNPEffect 4.0 web tabanlı programı, protein kodlayan bölgelerdeki sinonim olmayan tekli nükleotit varyantlarının proteinlerin yapısal fenotiplerini nasıl etkileneceğini dizi temelli ve yapısal temelli yöntemler ile tahmin eder. Protein yapısında meydana gelen amino asit değişikliklerinin proteinin agregat oluşturmaya yatkınlığı (*TANGO*), amiloid oluşturmaya yatkınlığı (*WALTZ*), şaperon bağlama eğilimi (*LIMBO*) ve proteinin yapısal stabilitesine olan etkilerini analiz eder. Sisteme araştırılmak istenen mutasyon bildirilerek *TANGO*, *WALTZ* ve *LIMBO* değerleri hesaplanır. *TANGO* tahmininde $dTANGO > 50$ agregasyon eğiliminde artış; ($dTANGO < -50$) ise agregasyon eğiliminde düşüşü ifade eder. *WALTZ* tahmininde $dWALTZ > 50$ amiloid oluşumuna yatkınlıkta artış, $dWALTZ < -50$ ise düşüşü ifade eder. *LIMBO* tahmininde ise $dLIMBO > 50$ şaperon bağlanma eğiliminde artış, $dLIMBO < -50$ ise düşüşü ifade eder. Programa (<https://snpeffect.switchlab.org>) web adresinden

erişim sağlanabilmektedir. *SNPEffect 4.0* aracında yabancı tip protein dizisi *fasta* formatında yüklenmiş ve varyant pozisyonu girilerek *TANGO*, *WALTZ* ve *LIMBO* değerlerinin hesaplanması istenmiştir (De Baets ve ark., 2012).

Proteinlerin üç boyutlu yapıları, moleküler düzeyde işlevlerine ilişkin değerli bilgiler sağlar. Çoğu zaman, protein kompleksleri birçok hücrenel sürecin merkezinde yer alır. Protein etkileşimlerinin ve genel kuaterner yapının ayrıntılı şekilde açıklanması, biyolojik sistemlerin, protein komplekslerinin ve ağlarının nasıl çalıştığını ve onları nasıl yönlendirebileceğimizi kapsamlı bir şekilde anlamak için gereklidir. *SWISS-MODEL* sunucusu protein yapıları ve komplekslerinin üç boyutlu modellenmesinde kullanılır ve bilinen protein dizileri ile deneysel olarak belirlenmiş yapılar arasındaki boşluğun daraltılmasına katkıda bulunur. Modelleme basamakları sırasıyla veri girişi, şablon araması, şablon seçimi, model oluşturma ve model kalitesinin kontrolü adımlarını kapsar. Protein modellemede kullanılan diğer sunucularla karşılaştırıldığında *SWISS-MODEL* diğer sunuculara (*HHpredB*, *NaiveBLAST*, *PRIMO*, *SPARKS-X*, *RaptorX*, *IntFOLD4-TS* ve *Robetta*) kıyasla daha hızlıdır. Bağlanma bölgeleri, yüksek kaliteli modeller, kuaterner yapı tahmininde model kalitesinde üstünlük sağlar. Modelin güvenilirliği açısından da diğer sunuculardan daha iyi performans gösterir. *SWISS-MODEL* sunucusuna (<https://swissmodel.expasy.org>) *web* adresinden erişim sağlanabilmektedir. Yabancı tip ve mutant tip protein dizilerine ait homoloji modellemelerinde *SWISS MODEL* kullanılmıştır. Yabancı ve mutant proteine ilişkin dizilerin tamamı sisteme girildiğinde farklı protein modelleri listelenmiştir. Tez çalışması kapsamında sekanslanan *WD40* domainine ait dizi yabancı ve mutant olarak girildiğinde listelenen şablonlar arasından %87,14 dizi benzerliği ve 1.90Å çözünürlükte görülen 2w18.1.A numaralı PDB kaydı seçilerek model oluşturulmuştur (Waterhouse ve ark., 2018).

Mutant proteinde ligand bağlanma bölgelerinin tespiti ve bu bölgelerin yabancı protein ile karşılaştırılabilmesi için *FTSite Binding Site Prediction* (Kozakov ve ark., 2015) ve *FunFOLD2* (Roche ve ark., 2013) araçları kullanılmıştır. *FTSite* sunucusu olası ligand bağlama bölgelerinin belirlenmesinde serbest enerji temelli metodun kullanıldığı bir sunucudur. Hesaplamalı haritalama 16 farklı küçük moleküler probu

proteinin çevresine yerleştirir ve serbest enerji fonksiyonlarına göre bu problemler uygun pozisyonlarını bulur. Her bir problem tipi için problemler kümelendir ve konsensus bölgeleri oluşturulur. En yüksek temas sayısına sahip konsensus bölgesi ilk sırada yer alır; yakındaki konsensus bölgeleri de bu kümeye katılır. Bu yeni tanımlanmış kümenin problemleri ile temas halinde olan amino asit rezidüleri, en üst sıradaki tahmin edilen ligand bağlanma bölgesini oluşturur (Ngan ve ark., 2012). Genişletilmiş konsensus bölgesinin 4 Å içindeki protein rezidüleri, “Site 1” olarak tanımlanan bağlanma bölgesinin en üst tahminini oluştururken, diğer konsensus bölgeleri daha düşük sıralı tahminleri tanımlar. Bu algoritmada *FTSite*’ın amacı tüm bağlanma bölgelerini sıralamak olduğundan, proteinin hiçbir kısmı maskelenemez (Kozakov ve ark., 2015). (<https://ftsites.bu.edu>) web adresinden sunucuya erişim sağlanabilir. *FunFOLD2* sunucusu üç boyutlu modellerin kullanımı yoluyla protein-ligand bağlanmasını tahmin etmek için geliştirilmiştir. Sunucunun kurulu olduğu prensip protein veri tabanı içinde ligandları içeren proteinlerin, incelenen hedef proteinin üç boyutlu modeline benzer bir katlanma ile benzer bağlanma bölgelerine sahip olmaları ihtimalidir. *FunFOLD* algoritması, biyolojik olarak ilgili ligandları içeren şablonları *IntFOLD2-TS*’den tahmin edilen üç boyutlu yapıyla üst üste bindirmek için *TM-align* yöntemini kullanır. *TM* skorunun 0,4 ve daha yüksek olduğu süperpozisyonlar birleştirilir ve kümelendir. Hiyerarşik kümeleme yöntemi ile sürekli temas eden ligandların kümesi tanımlanır. En fazla sayıda ligand içeren küme, ligand bağlama bölgesinin cebi olarak seçilir. Bölgedeki rezidülerin tanımlanması için rezidü seçim algoritması kullanılır. Rezidü bir ligand ile temas halinde ise bir atomun Van der Waals yarıçapı artı 0,5 Å’den küçük veya buna eşit bir mesafe olmalıdır. *FunFOLD* algoritmasının çıktısı, varsayılan ligand bağlama yeri kalıntılarının bir listesi ile bağlama yeri kümesi içindeki ligandların bir listesidir. (http://www.reading.ac.uk/bioinf/FunFOLD/FunFOLD_form_2_0.html) web adresi ile bu sunucuya erişim sağlanabilmektedir (Roche ve ark., 2013). *FTSite Binding Site Prediction* aracında WD40 domainine ait yabancı ve mutant protein dizileri *fasta* formatında sisteme yüklenmiş (Kozakov ve ark., 2015), *FunFOLD2* (Roche ve ark., 2013) aracında ise yabancı ve mutant protein dizilerinin tamamı *fasta* formatında girilerek ligand bağlanma bölgeleri araştırılmıştır.

MikroRNA'lar (miRNA) transkripsiyon sonrası gen regülasyonunda görevli yaklaşık 18-22 nükleotitten oluşan kodlanmayan küçük RNA molekülleridir. Kanserde insanlarda olduğu gibi köpeklerde de onkogen görevi görebilmektedir (Boggs ve ark., 2008). Bir mRNA molekülünün baskılanmasını yönlendirmek için, mikroRNA'nın çekirdek olarak bilinen bir bölgesi, hedef mRNA'daki tamamlayıcı bir diziye bağlanır. mRNA'da miRNA çekirdeğindeki baz dizisi ile tam olarak eşleşen baz dizisini içeren bölgeler kanonik bölge adını alır. Bazı kanonik bölgeler, mRNA kontrolünde diğerlerinden daha etkilidir. miRNA çekirdeği ile mRNA arasındaki eşleşmenin tamamen gerçekleşmediği kanonik olmayan bölgeler de mevcuttur. Agarwal ve ark. (2015), miRNA aktivitesini araştırmak için büyük deneysel veri setlerini kullanmıştır. mRNA'lar mikroRNA ile eşleşen kanonik bölgelere sahip olduğunda, mRNA düzeyleri ve kullanımında düşüş eğilimi görülmüş, kanonik olmayan bölgeler için ise hiçbir etki gözlenmemiştir. MikroRNA'ların protein üretimini kontrol etmek için öncelikle kanonik bölgelere bağlandığı gösterilmiş ve istatistiksel bir model geliştirilmiştir. *TargetScan*, her bir miRNA'nın çekirdek bölgesiyle eşleşen korunmuş 8mer, 7mer ve 6mer bölgelerinin varlığını arayarak miRNA'ların biyolojik hedeflerini tahmin eder. Düşük derecede korunmuş bölgeleri ve korunmuş 3' ve merkezi bölgelerdeki yanlış baz eşleşmelerini de tanımlar. Memelilerde tahminler bölgelerin "cumulative weighted context++" puanları kullanılarak hesaplandığı gibi tahmin edilen hedefleme etkinliğine dayalı olarak sıralanır. Köpek türünün de dahil olduğu 10 farklı memeli türünde hedef gen ve hedefleyen miRNA'lar araştırılabilir. *TargetScanHuman* veri tabanına (<http://targetscan.org/>) web adresinden erişim sağlanabilmektedir (Agarwal ve ark., 2015). miRNA hedeflerinin doğru şekilde tahmin edilmesi miRNA fonksiyonlarının karakterizasyonu için kritik öneme sahip olduğundan miRNA hedef tahmini ve işlevsel açıklamaları için *miRDB* adlı çevrimiçi bir veri tabanı geliştirilmiştir. *miRDB* veri tabanında miRNA hedef tahmini için geliştirilmiş bir algoritma kullanarak, köpek türünün de dahil olduğu beş türde 7 000 miRNA tarafından düzenlenen, 3,5 milyon öngörülen hedef dahil olmak üzere transkriptom çapında hedef tahmin verileri sunulmaktadır. Yeni tahmin algoritmasında kullanıcı tarafından girilen dizilere özel hedef tahmini mümkündür. Bunun yanı sıra hücreye özgü miRNA hedefleri de saptanabilmektedir. Hedef tahmini ve gen ontolojisi verilerinin bütünleştirici analizi ile miRNA fonksiyonlarının tahmini için yeni bir

arayüz de veri tabanında bulunmaktadır. *miRDB* veri tabanına (<http://mirdb.org/>) web adresinden erişim sağlanabilmektedir (Chen ve Wang, 2020). *miRWalk*, köpek türü dahil olmak üzere altı farklı türe ait bilinen genlerin öngörülen ve doğrulanmış miRNA bağlanma bölgelerini otomatik olarak belirleyen bir arayüze sahip olan açık kaynaklı bir platformdur. *miRWalk*, 5' UTR (5' transkripsiyonu yapılmayan bölge), CDS (kodlayan bölge) ve 3' UTR (3' transkripsiyonu yapılmayan bölge) dahil olmak üzere tam transkript dizisini arayan rassal orman algoritması temelli TarPmiR yazılımı ile miRNA hedef bölge tahmininde bulunur ve sonuçları diğer veri tabanlarında öngörülen ve deneysel olarak doğrulanmış miRNA-hedef etkileşimleriyle bütünleştirir. *miRWalk* veri tabanına (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) web adresinden erişim sağlanabilmektedir (Sticht ve ark., 2018). Köpek miRNA ve hedef genlerinin sorgulanabildiği *TargetScan* (Agarwal ve ark., 2015), *miRDB* (Chen ve Wang, 2020) ve *miRWalk* (Sticht ve ark., 2018) veri tabanları kullanılarak *PALB2* transkriptine bağlanan miRNA'lar listelenmiş ve çalışma kapsamında tespit edilmiş, varyantlara ilişkin pozisyonların miRNA bağlanma bölgesinde olup olmadığı araştırılmıştır. *TargetScan* veri tabanı referans transkript olarak *Ensembl* veri tabanındaki insan *PALB2* genine ait ENST00000261584.4 transkriptini kullanmakta ve bu transkripte bağlanabilecek köpek türüne ait miRNA'ları tespit etmektedir. *miRDB* ve *miRWalk* veri tabanları ise *NCBI* veri tabanındaki XM_845578 transkriptini kullanmaktadır. Ayrıca *TargetScan* ve *miRDB* veri tabanlarında yalnızca 3'UTR bölgelerine bağlanan miRNA'lar listelenmekteyken, *miRWalk* veri tabanında transkriptteki tüm pozisyonlardaki potansiyel miRNA bağlanma bölgeleri listelenmektedir.

AnimalTFDB (*The Animal Transcription Factor DataBase*) hayvan transkripsiyon faktörleri (TF) ve kofaktörler için en kapsamlı ve doğru bilgileri sağlamayı amaçlayan kaynaktır. *AnimalTFDB3.0* sürümünde 97 hayvan genomundan 125 135 TF geni ve 80 060 transkripsiyon kofaktör geni bulunmaktadır. Önceki sürümlere kıyasla TF aileleri daha doğru bir şekilde atanmakta, transkripsiyon kofaktörleri sınıflandırılmaktadır. Ayrıca TF bağlanma bölgelerine ait bilgiler, insan TF'lerinin GWAS (genom boyu ilişkilendirme çalışması) fenotipi ile ilgili bilgiler, 22 hayvan türünde TF ifadeleri, nükleotit dizilerine potansiyel olarak bağlanan TF'lerinin araştırılabileceği yeni bir araç, insan TF'lerini daha iyi kullanmak için ayrı bir insan

TF veri tabanı web arayüzü (HumanTFDB) tasarlanmıştır. *AnimalTFDB3.0* veri tabanına (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/AnimalTFDB/#!/>) web adresinden erişim sağlanabilmektedir. Tespit edilen varyantları kapsayan nükleotit dizileri yabanıl tip ve mutant tip olacak şekilde *AnimalTFDB3.0* (Hu ve ark., 2019) veri tabanına *fasta* formatında girilerek yabanıl tip ve mutant tip dizilerin transkripsiyon faktörü bağlanmasına etki edip etmeyeceği köpek (*Canis familiaris*) türünde araştırılmıştır.

Sinonim mutasyonlar proteinin birincil yapısını değiştirmedikten, uzun süre işlevsiz olarak kabul edilmiştir ancak bu tür mutasyonlar, *splicing*, mRNA stabilitesi, RNA'nın sekonder yapısı, transkripsiyon faktörü ve miRNA bağlanması ve protein ifadesi gibi faktörleri etkileyerek insan fenotipinde farklılıklara neden olabilmektedir. *dbDSM* (*Database of Deleterious Synonymous Mutations*) veri tabanı, zararlı sinonim mutasyonlar ile ilgili birden fazla kaynağı toplayan entegre bir veri tabanıdır. *dbDSM* v2.0 mutasyon pozisyonu, hastalık, gen ve fonksiyonel skor gibi özellikler ile bu tip mutasyonlar hakkında ayrıntılı bilgi sağlamaktadır. *dbDSM* veri tabanı halka açık, ücretsiz bir veri tabanıdır ve (<http://bioinfo.ahu.edu.cn:8080/dbDSM/index.jsp>) web adresinden erişim sağlanabilmektedir. Sinonim varyantların zararlı olma ihtimali değerlendirilerek gen ismi girilerek *dbDSM* v2.0 (Wen ve ark., 2016) veri tabanında zararlı sinonim varyantların listelenmesi istenmiştir. Yalnızca insan türünde kullanılabilen bu veri tabanında sonuçlar listelenmiş, listelenen insan protein pozisyonları ile köpek türüne ait pozisyonlar *UniProt* veri tabanında karşılaştırılmış (The Uniprot Consortium, 2021a), köpekte tespit edilen sinonim varyantın bulunduğu pozisyonun risk teşkil edip etmediği tespit edilmiştir.

Ekzon ve intron bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar *splice* mekanizmasını doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilmektedir (Desmet ve ark., 2010). Meydana gelen mutasyonlar, mRNA'da yeni *splice* bölgeleri oluşturabilir, var olan *splice* bölgelerini yok edebilir veya *splice* mekanizmasında görevli yardımcı dizilerdeki sinyallerde değişikliğe neden olarak *splice* mekanizmasını bozabilir. Mutasyonların *splice* mekanizması üstüne etkileri *EX-SKIP* (Raponi ve ark., 2011) ve *Human Splicing Finder* (Desmet ve ark., 2009) aracılığıyla araştırılmıştır. *EX-SKIP*, Perl'de oluşturulmuş bir komut dosyası üzerinden kullanılmakta olan web arayüzüne sahip bir

araçtır. Ekzon bölgelerinde meydana gelen mutasyonların *splice* mekanizmasına etkilerinin araştırılabilmesi amacıyla tasarlanmıştır. Kullanıcı tarafından tür gözetilmeksizin sisteme yüklenen ekzon bölgesindeki dizilerde *splice* mekanizmasında görevli çeşitli elementleri tarar, değerlendirir ve yabancı dizi ile mutant diziyi karşılaştırarak *splice* mekanizmasındaki olası etkileri sunar. *EX-SKIP* aracına (<https://ex-skip.img.cas.cz>) web adresinden ulaşılabilir (Raponi ve ark., 2011). *EX-SKIP* aracı tür ayrımı gözetmeksizin kullanılabilen bir araçtır ancak yalnızca ekzon bölgelerindeki nokta mutasyonlarının *splice* mekanizması üstündeki etkilerini göstermektedir. Ekzon 7 ve ekzon 13'te tespit edilen varyantlar *fasta* formatında yabancı ve mutant diziler olarak sisteme girilerek *splice* mekanizmasına etkileri araştırılmıştır. Türler arasında benzer etkiye neden olabileceği gerekçesi ile köpekte tespit edilen tüm varyantların insanlardaki karşılıkları *Ensembl* veri tabanında köpek ve insan türlerine ait *PALB2* genleri hizalanarak tespit edilmiş, ekzon-intron ayrımı olmaksızın tüm varyantların insan *PALB2* transkripti üstündeki pozisyonları *Human Splicing Finder* aracına girilerek insan genomunun sistemdeki güncel versiyonunda *splice* mekanizmasına olan etkileri araştırılmıştır. *Human Splicing Finder* (HSF) farklı mutasyonların analizini kolaylaştırmak için, mutasyonların *splice* sinyalleri üzerindeki etkilerini tahmin etmek veya herhangi bir insan dizisindeki *splice* motiflerini belirlemek tasarlanmış bir araçtır. (<https://www.genomnis.com>) web adresinden bu araca erişim sağlanabilmektedir (Desmet ve ark., 2009).

Proteinler hücrelerin fizyolojik yollarının ana bileşenleridir ve vücutta hayati işlevlere hizmet etmektedirler. Farklı tiplerdeki protein-protein etkileşimleri (zorunlu/zorunlu olmayan, geçici/kalıcı, homo-oligomerik/hetero-oligomerik gibi) hücre biyolojisinde genom ve çevre etkisinde dinamik bir şekilde değişmekte ve organizmanın yaşamında merkezi bir rol oynamaktadır (Nooren ve Thornton, 2003 ve Pastrana ve Jauregi, 2017). *IntAct* moleküler etkileşim veritabanı 2002'den beri geniş bir kullanıcı topluluğuna standart formatlarda sağlanan moleküler etkileşim verilerini sunmaktadır. Literatürden derlenen veya doğrudan veri birikimlerinden elde edilen verilerle doldurulan açık kaynaklı bir moleküler etkileşim veri tabanıdır. MINT (*Molecular INTERaction*) ve *IntAct* veri tabanları, sınırlı geliştirici kaynaklarından en iyi şekilde yararlanmak ve organizasyon çıktılarını en üst düzeye çıkarmak için bir

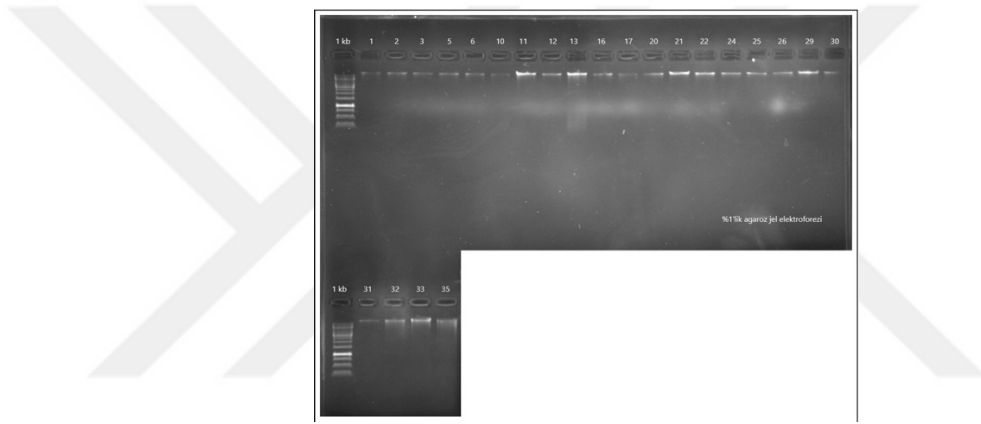
araya gelmiştir. MINT tarafından manuel olarak düzenlenen tüm veriler, EMBL-EBI'deki (*European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute*) *IntAct* veri tabanına taşınmış ve mevcut *IntAct* veri kümesiyle birleştirilmiştir. Hem *IntAct* hem de MINT, IMEx konsorsiyumuna (*International Molecular Exchange Consortium*) aktif olarak katkıda bulunmaktadır. (<https://www.ebi.ac.uk/intact/>) web adresinden *IntAct* veri tabanına erişim sağlanabilmektedir (Orchard ve ark., 2014). *STRING* veri tabanı ise halka açık tüm protein-protein etkileşim bilgisi kaynaklarını toplamayı, puanlamayı ve entegre etmeyi ve bunları hesaplama tahminleriyle tamamlamayı amaçlar. Doğrudan (fiziksel) ve dolaylı (işlevsel) etkileşimler dahil olmak üzere kapsamlı ve nesnel geniş bir ağ elde etmeyi amaçlar. Zenginleştirme analizi için *STRING v11*, *Gene Ontology* ve *KEGG* gibi iyi bilinen sınıflandırma sistemlerini uygular, aynı zamanda yüksek verimli veri madenciliğine ve ilişkilendirme ağının hiyerarşik kümelenmesine dayanan yeni sınıflandırma sistemleri sunar. (<https://string-db.org/>) web adresinden *STRING* veri tabanına erişim sağlanabilmektedir (Szklarczyk ve ark., 2019).

DNA Sequence Polymorphism (DnaSP) yazılımı, tek bir lokustan veya birkaç lokustan elde edilen verileri kullanarak DNA polimorfizmlerinin analizi için kullanılan bir yazılım paketidir. DnaSP kodlama yapmayan, sinonim veya sinonim olmayan bölgelerde veya çeşitli kodon konumlarında popülasyonlar içindeki ve popülasyonlar arasındaki DNA dizisi varyasyonunun yanı sıra, bağlantı dengesizliği, rekombinasyon, gen akışı ve gen dönüşüm parametrelerini tahmin edebilir. Ayrıca, çeşitli nötralite testlerini yapabilir. Analizlerin sonuçları tablo ve grafik şeklinde görüntülenir. DnsSP yazılımına (<http://www.ub.edu/dnasp/>) web adresinden erişim sağlanabilmektedir. DnaSP ver. 6.12.13 yazılımı ile *PALB2* geni *WD40* domainine ait sekanslanan çoklu veriler referans DNA dizisi ile hizalanmış, haploid hale getirilmiş ve ardından polimorfizm verileri ve haplotip verileri elde edilmiştir (Rozas ve ark., 2019).

3. BULGULAR

3.1. DNA İzolasyonu, DNA Kalite ve Kantitesi ile Bütünlüğünün Kontrolü

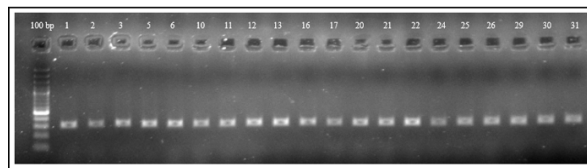
DNA konsantrasyonları 13,7 ile 45,2 ng/μl arasında, 260/280 değerleri 1,8 ile 2,83; 230/260 değerleri ise 0,26 ile 2,11 arasında ölçülmüştür. DNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 3.1'deki gibidir.



Şekil 3.1. DNA izolatlarının %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

3.2. Gen Bölgelerinin Yükseltgenmesi ve Saflaştırılması

PZR reaksiyonları “Gereç ve Yöntem” kapsamında bildirildiği üzere gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.2’de reaksiyon sonuçlarına ilişkin örnek bir agaroz jel elektroforezi görüntüsü bulunmaktadır.



Şekil 3.2. Çalışmada gerçekleştirilen reaksiyonlara ilişkin örnek bir %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

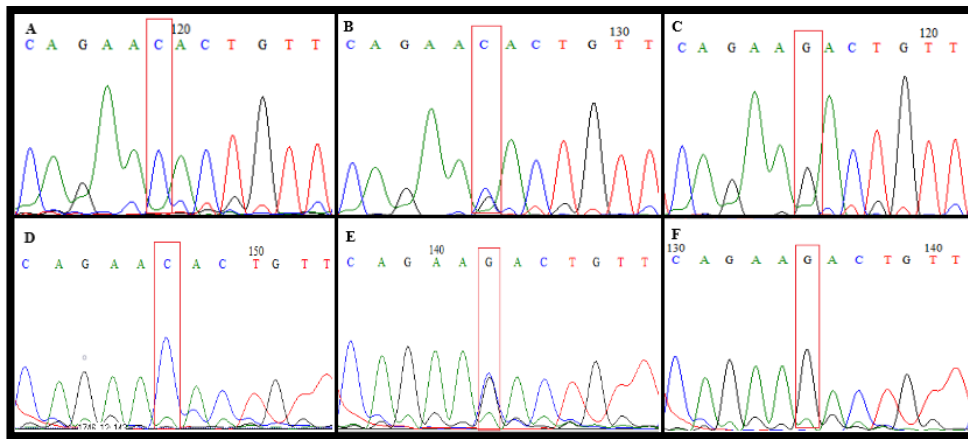
3.3. DNA Dizi Analizleri

WD40D1 bölgesine ait elektroferogramların okunması sonucunda intron 6'da g.22220063C>G varyantı tespit edilmiştir. Örnekleme bakıldığında sağlıklı birey ve KMT hastası altı birey yabancı tip olarak görülmektedir. Altı KMT vakası heterozigot, sekiz KMT vakası ise bu varyantı homozigot olarak bulundurmaktadır. Şekil 3.3 Bioedit programında yapılan hizalamalar görülmektedir. Şekil 3.4'te ise intron 6'da tespit edilen varyantlara ilişkin elektroferogram görüntüleri bulunmaktadır.



Şekil 3.3. WD40D1 PZR ürünlerine ait sekanslar ve örneklemin intron 6'daki g.22220063C>G varyantı açısından durumu.

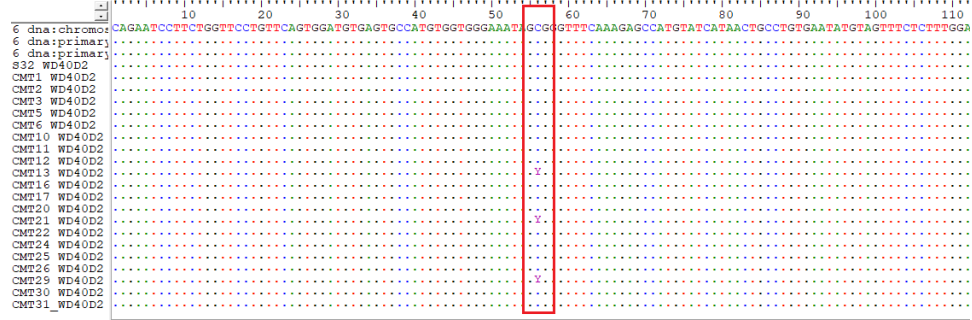
İlk üç dizi *Ensembl* veri tabanındaki referans dizi, *Basenji* ve *Great dane* ırklarını; solda S kodlu birey örneklemindeki sağlıklı bireyi göstermektedir. CMT kodlu bireyler ise KMT hastası bireyleri göstermektedir; sağda işaretli nükleotitlerdeki S ise IUPAC kodlarından C/G nükleotitlerini temsil etmekte ve heterozigotluğu göstermektedir.



Şekil 3.4. İtron 6'daki g.22220063C>G varyantına ait elektroferogram görüntüleri.

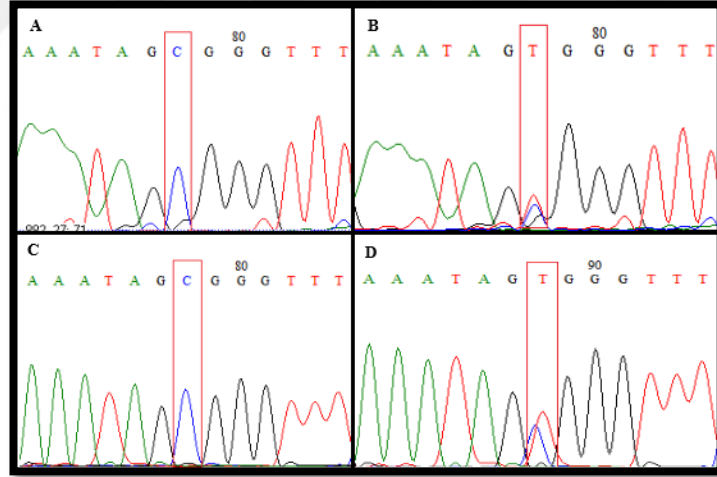
A, B, C ileri yöndeki okumaları; D, E, F geri yöndeki okumaların ters komplementer dizilerini göstermektedir. A ve D: Homozigot yabancı tip allel; B ve E: Heterozigot allel; C ve F: Homozigot g.22220063C>G varyantı.

WD40D2 dizilerinin okunması sonucunda Ekzon 7’de üç KMT hastası bireyde heterozigot c.3149C>T yanlış anlam mutasyonu (p.A1050V) tespit edilmiştir. Şekil 3.5’te Bioedit programında yapılan hizalamalar görülmektedir. Şekil 3.6’da ise ekzon 7’de tespit edilen varyantlara ilişkin elektroferogram görüntüleri bulunmaktadır.



Şekil 3.5. WD40D2 PZR ürünlerine ait sekanslar ve örneklemin ekzon 7’deki c.3149C>T varyantı açısından durumu.

İlk üç dizi *Ensembl* veri tabanındaki referans dizi, *Basenji* ve *Great dane* ırklarını; S kodlu dizi örneklemdaki sağlıklı bireyi göstermektedir, CMT kodlu bireyler ise KMT hastası bireyleri göstermektedir. Sağda işaretli nükleotitlerdeki Y ise IUPAC kodlarından C/T nükleotitlerini temsil etmekte ve heterozigotluğu göstermektedir.



Şekil 3.6. Ekzon 7’deki c.3149C>T varyantına ait elektroferogram görüntüleri.

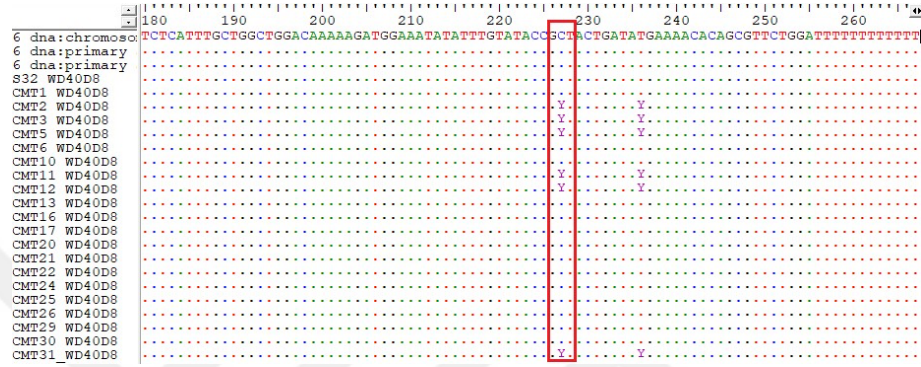
A, B ileri yöndeki okumaları; C, D geri yöndeki okumaların ters komplement dizilerini göstermektedir. A ve C: Homozigot yabani tip allel; B ve D: Heterozigot allel.

WD40D3, WD40D4, WD40D5, WD40D6 ve WD40D7 bölgelerinde varyanta rastlanmamıştır.

WD40D8 dizilerinin okunması sonucunda ekzon 13’ün kodlanan bölgesinde c.4062C>T sinonim varyantı (p.R1354R); 3’UTR bölgesinde ise c.4071T>C varyantı

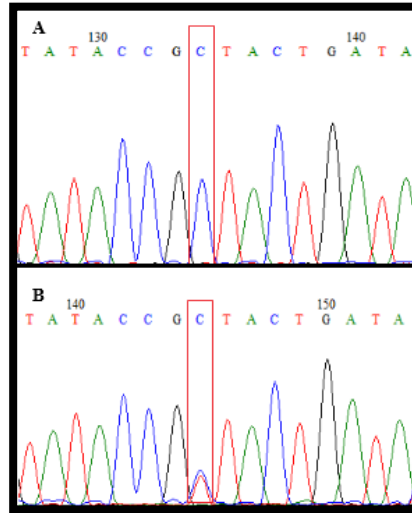
olmak üzere iki adet varyant ilk kez mevcut çalışmada tespit edilmiştir. WD40D8 bölgesindeki her iki varyant KMT hastası 6 bireyde heterozigot olarak tespit edilmiştir.

Şekil 3.7’de c.4062C>T varyantına ait Bioedit hizalamaları görülmektedir. Şekil 3.8’de ise tespit edilen varyanta ilişkin elektroferogramlar yer almaktadır. Çoklu timin dizileri nedeniyle geri primerle bu bölgenin okunması mümkün olmamıştır.



Şekil 3.7. WD40D8 PZR ürünlerine ait sekanslar ve örneklemin ekzon 13’teki c.4062C>T varyantı açısından durumu.

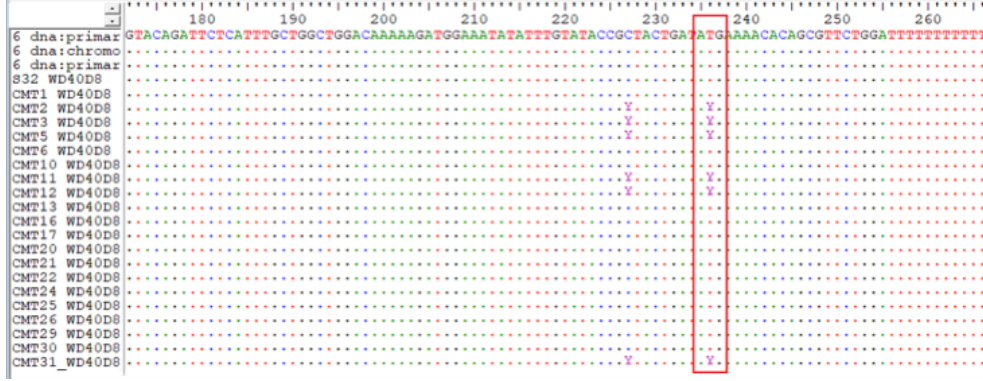
İlk üç dizi *Ensembl* veri tabanındaki referans dizi, *Basenji* ve *Great dane* ırklarını; S kodlu dizi örneklemden sağlıklı bireyi göstermektedir. CMT kodlu bireyler ise KMT hastası bireyleri göstermektedir. Sağda işaretli nükleotitlerdeki Y ise IUPAC kodlarından C/T nükleotitlerini temsil etmekte ve heterozigotluğu göstermektedir.



Şekil 3.8. Ekzon 13’teki c.4062C>T varyantına ait elektroferogram görüntüleri. A: Homozigot yabancıl tip allel; B: Heterozigot allel.

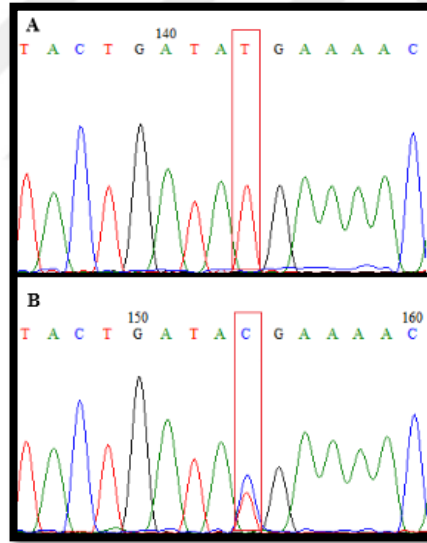
Şekil 3.9’da c.4071T>C varyantına ait Bioedit hizalamaları görünmektedir. Şekil 3.10’da ise tespit edilen varyanta ilişkin elektroferogramlar yer almaktadır.

Çoklu timin dizileri nedeniyle geri primerle bu bölgenin okunması mümkün olmamıştır.



Şekil 3.9. WD40D8 PZR ürünlerine ait sekanslar ve örneklemin 3' UTR bölgesindeki c.4071T>C varyantı açısından durumu.

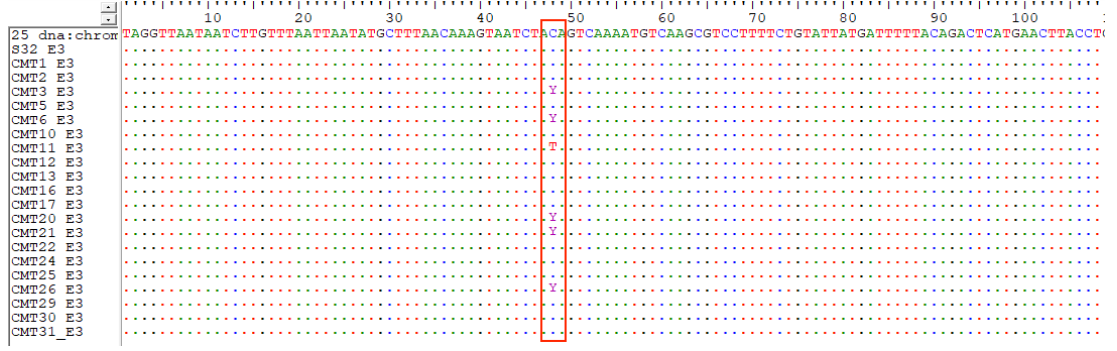
İlk üç dizi *Ensembl* veri tabanındaki referans dizi, *Basenji* ve *Great dane* ırklarını; S kodlu dizi örneklemden sağlıklı bireyi göstermektedir, CMT kodlu bireyler ise KMT hastası bireyleri göstermektedir. Y ise IUPAC kodlarından A/T nükleotitlerini temsil etmekte ve heterozigotluğu göstermektedir.



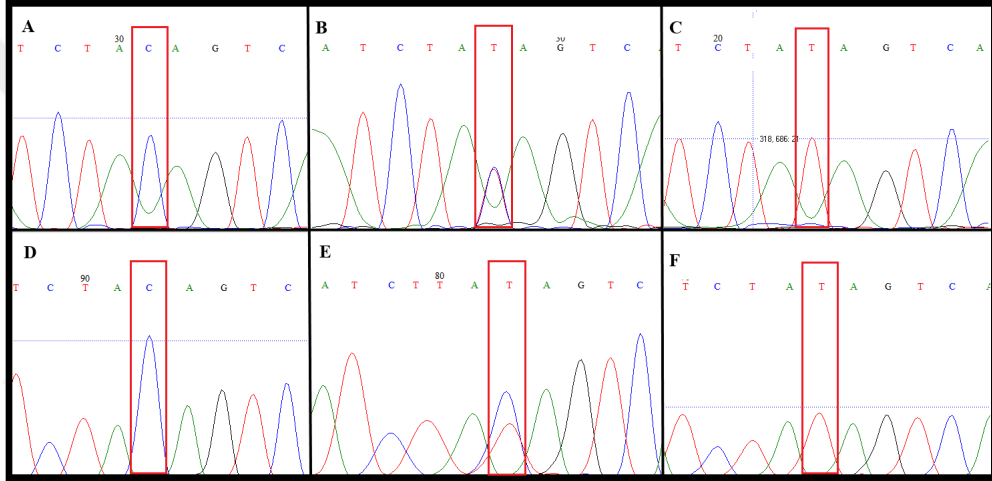
Şekil 3.10. Ekzon 13'teki c.4071T>C varyantına ait elektroferogram görüntüleri.

A: Homozigot yabani tip allel; B: Heterozigot allel.

BRCA2 geninde yükseltgenen bölgelerden E2 primer seti bölgesinde herhangi bir varyanta rastlanmamıştır. E3 primer seti bölgesinde intron 2'de g.7794120C>T (c.68-104C>T) varyantı tespit edilmiştir. Varyantın hasta bireylerden birinde homozigot, beş hasta bireyde ise heterozigot olduğu Şekil 3.11'deki gibi görülmektedir. Elektroferogram görüntüleri ise Şekil 3.12'de görüldüğü gibidir.



Şekil 3.11. *BRCA2* geni E3 primer seti PZR ürünlerine ait sekanslar ve örneklemin g.7794120C>T varyantı açısından durumu. İlk dizi referans diziyi, S kodlu dizi örneklemdaki sağlıklı bireyi, CMT kodlu bireyler ise KMT hastası bireyleri göstermektedir. Y ise IUPAC kodlarından A/T nükleotitlerini temsil etmekte ve heterozigotluğu göstermektedir.



Şekil 3.12. *BRCA2* geni intron 2'deki g.7794120C>T varyantına ait elektroferogram görüntüleri. A, B, C ileri yöndeki okumaları; D, E, F geri yöndeki okumaların ters komplementer dizilerini göstermektedir. A ve D: Homozigot yabani tip allel; B ve E: Heterozigot allel; C ve F: Homozigot g.7794120C>T varyantı.

Çalışmada DNA dizi analizi sonucunda elde edilen varyantlar, pozisyonları ve örneklemdaki bireylerde dağılımı Şekil 3.13'te özetlenmiştir. *PALB2* geninde intron 6'da c.3096+8C>G *splice* bölgesi varyantı, ekzon 7'de c.3149C>T yanlış anlam mutasyonu, ekzon13'te c.4062C>T sinonim varyantı ve 3'UTR bölgesinde c.4071T>C varyantı tespit edilmiştir. *BRCA2* geninde ise intron 2'de c.68-104C>T varyantı tespit edilmiştir.

	KMT Hastası Örnekler																				Sağlıklı
	1	2	3	5	6	10	11	12	13	16	17	20	21	22	24	25	26	29	30	31	32
İntron 6*																					
Ekzon 7*																					
Ekzon 13*																					
3'UTR*																					
BRCA2*																					

<

Şekil 3.13. *PALB2* ve *BRCA2* genlerinde tespit edilen varyantların örneklemedeki dağılımı. **A:** Örneklemedeki bireyler ve varyantların dağılımını gösterir tablo, **B:** Varyantlara ilişkin lejant, **C:** Varyantların genomik DNA, komplementer DNA ve protein dizisindeki pozisyonları ve rs kodlarını gösteren ayrıntılı tablo.

3.4. Biyoinformatik Analizler

Biyoinformatik analizler “Gereç ve Yöntem” başlığında bildirildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. *PALB2* Geni İntron 6 Varyantının Etkileri

Variant Effect Predictor (VEP) analizine göre intron 6’daki c.3096+8C>G varyantının *splice* bölgesi varyantı olduğu ve düşük etkili olduğu görülmüştür. Bu varyantın daha önceki çalışmalarda tespit edildiği ve rs24292038 kodu ile kayıtlı olduğu bilgisi VEP’te mevcuttur.

AnimalTFDB3.0 (Hu ve ark., 2019) veri tabanında intron 6 varyantının bulunduğu pozisyonda yabanıl veya mutant diziye bağlanabilen herhangi bir TF bulunmamıştır.

İnsandaki potansiyel intron 6 varyantlarının *splice* mekanizmasına etkilerine ilişkin HSF sonuçları Çizelge 3.1'deki gibidir. Görüldüğü üzere tüm potansiyel varyantlar kriptik akseptör bölge aktivasyonuna neden olarak *splice* mekanizmasında potansiyel değişikliğe neden olmaktadır.

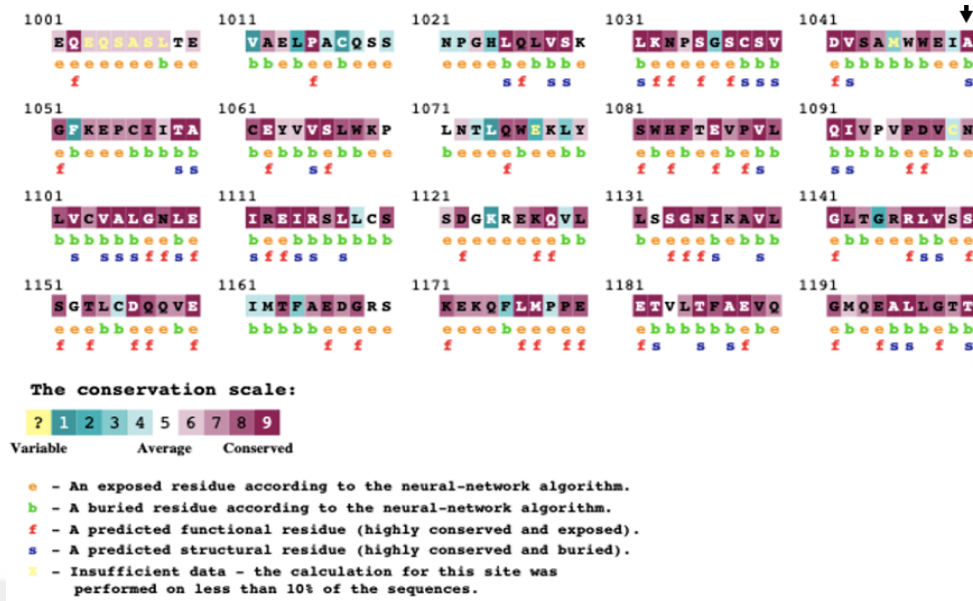
Çizelge 3.1. İtron 6 varyantı *Human Splicing Finder* sonuçları (Desmet ve ark., 2009).

Bölge	Varyant	Etki
İtron 6	c.2586+8G>A	Kriptik akseptör bölge aktivasyonu. <i>Splice</i> mekanizmasında potansiyel değişiklik.
	c.2586+8G>C	Kriptik akseptör bölge aktivasyonu. <i>Splice</i> mekanizmasında potansiyel değişiklik.
	c.2586+8G>T	Kriptik akseptör bölge aktivasyonu. <i>Splice</i> mekanizmasında potansiyel değişiklik.

3.4.2. *PALB2* Geni Ekzon 7 Varyantının Etkileri

VEP analizinde Ekzon 7'deki yanlış anlam mutasyonunun (A1050V) etki düzeyinin orta derecede olabileceği ve *SIFT* skorunun 0 olduğu görülmüştür. Bu varyant rs853188656 koduyla daha önce *Ensembl* veri tabanında kayıtlı varyantlar arasındadır.

ConSurf (Ashkenazy ve ark., 2016) sunucusunda *PALB2* protein dizisinin 1050'nci alanin amino asitinin korunmuşluk derecesi 9 olarak hesaplanmış, türler arasında yüksek oranda korunmuş olduğu, aynı zamanda ilgili rezidünün yapısal bir rezidü olduğu belirlenmiştir (bkz. Şekil 3.14).



Şekil 3.14. ConSurf sunucusunda köpek PALB2 proteininin korunmuşluk düzeyine ait gösterge çizelgesi (Ashkenazy ve ark., 2016). Siyah ok A1050V varyantının pozisyonunu göstermektedir.

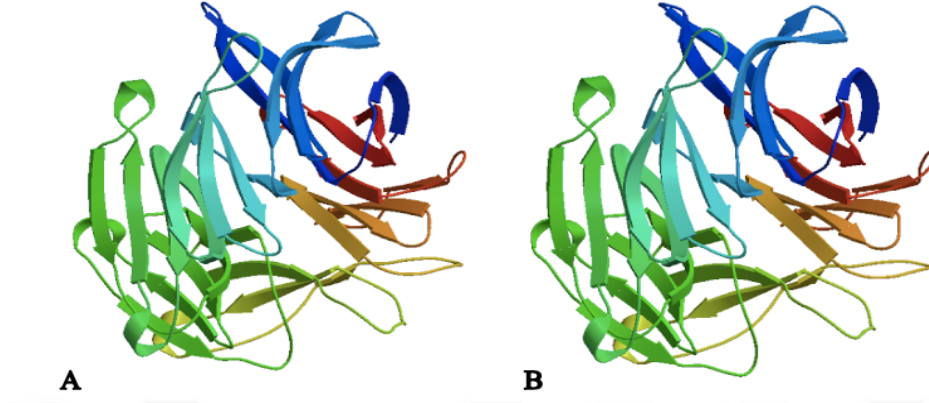
A1050V varyantının protein yapısı ve fonksiyonuna ilişkin etkileri için yapılan analizlerin sonuçları Çizelge 3.2’deki gibi özetlenmiştir.

Çizelge 3.2. A1050V yanlış anlam mutasyonunun etkilerine ilişkin özet çizelge. Gİ= Güvenilirlik indeksi. * Güvenilirlikleri düşük.

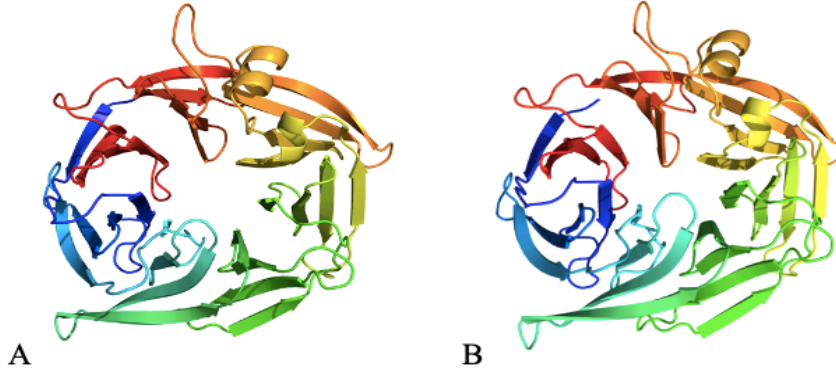
Araç	Metot	Eşik değer	Sonuç
SIFT	SIFT Sequence*	0,05	0 (Zararlı)
PROVEAN	-	-2,5	-2,450 (Nötral)
PolyPhen-2	Hum-Div	0,5	0,991 (Zararlı olma ihtimali oldukça yüksek)
	Hum-Var	0,5	0,986 (Zararlı olma ihtimali oldukça yüksek)
MutPred2	-	0,05	0,348 (Hesaplanamadı)
PhD-SNP	Sekans temelli metot*		Hastalıkla ilişkili (Gİ=0)
	Sekans ve profil temelli metot		Nötral (Gİ=5)
	Hibrit metot		Hastalıkla ilişkili (Gİ=5)
SNPEffect 4.0	TANGO		0,39 (Etkisiz)
	WALTZ		23,83 (Etkisiz)
	LIMBO		0,00 (Etkisiz)

SWISS MODEL (Waterhouse ve ark., 2018) aracında oluşturulmuş WD40 domaini şablonuna (2w18.1.A) göre oluşturulmuş yabancı protein ve A1050V varyantına ilişkin katlanmış yapılar (*native state*) Şekil 3.15 ve 3.16’da görüldüğü

gibidir. Her iki şekilde A yabancı tip diziye ait modeli, B ise A1050V varyantını göstermektedir.

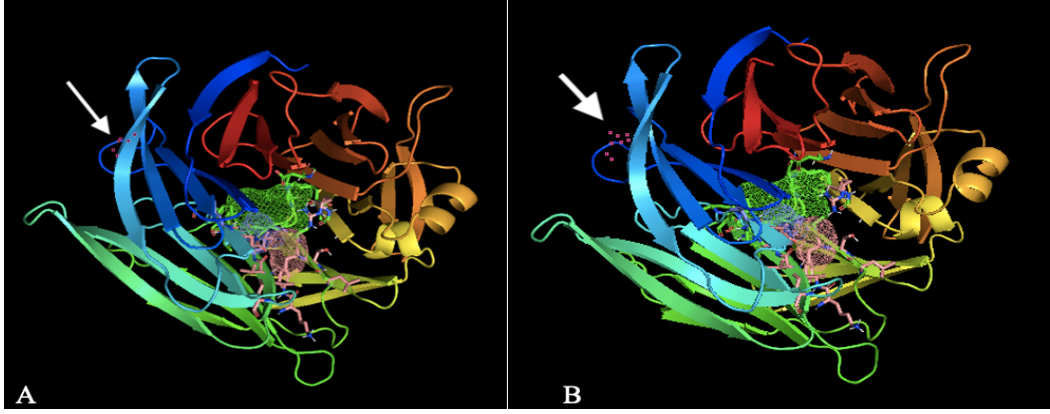


Şekil 3.15. *SWISS-MODEL* ile oluşturulan *WD40* domaini modeli (Waterhouse ve ark., 2018).
A: Yabancı tip. B: A1050V varyantı.



Şekil 3.16. *Phyre2* (Kelley ve ark., 2015) ile görselleştirilen *WD40* domaini modeli.
A: Yabancı tip. B: A1050V varyantı.

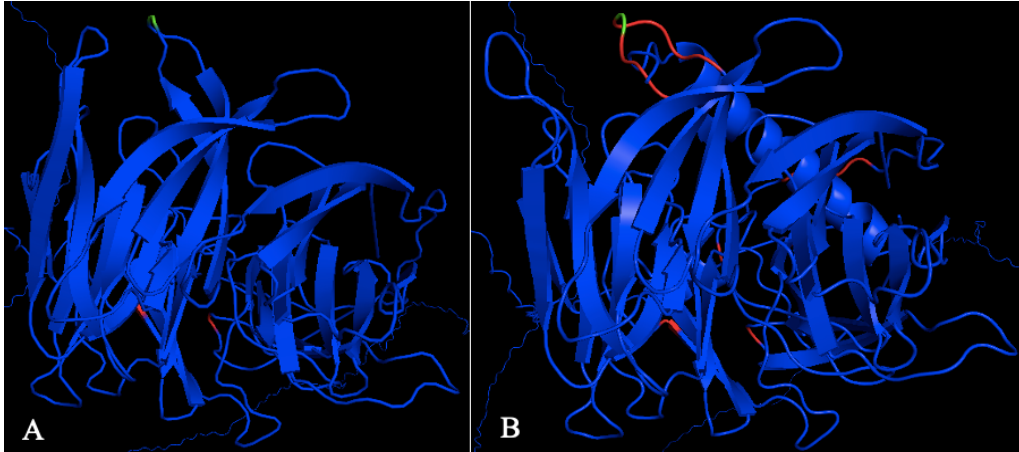
Ligand bağlanma bölgeleri ve varyantın bu bölgelerde neden olabileceği değişiklikler *FTSite Binding Site Prediction* (Kozakov ve ark., 2015) ve *FunFOLD2* (Roche ve ark, 2013) araçları ile tespit edilmiştir. *FTSite Binding Site Prediction* sonuçları Şekil 3.17’de görüldüğü gibidir. Ortadaki füme ve yeşil renkli bölgeler ligand bağlanma bölgelerini göstermektedir. Beyaz okun ucundaki kırmızı noktalarla işaretli bölge ise WD40 domaininin 33’üncü pozisyonunda bulunan ve mutasyon tespit edilen A1050V varyantının bulunduğu pozisyonu göstermektedir. *FTSite Binding Site Prediction* programına göre ligand bağlanma bölgeleri A1050V varyantından etkilenmemektedir.



Şekil 3.17. *FTSite Binding Site Prediction* ligand bağlanma bölgesi analiz sonuçları (Kozakov ve ark., 2015).

A: Yabanıl tip. **B:** A1050V varyantı.

FunFOLD2 sunucusuna ait sonuçlar ise Şekil 3.18'deki gibidir. Yabanıl tip dizide 1216 ve 1268 numaralı kırmızı renkli rezidüer ligand bağlanma bölgeleri olarak tespit edilmiştir. A1050V varyantında ise 1009, 1216, 1268; 1047, 1048, 1049, 1050, 1051, 1052, 1053, 1054; 1014, 1015, 1016, 1017, 1236 rezidüleri ligand bağlanma bölgeleri olarak tespit edilmiştir. Bu araçta A1050V varyantında 1050'nci rezidü de ligand bağlanma bölgelerinden biri olarak görülmektedir.



Şekil 3.18. *FunFOLD2* ligand bağlanma bölgesi analiz sonuçları (Roche ve ark, 2013).

A: Yabanıl tip. **B:** A1050V varyantı. Kırmızı renk: ligand bağlanma bölgeleri; yeşil renk: 1050'nci rezidü.

Araştırma yapılan veri tabanlarından yalnızca *miRWalk* veri tabanında ekzon 7 bölgesine bağlanabilen dört adet miRNA tespit edilmiştir. Çizelge 3.3'te bu miRNA'lar görülmektedir.

Çizelge 3.3. *miRWalk* veri tabanında varyant bölgesine bağlanan miRNA'lar ve bağlanma bölgelerine ilişkin bilgiler (Kozomara ve ark., 2019 ve Sticht ve ark., 2018).

Pozisyon	miRNA	Bağlanma Bölgesi	miRNA Dizisi
Ekzon 7 c.2821C>T (XM_845578)	cfa-miR-222	2802-2823	>cfa-miR-222 MIMAT0009851 AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
	cfa-miR-8842	2800-2824	>cfa-miR-8842 MIMAT0034335 UGCUGUGGCUCACGCUUUGGUAC
	cfa-miR-8821	2803-2825	>cfa-miR-8821 MIMAT0034311 UACUGUGUCCUCCUAUCCAUGG
	cfa-miR-8846	2793-2830	>cfa-miR-8846 MIMAT0034340 CGGGACAGAUGUGGCCUCAGAUCAU

Ekzon 7 varyantı için *AnimalTFDB3.0* (Hu ve ark., 2019) veri tabanı sonuçları Çizelge 3.4'teki gibi listelenmiştir.

Çizelge 3.4. *AnimalTFDB3.0* veri tabanında köpek (*Canis familiaris*) türünde ekzon 7 bölgesinde tespit edilen transkripsiyon faktörleri (Hu ve ark., 2019).
Wt: yabanıl dizi, **Mt:** mutant dizi.

Bölge	Varyant	Wt Dizi	Mt Dizi	Wt ve Mt Dizi
Ekzon 7	c.3149C>T	ELF1	AIRE	SPI1
		EZH2	EGR3	TCF4
		RELA	SETDB1	-
		RUNX1	-	-
		SP1	-	-
		TRIM28	-	-

Ekzon 7 varyantının *splice* mekanizmasına etkileri hem *EX-SKIP* hem de HSF araçlarında araştırılmıştır. Ekzon 7 mutant dizisinde ekzon atlanması olasılığı *EX-SKIP* aracında yabanıl diziden daha yüksek çıkmış, sonuç Şekil 3.19'da verilmiştir.



EX-SKIP - Results for submitted sequences

Seq	PESS (count)	FAS-ESS hex2 (count)	FAS-ESS hex3 (count)	IIE (count)	IIE (sum)	NI-ESS trusted (count)	NI-ESS all (sum)	PESE (count)	RESCUE -ESE (count)	EIE (count)	EIE (sum)	NI-ESE trusted (count)	NI-ESE all (sum)	ESS (total)	ESE (total)	ESS/ESE (ratio)
WT_Ekzon7	4	12	9	67	953.9716	27	-39.5033	1	11	52	610.2799	30	48.3464	119	94	1.27
A1050V_Ekzon7	4	14	11	71	1021.1480	30	-43.0874	1	11	52	610.2799	30	48.0324	130	94	1.38

Allele A1050V_Ekzon7 has a higher chance of exon skipping than allele WT_Ekzon7.

Şekil 3.19. Ekzon 7 varyantının *EX-SKIP* aracına göre *splice* mekanizmasına etkisi.

İnsandaki potansiyel ekzon 7 varyantlarının *splice* mekanizmasına etkilerine ilişkin HSF sonuçları Çizelge 3.5'teki gibidir. Ekzon 7'de köpek transkriptinde de sitoizinden timin nükleotidine substitüsyon gerçekleşen varyantın (insanda c.2639C>T) hem yeni donör bölge yaratması hem de yardımcı sinyallerde değişikliğe yol açması söz konusudur, bu bölgedeki diğer varyantların ise etkisiz olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.5. Ekzon 7 varyantı *Human Splicing Finder* sonuçları (Desmet ve ark., 2009).

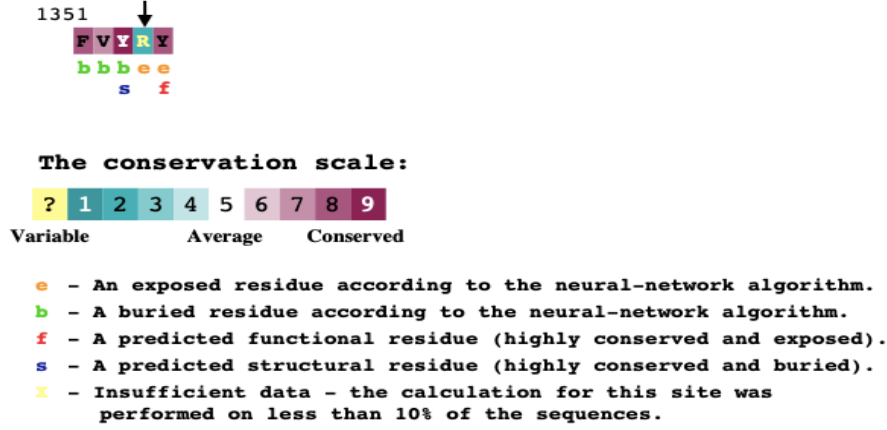
Etki sütununda ESE = *Exonic splicing enhancer* (Ekzon bölgesinde *splice*'ı kuvvetlendiren yardımcı motif); ESS = *Exonic splicing silencer* (Ekzon bölgesinde *splice*'ı baskılayan yardımcı motif).

Bölge	Varyant	Etki
Ekzon 7	c.2639C>A	<i>Splice</i> sinyallerinde anlamlı bir etki yok.
	c.2639C>G	<i>Splice</i> sinyallerinde anlamlı bir etki yok.
	c.2639C>T	ESE/ESS motif oranında anlamlı değişiklik (-2). Kriptik donör bölge aktivasyonu. <i>Splice</i> mekanizmasında potansiyel değişiklik.

3.4.3. *PALB2* Geni Ekzon 13 Varyantının Etkileri

VEP aracında ekzon 13'te tespit edilen ve düşük etkili olarak bildirilen sinonim varyantın ilk kez mevcut tez çalışmasında tespit edildiği görülmüştür.

R1354R varyantı *ConSurf* sunucusu (Ashkenazy ve ark., 2016) verilerine göre yüksek oranda korunmuş bir bölgede değildir (Şekil 3.20). Korunmuşluk derecesi 2 olarak tespit edilen arjinin rezidüsü insan PALB2 proteininde histidin rezidüsü (1184'üncü amino asit) olarak görülmektedir (The Uniprot Consortium, 2021g).



Şekil 3.20. R1354R varyantına ilişkin *ConSurf* sunucusu sonucu (Ashkenazy ve ark., 2016).

R1354R sinonim mutasyonu, zararlı sessiz mutasyonların listelendiği *dbDSM* v2.0 (Wen ve ark., 2016) veri tabanında araştırılmıştır (bkz. Şekil 3.21). *PALB2* geni için yapılan taramada dört adet zararlı sinonim mutasyon listelenmiştir. Bu mutasyonların amino asit pozisyonları incelendiğinde R1354R varyantının insanda karşılığı olan 1184'üncü amino asit pozisyonunda zararlı bir sinonim varyant bildirilmediği görülmektedir.

Database of Deleterious Synonymous Mutation

Wild: CCA TTG ACA AGA CTT GAA
Mutation: CCA TTG ACC AGA CTT GAA
Pro Leu Arg Leu

Home Search **Download** About Submit Contact us

Search Result: Gene like: PALB2

10 records per page Showing 1 to 4 of 4 entries

Disease	Gene	SNPID	GRCh38_Position	c.DNA	Protein	dbDSMscore	dbDSM_AccNum
Breast cancer	PALB2	rs180177115	16:23629231	c.2559C>T	p.Gly853=	1	DSM001486
Breast cancer	PALB2	n/a	16:23629775	c.2379C>T	p.Gly793=	1	DSM002229
Breast cancer	PALB2	n/a	16:23641110	c.48G>A	p.Lys16=	4	DSM002235
Pancreatic cancer	PALB2	n/a	16:23629231	c.2559C>T	p.Gly853=	1	DSM002603

Şekil 3.21. *PALB2* genindeki zararlı sinonim mutasyonlar; *dbDSM* v2.0 veri tabanı sonuçları (Wen ve ark., 2016).

Ekzon 13 sinonim varyantı için *AnimalTFDB3.0* (Hu ve ark., 2019) veri tabanı sonuçları Çizelge 3.6'daki gibi listelenmiştir. Bu varyantın bulunduğu bölgeye tek başına bağlanan herhangi bir TF bulunmamaktadır, ancak sinonim varyant ve 3' UTR bölgesi varyantını kapsayan dizide yalnızca yabancı allele bağlanabilen TF'ler tespit edilmiştir.

Çizelge 3.6. *AnimalTFDB3.0* veri tabanında köpek (*Canis familiaris*) türünde ekzon 13'te tespit edilen transkripsiyon faktörleri (Hu ve ark., 2019).

Wt: yabancı dizi, **Mt:** mutant dizi.

Bölge	Varyant	Wt Dizi	Mt Dizi	Wt ve Mt Dizi
Ekzon 13	c.4062C>T (Sinonim)	-	-	-
	c.4062C>T (Sinonim) ve c.4071T>C (3' UTR) varyantlarını kapsayan nükleotit dizisi	EP300	-	-
		ESR1	-	-
		KDM1A	-	-
		TCF12	-	-

Splice mekanizmalarındaki etkilere bakıldığında *EX-SKIP* sonuçlarına göre mutant dizinin yabancı diziye göre ekzon atlama ihtimali daha yüksek hesaplanmıştır (Şekil 3.22).



EX-SKIP - Results for submitted sequences

Seq	PESS (count)	FAS-ESS hex2 (count)	FAS-ESS hex3 (count)	IIE (count)	IIE (sum)	NI-ESS trusted (count)	NI-ESS all (sum)	PESE (count)	RESCUE -ESE (count)	EIE (count)	EIE (sum)	NI-ESE trusted (count)	NI-ESE all (sum)	ESS (total)	ESE (total)	ESS/ESE (ratio)
WT_Ekzon13	14	13	9	80	1523.6015	44	-59.5507	15	21	72	1060.7044	68	88.8552	160	176	0.91
MT_Ekzon13	15	13	9	79	1510.5072	44	-60.5426	15	20	66	932.8801	67	88.0453	160	168	0.95

Allele MT_Ekzon13 has a higher chance of exon skipping than allele WT_Ekzon13.

Şekil 3.22. Ekzon 13 varyantlarının *EX-SKIP* aracına göre *splice* mekanizmasına etkisi (Raponi ve ark., 2011).

MT: mutant dizi, **WT:** yabancı dizi.

HSF sonuçlarına göre ekzon 13 bölgesinde köpek transkriptinde de sitozinden timin nükleotidine substitüsyon gerçekleşen varyantın (insanda c.3552C>T) c.3552C>A varyantıyla birlikte yardımcı motiflerde değişikliğe yol açtığı, c.3552C>G

varyantının ise hem yeni akseptör bölge oluşumuna hem de yardımcı motiflerde değişikliğe yol açtığı görülmüştür (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Ekzon 13 sinonim varyantı için *Human Splicing Finder* sonuçları (Desmet ve ark., 2009). Etki sütununda ESE = *Exonic splicing enhancer* (Ekzon bölgesinde *splice*'ı kuvvetlendiren yardımcı motif); ESS = *Exonic splicing silencer* (Ekzon bölgesinde *splice*'ı baskılayan yardımcı motif).

Bölge	Varyant	Etki
Ekzon 13	c.3552C>A	ESE/ESS motif oranında anlamlı değişiklik (-2).
	c.3552C>G	ESE/ESS motif oranında değişiklik (-4). Kriptik akseptör bölge aktivasyonu. <i>Splice</i> mekanizmasında potansiyel değişiklik.
	c.3552C>T	ESE/ESS motif oranında anlamlı değişiklik (-4).

3.4.4. *PALB2* Geni 3' UTR Varyantının Etkileri

VEP aracındaki verilere göre 3'UTR bölgesi varyantı ilk kez mevcut tez çalışmasında tespit edilmiştir. Bu varyantın modifiye edici etkisi olduğu VEP veri tabanında görülmüştür.

3' UTR varyantı *AnimalTFDB3.0* (Hu ve ark., 2019) veri tabanı sonuçları Çizelge 3.8'deki gibidir.

Çizelge 3.8. *AnimalTFDB3.0* veri tabanında köpek (*Canis familiaris*) türünde 3' UTR bölgesinde tespit edilen transkripsiyon faktörleri (Hu ve ark., 2019).

Wt: yabanıl dizi, **Mt:** mutant dizi.

Bölge	Varyant	Wt Dizi	Mt Dizi	Wt ve Mt Dizi
3' UTR	c.4071T>C (3' UTR)	FOXO3	-	FOXP1
		FOXP2	-	-
		TCF7L2	-	-
	c.4062C>T (Sinonim) ve c.4071T>C (3' UTR) varyantlarını kapsayan nükleotit dizisi	EP300	-	-
		ESR1	-	-
		KDM1A	-	-
		TCF12	-	-

Splice mekanizması incelendiğinde *EX-SKIP* aracında bu bölgenin de dahil olduğu diziler kullanıldığından mutant dizi için ekzon atlama ihtimali yabancı diziye göre daha yüksek çıkmıştır. HSF sonuçları ise Çizelge 3.9’da görüldüğü gibidir. 3’ UTR bölgesinde c.*13T>A varyantı yeni akseptör bölge oluşumuna neden olmuş, diğer iki varyantın ise yardımcı motiflerinde değişiklik olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.9. 3’ UTR varyantı için *Human Splicing Finder* sonuçları (Desmet ve ark., 2009). Etki sütununda ESE = *Exonic splicing enhancer* (Ekzon bölgesinde *splice*’ı kuvvetlendiren yardımcı motif); ESS = *Exonic splicing silencer* (Ekzon bölgesinde *splice*’ı baskılayan yardımcı motif).

Bölge	Varyant	Etki
3’ UTR	c.*13T>A	Kriptik akseptör bölge aktivasyonu. <i>Splice</i> mekanizmasında potansiyel değişiklik.
	c.*13T>G	ESE/ESS motif oranında anlamlı değişiklik (-5).
	c.*13T>C	ESE/ESS motif oranında anlamlı değişiklik (-3).

3.4.5. *BRCA2* Geni İntron 2 Varyantının Etkileri

İntron 2 varyantının VEP aracında daha önce rs852122207 kodu ile kayıtlı olan modifiye edici bir varyant olduğu görülmüştür. rs852122207 kodlu varyantın verileri incelendiğinde yalnızca popülasyondaki frekansına ilişkin bilgiler bulunmaktadır. Aynı zamanda transkriptlere göre cDNA pozisyonunun değişiklik gösterdiği görülmüştür.

AnimalTFDB3.0 (Hu ve ark., 2019) veri tabanı sonuçları Çizelge 3.10’daki gibidir; yabancı dizi, mutant dizi ve her iki diziye bağlanabilen TF’ler listelenmiştir.

Çizelge 3.10. *AnimalTFDB3.0* veri tabanında köpek (*Canis familiaris*) türünde intron 2 bölgesinde tespit edilen transkripsiyon faktörleri (Hu ve ark., 2019). **Wt:** yabancı dizi, **Mt:** mutant dizi.

Bölge	Varyant	Wt Dizi	Mt Dizi	Wt ve Mt Dizi
İntron 2	c.68-104C>T	TBX2	CUX1	HOXA9
		TRIM28	NR1H2	NR2E1
			NR1H3	TP53

İnsandaki potansiyel varyantların *splice* mekanizmasındaki etkilerine bakıldığında ise HSF sonuçları Çizelge 3.11’deki gibi görülmektedir. *BRCA2* varyantı söz konusu olduğunda yalnızca c.68-105T>G varyantında yeni akseptör bölge oluşumu bildirilmiştir.

Çizelge 3.11. İntron 2 bölgesi için *Human Splicing Finder* sonuçları (Desmet ve ark., 2009).

Bölge	Varyant	Etki
İntron 2	c.68-105T>A	<i>Splice</i> sinyallerinde anlamlı bir etki yok.
	c.68-105T>G	Kriptik akseptör bölge aktivasyonu. <i>Splice</i> mekanizmasında potansiyel değişiklik.
	c.68-105T>C	<i>Splice</i> sinyallerinde anlamlı bir etki yok.

3.4.6. Protein Etkileşimleri

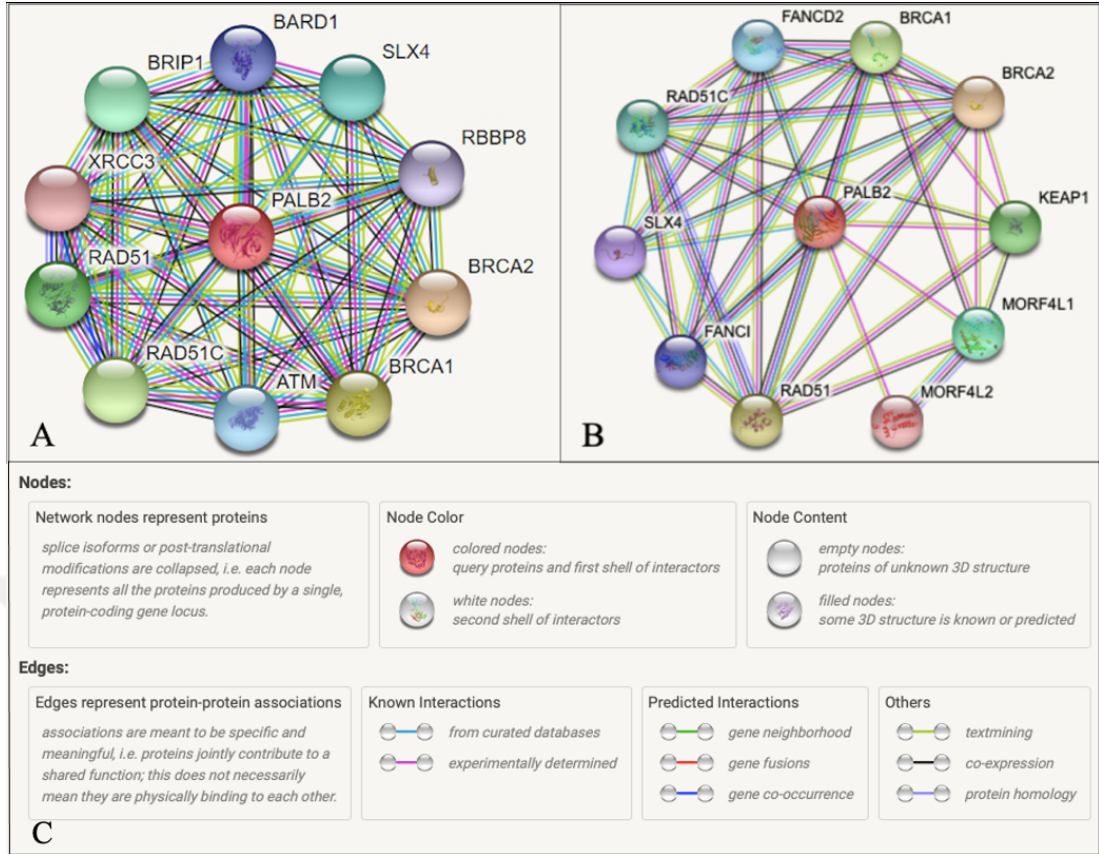
İnsanlarda PALB2 proteininin etkileşimde bulunduğu proteinlerin listesi *IntAct* (Orchard ve ark., 2014) veri tabanından elde edilmiş, listelenen genlerin (Çizelge 3.12) köpek türünde PALB2 proteiniyle etkileşim halinde olup olmadığı araştırılmıştır.

Çizelge 3.12. *IntAct* veri tabanında köpekte de PALB2 proteini ile etkileşimde olan proteinler ve etkileşim bölgeleri.

Etkileşim bölgesi *WD40* domaini olan proteinlerin isimleri kalın harflerle yazılmıştır. İnsan ve köpek amino asitlerindeki rezidü farklılıkları da kalın harflerle işaretlenmiştir.

Genler	Köpekte ilgili dizi	İnsanda ilgili dizi	Not
<i>BRCA1</i>	RDTMQ D NLIK L QQEMAEL EAVLEQHESQ	RDTMQ H NLIK L QQEMAEL EAVLEQHGSQ	Etkileşim bölgesi <i>WD40</i> domaininde değildir
BRCA2	QADLGPI S LNWFEE S LEA	K ADLGPI S LNWFEE S SEA	<i>WD40</i> domaini ile etkileşimdedir
<i>KEAP1</i>			Etkileşim bölgesi <i>WD40</i> domaininde değildir
<i>MORF4L1</i>			Etkileşim bölgesi <i>WD40</i> domaininde değildir
POLH	Bulunamadı.		<i>WD40</i> domaini ile etkileşimdedir
RAD51	DVLDNVAYARAGNTDHQ TQLLYQASAMMVESRYAL LIVDSATALYRTDYSGRGEL SARQMHLARFLRMLRLAD	DVLDNVAYARAFNTDHQ TQLLYQASAMMVESRYAL LIVDSATALYRTDYSGRGEL SARQMHLARFLRMLRLAD	<i>WD40</i> domaini ile etkileşimdedir
<i>RAD51API</i>			Etkileşim bölgeleri bulunamamıştır.
RAD51C	Bulunamadı.		<i>WD40</i> domaini ile etkileşimdedir
<i>USP11</i>			Etkileşim bölgesi <i>WD40</i> domaininde değildir
XRCC3	Bulunamadı.		<i>WD40</i> domaini ile etkileşimdedir

Ayrıca *STRING Version11.0* (Szklarczyk ve ark., 2019) veri tabanı kullanılarak *PALB2* genine ait, *Canis familiaris* ve *Homo sapiens* türlerine özgü protein-protein etkileşim (PPI) ağı oluşturulmuştur. Elde edilen PPI ağı Şekil 3.23'te sunulmuştur. Bu ağ oluşturulurken genlerin komşuluğu, füzyonu, birlikte bulunmaları, birlikte ifade edilmeleri, protein homolojileri ve literatürdeki etkileşim verilerinden yararlanılmaktadır.



Şekil 3.23. STRING veri tabanında PALB2 proteini etkileşimleri (Szklarczyk ve ark., 2019).
A: *Canis familiaris* türüne ait protein etkileşim ağı. B: *Homo sapiens* türüne ait protein etkileşim ağı. C: Lejant.

3.4.7. Varyantların İnsan Genomunda Tümör ile Olası İlişkileri

Ensembl veri tabanında köpek ve insan türlerine ait *PALB2* ve *BRCA2* genlerinin hizalanması ile (Ensembl, 2021b ve Ensembl, 2021c) elde edilen insan genomu pozisyonları, potansiyel varyantlar ve bu bölgelerin VEP'te (McLaren ve ark., 2016) araştırılmasında kullanılmış olan HGVS (*Human Genome Variation Society*) tanımlayıcıları Çizelge 3.13'te görüldüğü gibi bulunmuştur.

Çizelge 3.13. VEP taramasında kullanılan HGVS tanımlayıcıları.

Olası tüm varyantlar çizelgede ayrı ayrı yazılmak yerine IUPAC kodlarıyla yazılmış ancak VEP aracında her bir nükleotit listelenerek aratılmıştır. D= G/A/T, H= A/C/T, V= G/C/A.

Gen	Bölge	Köpekte genomik pozisyon (yön)	İnsanda genomik pozisyon (yön)	VEP taramasında kullanılan HGVS tanımlayıcıları
PALB2	İntron 6	g.22220063C>G (+)	g.23629196G (-)	ENST00000261584.9:c.2586+8G>H
	Ekzon 7	g.22223480C>T (+)	g.23626345C (-)	ENST00000261584.9:c.2639C>D
	Ekzon 13	g.22237511C>T (+)	g.23603468C (-)	ENST00000261584.9:c.3552C>D
	3' UTR	g.22237520T>C (+)	g.23603446T (-)	ENST00000261584.9:c.*13T>V
BRCA2	İntron 2	g.7794120C>T (-)	g.32318972T (+)	ENST00000380152.7:c.68-105T>V

3.4.7.1. PALB2 İntron 6

İntron 6 varyantının bulunduğu pozisyonadaki yabancı diziye ait nükleotit iki tür arasında farklıdır (Şekil 3.24).

```
Dog 6:22219995 AGAGCTTCCTGCTTGTCAAAGCTCAAACCCAGGCCACCTCCAATTGGTTTCAAAGTTAAA 6:22220054
Human 16:23629264 AGAGCTTCCTGCTTGTGATAGCATAAACCCAGGCCAACCTACAATTGGTTTTCAGAGTTAAA 16:23629205

Dog 6:22220055 GGTGAGAACTGCTGTTCCATTAT-GTGTCTTGTGCTTACATGTAAAAAATTTAATGAATT 6:22220113
Human 16:23629204 GGTGAGAACTGCTGTTCCATTATGTCAGTGTCTCGTGTCTTACATATGAAACCTTAATG---- 16:23629149

Dog 6:22220114 GCTAGGAAAAATTGAGAAGAATTGATCTTAACACTACCCAGGCGTTCCCTCATTTCTTAA 6:22220173
Human 16:23629148 -----AACTGAAAGAATTGAGTCATATAGCT-----TCTGTTC---- 16:23629114
```

Şekil 3.24. İntron 6'da tespit edilen varyantın pozisyonu (Ensembl, 2021b).

İnsan intron 6 potansiyel varyantları VEP'te düşük etkili *splice* bölgesi varyantları olarak görülmüştür. İnsanda bu pozisyonda rs1060504708 kodlu TNP'nin (c.2586+8G>A) bir fenotip-hastalık ile ilişkilendirildiği tespit edilmiştir (Ensembl, 2021n). Bu varyant primer transkript, alternatif transkript ve NMD (*nonsense-mediated decay*) transkriptinde görülmektedir.

rs1060504708 (Ensembl, 2021o), kalıtsal kanser yatkınlık sendromu ile ilişkilidir. Klinik anlamı düşük ve benign olma ihtimali yüksek bir varyanttır.

3.4.7.2. PALB2 Ekzon 7

Ekzon 7 varyantının bulunduğu pozisyondaki yabancı diziye ait nükleotit iki tür için de aynıdır (Şekil 3.25).

Dog	6:22223410	TGTTGCTATTTATTCAGAAATCCTTCTGGTTCCTGTTTCAGTGGATGTGAGTGCCATGTGG	6:22223469
Human	16:23626411	TGCCA---TTGTGTCAGAAATCCTTTCAGGTTCTGTTCCGTAGATGTGAGTGCCATGTTT	16:23626356
Dog	6:22223470	TGGGAAATAGCCGGTTTCAAAGAGCCATGTATCATAACTGCCTGTGAATATGTAGTTTCT	6:22223529
Human	16:23626355	TGGGAAAGAGCCGGTTGTAAAGAGCCATGTATCATAACTGCTTGCAGATGTAGTTTCT	16:23626296
Dog	6:22223530	CTTTGGAAACCTCTCAATACTTTCAGTGGGAAAACTTTATTCCTGGCACTTTACAGAG	6:22223589
Human	16:23626295	CTTTGGAAAGCTCTGGATGCTTGGCAGTGGGAAAACTTTATACCTGGCACTTCGCAGAG	16:23626236

Şekil 3.25. Ekzon 7'de tespit edilen varyantın pozisyonu (Ensembl, 2021b).

İnsan ekzon 7 potansiyel varyantları dört farklı transkriptte görülmektedir. Primer transkript ve alternatif transkriptte tüm varyantlar orta derecede etkili yanlış anlam mutasyonu olarak görülmektedir. ENST00000566069.5 transkriptinde üç varyant da *upstream* gen varyantı olarak, NMD transkriptinde ise 3' UTR varyantı ve NMD transkript varyantı olarak görülmektedir. Her iki transkriptte varyantlar modifiye edici olarak sınıflandırılmıştır. Fenotip ve hastalık sütunu incelendiğinde tüm varyantların en az bir fenotip veya hastalıkla ilişkili olduğu, bir varyantın (c.2639C>A) ise tüm transkriptlerde bir fenotip ve bir hastalıkla ilişkilendirildiği görülmektedir.

Primer transkriptteki c.2639C>G varyantı haricindeki tüm varyantların *SIFT* skorları 0 (zararlı) olarak hesaplanmış, bu varyantın *SIFT* skoru ise 0,01 (zararlı) olarak hesaplanmıştır. c.2639C>A varyantının *PolyPhen* skoru ENST00000261584.9 ve ENST00000568219.5 transkriptleri için 0,956 olarak (zararlı olma ihtimali oldukça yüksek) hesaplanmıştır. c.2639C>G varyantının *PolyPhen* skoru aynı transkriptler için 0,935 (zararlı olma ihtimali oldukça yüksek) olarak hesaplanmıştır (Ensembl, 2021g). Köpektaki nükleotit değişikliğinin insandaki karşılığı olan c.2639C>T varyantının *PolyPhen* skorları her iki transkript için 0,881 (zararlı olması muhtemel) olarak hesaplanmıştır.

İnsanda bu pozisyonda rs1597085237 TNP ve COSV55166669 somatik TNP kayıtları mevcuttur. Tüm transkriptlerde bildirilen rs1597085237 (Ensembl, 2021r)

incelendiğinde, fenotip ve hastalık verilerinde doğrulanmamış ve güvenilirliği düşük olarak bildirilmesine karşın ailesel meme tümörü ile ilişkilendirildiği görülmektedir. COSV55166669 ise endometriyal tümör ile ilişkili bulunmuştur (Ensembl, 2021d).

Köpek PALB2 proteininde A1050V varyantı insan PALB2 proteininde 880'inci rezidüye denk gelmektedir (The Uniprot Consortium, 2021a). Amino asit dizilerinde 880'inci pozisyona ilişkin dört adet varyant bildirildiği görülmüştür. Bu kayıtlardan birisi kodonun üçüncü nükleotitinde gerçekleşen sinonim varyantlara (rs752928633), diğeri ise kodonun ilk nükleotitinde gerçekleşen A880D yanlış anlam mutasyonuna ilişkindir (daha önce belirtilen rs1597085237 ve COSV55166669 kayıtları). rs752928633 (Ensembl, 2021s) sinonim varyantlarının ailesel meme tümörü ve kalıtsal kanser predispozisyonu sendromuyla ilişkili bulundukları ve insanda benign olabilecekleri bildirilmiştir.

3.4.7.3. *PALB2* Ekzon 13

Ekzon 13 varyantının bulunduğu pozisyondaki yabancı diziye ait nükleotit iki tür için de aynı görünmektedir (Şekil 3.26).

Dog	6:22237436	GTCTTTGTAAATGGTCAGGTACAGATCTCATTGCTGGCTGGACAAAAGATGAAA	6:22237495
Human	16:23603543	GTCTTTGTGAAATGGTCGGGTACAGACTCTCATTGCTGGCTGGACAAAAGATGAAA	16:23603484
Dog	6:22237496	TATATTTGTATACCGCTACTGATA-----TGAAAACACAGCGTTCTGGATTT	6:22237542
Human	16:23603483	TATATTTGTATACCACTATTCTAAGTTAGGGTAAAGTGAAAACACAATTTCTGGA---	16:23603427
Dog	6:22237543	TTTTTTTTTTGACCAATTAGTATTTTTAGAGTTGTAGCTATAAAGG---ATATCTGGG	6:22237599
Human	16:23603426	----TATATTGGCCTCTTAGTATTTTTGGAGTTTAAATATAAAGGAGAAATATCTGAA	16:23603371

Şekil 3.26. Ekzon 13'te tespit edilen varyantın pozisyonu (Ensembl, 2021b).

Ekzon 13 potansiyel varyantlarının üç farklı PALB2 transkriptinde görülmesi söz konusudur. Primer transkript ve alternatif transkriptte (ENST00000261584.9 ve ENST00000568219.5) c.3552C>A ile c.3552C>G varyantları yanlış anlam mutasyonu olarak sınıflandırılmış ve orta derecede etkili varyantlar oldukları bildirilmiştir. c.3552C>T varyantı ise bu iki transkriptte düşük etkili sinonim mutasyondur. Tüm varyantlar ENST00000566069.5 transkriptinde 3' UTR varyantı olarak modifiye edici etkiye sahip olarak sınıflandırılmıştır. Fenotip ve hastalık bölümüne bakıldığında insan

genomunda bu varyantlar için bildirilmiş herhangi bir hastalık ilişkisi görülmemektedir (Ensembl, 2021f).

R1354R sinonim varyantı insanda 1184'üncü rezidüye denk gelmektedir (The Uniprot Consortium, 2021a). R1354R varyantının *ConSurf* verilerine göre yüksek oranda korunmuş bir bölgede olmadığı daha önce belirtilmiştir. Köpekte ilgili pozisyon arjinin rezidüsüyken, insana ait proteindeki rezidü histidindir. İnsan PALB2 proteininin 1184'üncü pozisyonundaki varyantlar *Ensembl* veri tabanından elde edilmiştir (McLaren ve ark., 2016).

1184'üncü pozisyonunda rs1597061743 ve rs770692850 TNP'leri ile COSV55168966 somatik TNP'si bulunmaktadır. İlk kayıt timin delesyonu ile çerçeve kayması mutasyonuna neden olan rs1597061743 varyantıdır. Timin delesyonu ile meydana gelen çerçeve kayması ve erken *stop* kodonu oluşumunun ailesel meme kanseri ve kalıtsal kanser predispozisyonu sendromuyla ilişkili olduğu görülmüştür (Ensembl, 2021q). rs770692850 varyantında histidin rezidüsünün tirozine dönüştüğü görülmektedir ve bu varyant kalıtsal kanser predispozisyonu sendromu ile ilişkilidir (Ensembl, 2021t). COSV55168966 somatik varyantının ise akciğer tümöründe görüldüğü bildirilmiştir (Ensembl, 2021e).

3.4.7.4. PALB2 3' UTR Bölgesi

3' UTR (*Untranslated region*) varyant pozisyonundaki yabancı nükleotit dizisi her iki türde de aynı görünmektedir (Şekil 3.27).

Dog	6:22237436	GTCCTTTGTTAAATGGTCAGGTACAGATTCTCATTGCTGGCTGGACAAAAGATGGAAA	6:22237495
Human	16:23603543	GTCCTTTGTGAAATGGTCGGGTACAGACTCTCATTGCTGGCTGGACAAAAGATGGAAA	16:23603484
Dog	6:22237496	TATATTTGTATACCGCTACTGATA-----TAAAAACACAGCGTTCTGGATTT	6:22237542
Human	16:23603483	TATATTTGTATACCACTATTCATAAGTTAGGGTAAAGTAAAAACACAATTTCTGGA---	16:23603427
Dog	6:22237543	TTTTTTTTTTGACCAATTAGTATTTTTAGAGTTGTAGCTATAAAGG---ATATCTGGG	6:22237599
Human	16:23603426	----TATATTGGGCCTCTTAGTATTTTTTGGAGTTTAAATATAAAGGAGAATATCTGAA	16:23603371

Şekil 3.27. 3' UTR bölgesinde tespit edilen varyantın pozisyonu (Ensembl, 2021b).

Potansiyel varyantların PALB2 proteinine ait üç transkriptte de modifiye edici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Her ne kadar listelenen verilerde mevcut varyantlar ve fenotip ve hastalık ilişkisi sütunlarında herhangi bir bilgi verilmemiş olsa da transkriptlerde ilgili bölge kontrol edildiğinde varyant pozisyonunu da kapsayan rs1567204889 kodlu *indel* varyantının bulunduğu görülmüştür (Ensembl, 2021a). rs1567204889 kalıtsal kanser predispozisyon sendromuyla ilişkilidir (Ensembl, 2021p).

3.4.7.5. *BRCA2* İntron 2

BRCA2 geni intron 2 varyantı pozisyonundaki yabancı nükleotit dizileri iki tür arasında farklılık göstermektedir (Şekil 3.28).



```

Human 13:32318867 GCCATCTTGTAACCTTTGTGAACTCTTGTTACACCTTCTATAGATTGCGAAGAGAATGG 13:32318926
Dog 25: 7794219 --TACCTTGTAACCTTTGTAAACT---GTTATACCTTGCTACAGATTGAAAGGAGAATAG 25: 7794165

Human 13:32318927 ATTAATGATCTTGTTTAATTAATATGCTTAACAAAAGTAATCTTAGTCAAGATCTTAA 13:32318986
Dog 25: 7794164 GTTAATAATCTTGTTTAATTAATATGCTTTAACAAA-GTAATCTTCAGTCAAAATGTCAA 25: 7794106

Human 13:32318987 GCATTTTTTTC---TTATGATCTTTAACTGTTCTGGGTCACAAATTGTCTGTCACCTGG 13:32319043
Dog 25: 7794105 GCGTCCTTTTCTGTATTATGATTTTA-----CAGACTCATGAACCTTACCTGTCACCTGA 25: 7794052

```

Şekil 3.28. *BRCA2* intron 2'deki g.7794120C>T varyantının pozisyonu (Ensembl, 2021c).

Potansiyel varyantlar dördü protein kodlamada görev yapan, biri ise NMD transkripti olan beş transkriptte de modifiye edici etki göstermektedir. *PALB2* genindeki intron bölgesinden farklı olarak bu pozisyon için yapılan analizlerde varyantların *splice* mekanizmasına etkilerine ilişkin veriler bulunduğu görülmüştür. İlgili pozisyon için bildirilen herhangi bir varyanta ya da fenotip ve hastalık verisine rastlanmamıştır. c.68-105T>A varyantları için tüm transkriptlerde akseptör kazanımı delta pozisyonu 16, akseptör kaybı delta pozisyonu 3, donör kazanımı delta pozisyonu -9, donör kaybı delta pozisyonu ise -28 olarak bildirilmiştir. c.68-105T>C varyantı için tüm transkriptlerde akseptör kazanımı delta pozisyonu 16, akseptör kaybı delta pozisyonu 8, donör kazanımı delta pozisyonu -9, donör kaybı delta pozisyonu ise -28 olarak ifade edilmiştir. c.68-105T>G varyantı için tüm transkriptlerde akseptör kazanımı delta pozisyonu 1, akseptör kaybı delta pozisyonu -9, donör kazanımı delta pozisyonu 1, donör kaybı delta pozisyonu ise -9 olarak hesaplanmıştır. *Splice*

mekanizmasına ilişkin diğer verilerde ise herhangi bir değişiklik görülmemiştir (Ensembl, 2021m).

3.5. *PALB2* Genine İlişkin DnaSP ver. 6.12.03 Verileri

DnaSP ver. 6.12.03 programında 20 KMT hastası birey ve bir sağlıklı bireye ait sekanslar ile ENSCAFG00000030772 *Ensembl* kodlu köpek referans genomuna ait *PALB2* geni verilerinden elde edilmiş sonuçlara göre G+C içeriği 0,407 olarak hesaplanmıştır. Pozisyonlardaki toplam mutasyon sayısı için yapılan analizlerde değişken bölge sayısı (S) 4; toplam mutasyon sayısı (Eta) 4 olarak hesaplanmıştır. Bölge başına nükleotit çeşitliliği (Pi) 0,00071; Pi'nin örnekleme varyansı 0,0000000; Pi'nin standart sapması ise 0,00009 olarak hesaplanmıştır. Nükleotit farklılıklarının ortalama sayısı (k) 1,12368 olarak; sekans başına S'den theta (Theta-W) 0,91954; bölge başına S'den theta (Theta-W) ise 0,00058 olarak hesaplanmıştır. Haplotip sayısı 8, haplotip çeşitliliği ise 0,728 olarak hesaplanmış, haplotip çeşitliliğinin varyansı 0,00236; standart sapması ise 0,049 olarak tespit edilmiştir.

Haplotip dağılımı Çizelge 3.14'teki gibi görülmektedir. Bireylerde varyantlar homozigot veya heterozigot kalıtım gösterebildiği için diploid diziler haploid dizilere ayrıştırıldıktan sonra bazı bireyler tek bir haplotip grubunda (homozigot bireyler), bazı bireyler ise iki haplotip grubunda birden (heterozigot bireyler) bulunabilmektedir.

Çizelge 3.14. Haplotipler ve DNA dizilerinin haplotiplere göre dağılımı.

ENSCAFG00000030772: köpek referans genomu *PALB2* geni, S: sağlıklı birey, KMT: meme tümörü hastası bireyler.

Haplotip Dağılımı							
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
ENSCAFG00000030772	KMT 1	KMT 2	KMT 2	KMT 3	KMT 5	KMT 12	KMT 13
S 32	KMT 3	KMT 5	KMT 11			KMT 31	KMT 21
KMT 6	KMT 10	KMT 11					KMT 29
KMT 10	KMT 12						
KMT 16	KMT 13						
KMT 17	KMT 20						
KMT 20	KMT 24						
KMT 21	KMT 25						
KMT 22	KMT 29						
KMT 26	KMT 31						
KMT 30							

Çizelge 3.15'te ise Çizelge 3.14'teki haplotiplerin nükleotit dizileri görülmektedir.

Çizelge 3.15. *PALB2* geni *WD40* domaini nükleotit dağılımları.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
İntron 6 (c.3096+8C>G)	.	G	G	G	G	.	.	G
Ekzon 7 (c.3149C>T)	.	.	.	.	.	.	.	T
Ekzon 13 (c.4062C>T)	.	.	T	.	T	.	T	.
3' UTR bölgesi (c.4071T>C)	.	.	.	C	C	C	C	.

4. TARTIŞMA

Homolog rekombinasyon aracılı DNA tamir mekanizması (HR), DNA’da meydana gelen çift zincir kırıklarının hatasız şekilde tamir edilebilmesi için kritik önem taşımaktadır. Bu mekanizmada görevli proteinlerin işlevini yerine getirememesi, DNA’da delesyon, insersiyon, translokasyon gibi bir dizi mutasyonun birikimine, hasarlı genlerin işlev ve ifadelerinde değişikliklere neden olarak, kanser gelişimini tetikleyebilmektedir (Abass ve ark., 2016; Hodgson ve Turashvili, 2020; O’Kane ve ark., 2017 ve Trenner ve Sartori, 2019). HR mekanizmasında görevli birçok gen olmasına karşın BRCA2, RAD51 ve PALB2 proteinlerinin oluşturdukları kompleksin tümör baskılayıcı etkisi bilinmektedir. Bu kompleksin işlevinde meydana gelen bozuklukların başta meme tümörü olmak üzere farklı kanserlerin gelişimine neden oldukları bildirilmiştir (Deveryshetty ve ark., 2019; Hodgson ve Turashvili, 2020; Nepomuceno ve ark., 2017; Park ve ark., 2014 ve Prakash ve ark., 2015). Çalışma kapsamında araştırılan PALB2 proteininin *WD40* domaini, BRCA2 ve RAD51 proteinleri ile etkileşime geçen kritik bir yapıdır (Ducy ve ark., 2019; Oliver ve ark., 2009; Siaud ve ark., 2011 ve Zhang ve ark., 2009a). İnsanlarda PALB2 proteini mutasyonlarının meme tümörü açısından önemi bilinmekte ve meme tümörü hastaları ve risk grupları için panel testleri ile rutin olarak kontrol edilmektedir (Cock-Rada ve ark., 2018; Schroeder ve ark., 2015; Slavin ve ark., 2015 ve Yao ve ark., 2020). Bu tümör baskılayıcı kompleksin bir parçası olan BRCA2 proteinindeki mutasyonların insanlarda olduğu gibi köpeklerde de meme tümörü gelişiminde etkili olduğu bildirilmiştir (Borge ve ark., 2011; Enginler ve ark., 2014; Kaszak ve ark., 2018; Ozmen ve ark., 2017a ve Ripoli ve ark., 2016). Köpeklerde RAD51 proteini ve meme tümörü arasındaki ilişki de araştırılmıştır (Canadas ve ark., 2018; Ozmen ve ark., 2017b ve Uemura ve ark., 2019). Köpek türünde *PALB2* geni *WD40* domaininde bir ilk niteliğindeki bu çalışma kapsamında köpek meme tümörü (KMT) hastası bireylerde bir intronik varyant; biri yanlış anlam mutasyonu, biri sinonim mutasyon olmak üzere iki ekzonik varyant ve bir adet 3’ UTR varyantı tespit edilmiştir. Tartışma bölümünde öncelikle örneklemin değerlendirilmesi, tespit edilen varyantların etkileri,

BRCA2, RAD51 ve PALB2 kompleksinin bütüncül şekilde ele alınması, son olarak insan ve köpek türlerinde karşılaştırmalı olarak meme tümörü ve *WD40* domainindeki mutasyonların etkilerine değinilmiştir.

4.1. Örneklem Grubunun Varyantlar Açısından Değerlendirilmesi

Örneklem grubu oluşturulurken proje bütçesi nedeni ile VF1311 kodlu proje kapsamında kullanılan tüm bireylere ait biyolojik materyal kullanılamamış, örneklem grubu daraltılmak zorunda kalınmıştır. KMT hastası (n=20) ve sağlıklı bireye (n=1) ait kan örneklerinin seçiminde Türkiye’de KMT’ye ilişkin yapılmış çalışmalar göz önünde bulundurulmuştur. Türkiye’de malign tümörler, benign tümörlerin yaklaşık iki katı oranında görülmektedir. En sık karşılaşılan malign tümörlerin, malign miks karsinoma, kompleks adenokarsinoma, karsinosarkoma, solid karsinoma, anaplastik karsinoma ve tübüler adenokarsinoma vakaları olduğu; benign tümörlerin ise benign miks tümör, papiller kistik adenoma ve fibroadenoma vakaları olduğu; diğer tümör histopatolojilerinin ise nadir olarak görüldüğü bildirilmiştir (Atalay Vural ve Aydın, 2001; Erer ve Kıran, 1993 ve Gülçubuk ve Gürel, 2003). Bu verilere göre örnek dağılımı malign miks karsinoma (n=3), kompleks adenokarsinoma (n=2), karsinosarkoma (n=2), solid karsinoma (n=2), anaplastik karsinoma (n=2), tübüler adenokarsinoma (n=2), benign miks tümör (n=3), papiller kistik adenoma (n=2) ve fibroadenoma (n=2) olarak belirlenmiştir. VF1311 kodlu projede sağlıklı bireylerden elde edilmiş DNA izolatları ile çalışılmıştır. 33 ve 35 kodlu bireylerde sırasıyla lipoma ve fibroadenoma görülmüştür. Fibroadenomalar benign neoplaziler sınıfında bulunmaktadır (Goldschmidt ve ark., 2011). Lipoma ise KMT vakalarında yapılan tümör sınıflandırması içinde bulunmamaktadır (Goldschmidt ve ark., 2011), ancak insan çalışmalarına göre meme dokusunda en sık görülen ve diğer bölgelerdeki lipomalardan ayırt edilemeyen adiposit bir tümördür ve tek taraflı, soliter, benign, asemptomatik bir tümör olarak kabul edilmektedir (Rowe ve ark., 2017 ve Stolnicu ve ark., 2015). Bu nedenle her iki örnek de örneklem dışı bırakılmıştır. KMT hastası bireylerde ise kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildiği için herhangi bir karışıklığa mahal verilmemiştir.

Tespit edilen varyantların tümör histopatolojilerine göre dağılımları Çizelge 4.1'deki gibi görülmektedir. Çizelgede, kırmızı dolgu rengi homozigot mutant genotipi, sarı dolgu rengi heterozigot genotipi, beyaz renk ise homozigot yabani genotipi ifade etmektedir.

Çizelge 4.1. *PALB2* varyantlarının tümör histopatolojilerine göre dağılımı.
Kırmızı: homozigot mutant genotip, Sarı: heterozigot genotip, Beyaz: homozigot yabani genotip.

			İntron 6	Ekzon 7	Ekzon 13	3' UTR
		Örnek	c.3096+8C>G	c.3149C>T	c.4062C>T	c.4071T>C
Malign	Malign miks karsinoma	16				
		17				
		20				
	Kompleks adenokarsinoma	1				
		21				
	Karsinosarkoma	2				
		3				
	Solid karsinoma	5				
		11				
	Anaplastik karsinoma	6				
		12				
	Tübüler adenokarsinoma	10				
		13				
Benign	Benign miks tümör	26				
		29				
		30				
	Papiller kistik adenoma	22				
		24				
	Fibroadenoma	25				
		31				
Sağlıklı	-	32				

Çizelge 4.1'de intron 6 varyantı toplam 14 örnekte tespit edilmiştir. Örneklerin 10'u malign karakterde, dördü ise benign karakterdedir. Malign miks karsinoma vakalarının (n=3) yalnızca birinde heterozigot olarak görülmüştür. Kompleks adenokarsinoma (n=2), solid karsinoma (n=2) ve tübüler adenokarsinoma (n=2) vakalarının yarısında homozigot, yarısında ise heterozigot olarak görülmektedir. Karsinosarkoma vakalarının (n=2) tamamında homozigot olarak görülmektedir. Anaplastik karsinoma vakalarının (n=2) ise yalnızca birinde heterozigot olarak

görülmektedir. Benign tümörler incelendiğinde benign miks tümör vakalarının (n=3) ve papiller kistik adenoma (n=2) vakalarının birinde homozigot olarak görülmüştür. Fibroadenoma vakalarının (n=2) ise yarısında homozigot, yarısında ise heterozigot olarak görülmektedir. Ekzon 7 varyantı örneklem grubunda toplam üç bireyde heterozigot olarak tespit edilmiştir. Örneklerden ikisi malign, biri benign karakterdedir. Malign örneklerden biri kompleks adenokarsinoma, diğeri ise tübüler adenokarsinoma örneğidir. Benign örneğin ise benign miks tümör olduğu görülmektedir. Ekzon 13 ve 3' UTR bölgesi varyantları tespit edildikleri bireylerde bir arada görülmektedir (c.4062C>T ve c.4071T>C). İki varyantın pozisyonları göz önünde bulundurulduğunda muhtemelen haplotip oldukları görülmektedir, ancak plazmite aktarım yapılarak DNA dizilemesi yapılmadığı için bu iddia doğrulanamamıştır. Bu varyantların beşi malign örneklerde, biri ise benign örneklerde tespit edilmiştir. Karsinosarkoma (n=2) ve solid karsinoma (n=2) örneklerinin tamamında; anaplastik karsinoma (n=2) örneklerinin ise yarısında tespit edilmiştir. Benign tümör örneklerinden ise yalnızca fibroadenoma (n=2) örneklerinin yarısında tespit edilmiştir.

İnsanlarda özellikle ailesel meme tümörlerine yatkınlıkla ilişkilendirilmiş genler ve tümör histopatolojileri arasındaki bağlantıyı ortaya çıkarmak amacıyla yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur, ancak *PALB2* geni mutasyonlarının neden olduğu spesifik bir histopatolojiye ilişkin yeterli kanıt bulunmamaktadır (Hodgson ve Turashvili, 2020). Tez çalışması kapsamında ise örneklem grubunda kısıtlı sayıda örnek bulunması nedeniyle varyant-histopatoloji ilişkilendirmesi yapılması mümkün değildir. Ancak intron 6 varyantı için kompleks adenokarsinoma (n=2), solid karsinoma (n=2), tübüler adenokarsinoma (n=2), karsinosarkoma vakalarının (n=2) ve fibroadenoma vakalarının incelenmesi daha geniş kapsamlı çalışmalarda önerilebilir. Benzer şekilde ekzon 13 ve 3' UTR varyantları için karsinosarkoma ve solid karsinoma vakaları incelenebilir.

Çizelge 4.2'de malign tümörlere ait histolojik dereceler ve varyantların derecelere göre dağılımı bulunmaktadır. Örneklerin histolojik derecelere göre dağılımı dengeli değildir. Derece I olarak değerlendirilmiş yalnızca iki örnek, derece II olarak

değerlendirilmiş sekiz örnek, derece III olarak değerlendirilmiş ise yalnızca üç örnek bulunmaktadır. İntron 6 varyantı derece I'deki tüm örneklerde (n=2), derece II'deki örneklerin (n=8) altısında, derece III'teki örneklerin (n=3) ise ikisinde tespit edilmiştir. Ekzon 7'deki varyantların birisi derece I, diğeri ise derece II örneklerinden birinde tespit edilmiştir. Derece III'teki bireylerde ekzon 7 varyantı görülmemektedir. Ekzon 13 ve 3' UTR varyantları derece I örneklerinde görülmemiştir. Derece II örneklerinin (n=8) üçünde; derece III örneklerinin ise (n=3) ikisinde bu varyantlar tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. *PALB2* varyantlarının histolojik derecelere göre dağılımı.

Kırmızı: homozigot mutant genotip, Sarı: heterozigot genotip, Beyaz: homozigot yabani genotip.

Histolojik Derece	Örnek	İntron 6	Ekzon 7	Ekzon 13	3' UTR
		c.3096+8C>G	c.3149C>T	c.4062C>T	c.4071T>C
I	10				
	13				
II	1				
	2				
	5				
	11				
	16				
	17				
	20				
	21				
III	3				
	6				
	12				

İnsanlarda yapılan meme tümörü araştırmalarında, *PALB2* geni ve tümörün histopatolojik derecesi ile ilgili bağlantı kurulabilen çalışmaların sayısı kısıtlıdır. Heikkinen ve ark. (2009), *PALB2* geninde tespit ettikleri 1592delT mutasyonunun fenotipik özelliklerini inceledikleri çalışmada, tümörlerin %9,4'ünün derece I, %37,5'inin derece II ve %53,1'inin derece III olarak sınıflandırıldığını bildirmişlerdir. Li ve ark. (2018), meme tümörü hastalarında, *PALB2* mutasyonlarını değil, gen ifadesindeki değişiklikleri incelemiş, *PALB2* ifadesindeki artış ile tümörün histopatolojik derecesi arasında pozitif korelasyon görüldüğünü bildirmişlerdir. Tezin bulgularında varyant pozisyonlarının bulunduğu yabani ve mutant dizilere farklı

TF'lerin bağlanabileceğine değinilmişti. Bu durumun gen ifadesini etkilemesi ve tümör histopatolojik derecesi ile ilişkilendirilebilmesi olanaklar dahilinde görülmektedir.

Çizelge 4.3'te varyantların akciğer metastazis durumuna göre dağılımı görülmektedir ancak metastazis görülen örnek sayısı (n=3) oldukça kısıtlıdır ve varyantlar ile metastazis durumu arasında çıkarımda bulunmak bu nedenle güçtür. Metastazis görülen hastaların tümünde intron 6 varyantı, ikisinde ise ekzon 13 ile 3' UTR varyantlarının tespit edildiği ve ekzon 7 varyantına rastlanmadığı söylenebilir.

Çizelge 4.3. *PALB2* varyantlarının akciğer metastazis durumuna göre dağılımı.
Kırmızı: homozigot mutant genotip, Sarı: heterozigot genotip, Beyaz: homozigot yabancıl genotip.

Akciğer Metastazisi	Örnek	İntron 6	Ekzon 7	Ekzon 13	3' UTR
		c.3096+8C>G	c.3149C>T	c.4062C>T	c.4071T>C
Var	3				
	12				
	20				
Yok	1				
	2				
	5				
	6				
	10				
	11				
	13				
	16				
	17				
	21				
	22				
	24				
	25				
	26				
	29				
	30				
	31				

İnsan meme tümörü vakalarında metastazis bulguları genellikle lenf düğümü göz önüne alınarak bildirilmiş, bazı yayınlarda hangi doku ve organda olduklarına dair net bilgi verilmemiştir. Heikkinen ve ark. (2009), *PALB2* geninde tespit ettikleri 1592delT mutasyonunun fenotipik özelliklerini inceledikleri çalışmada hastaların %97'sinde metastazis görülmediğini, yalnızca %3'ünde metastazis görüldüğünü bildirmişlerdir. Zhou ve ark. (2020), *PALB2* geninde germ hattı mutasyonu bulunan meme tümörü hastalarının %3,13'ünde uzak dokulara metastazis görüldüğünü bildirmiştir ancak bu veri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Lefebvre ve ark. (2016), insan meme tümörü vakalarında yaptıkları retrospektif çalışma ile metastatik meme tümörü vakalarında erken yaşta meydana gelen meme tümörü vakalarına nazaran *PALB2* geninde daha sık mutasyon görüldüğünü bildirmiştir. Paul ve ark. (2020) da benzer şekilde *PALB2* germ hattı mutasyonlarının metastazis ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Germ hattındaki patolojik mutasyonlara bağlı olarak meydana gelen meme tümörü vakaları ve erken yaşta meme tümörü tanısı konulması arasındaki ilişki insanlarda yaygın olarak araştırılan konulardan birisidir (Evans ve ark., 2021). Köpeklerde yaşam süresinin insanlara göre yaklaşık yedi kat kısa olduğu bilimsel olarak desteklenmemekte; ırk, vücut büyüklüğü ve akrabalık derecesine göre değişiklik göstermektedir (Galis ve ark., 2007; Patronek ve ark., 1997 ve Yordy ve ark., 2020). *American Kennel Club* (AKC) web sitesinde (<https://www.akc.org>) kinoloji federasyonunca kabul edilen ırkların ortalama yaşam süreleri, cüsseleri gibi bilgilere ulaşılabilmekte ve güncel olarak kullanılan köpek-insan yaşı kıyaslama tablosuna erişilebilmektedir (The American Kennel Club, 2021). Örneklemdaki tüm bireylere ait ırk ve yaş verileri değerlendirilerek, AKC'deki ağırlıklarına göre sınıflandırılmış ve insanlardaki yaklaşık yaş grupları bu sayede değerlendirilmiş ve Çizelge 4.4 oluşturulmuştur. Melez ırklar için genellikle orta veya büyük cüsseli oldukları göz önünde bulundurularak insan yaşına dönüştürme işlemi yaş aralığı şeklinde verilmiştir. *English setter* ve kangal ırkları için ise kilolarına ilişkin kayıt bulunmadığından bu örneklerle ait veriler sırasıyla orta-büyük ve büyük-dev ırk sınıfına girebilecekleri ihtimali üzerinden yaş aralığı şeklinde verilmiştir.

En genç bireyin 32 numaralı sağlıklı *Pug* ırkı örnek olduğu ve örneklemin insan yaşı ile 45 yaş ve üzerindeki orta yaş üstü ve yaşlı bireylerden oluştuğu görülmektedir. Tablodaki genel dağılım incelendiğinde, *PALB2* varyantlarının dağılımının yaş ile ilişkisine dair herhangi bir çıkarım yapılamayacağı, örneklemin küçüklüğü ve genç bireylerin bulunmaması nedeniyle, bu konunun değerlendirilebilmesi için daha geniş bir örneklem ve daha geniş yaş gruplarında çalışılması gerektiği görülmektedir.

Çizelge 4.4. *PALB2* varyantlarının yaş (köpek yaşı) gruplarına göre dağılımı.

* işareti melez bireyleri göstermektedir. Bu bireylerde cüsse tahmini olarak seçilmiştir. Kırmızı: homozigot mutant genotip, Sarı: heterozigot genotip, Beyaz: homozigot yabancıl genotip.

Örnek	İrk	Boyut	Yaş	İnsan yaşı	İntron 6	Ekzon 7	Ekzon 13	3' UTR
					c.3096+8C>G	c.3149C>T	c.4062C>T	c.4071T>C
32	Pug (Sağlıklı)	Küçük	4	32				
22	Boxer	Büyük	6	45				
12	Tibetan terrier	Orta	7	47				
25	Yorkshire terrier	Küçük	8	48				
29	Melez	Orta-büyük*	7	47-50				
30	Tibetan terrier	Orta	9	56				
24	Husky	Orta	10	60				
31	English cocker spaniel	Orta	10	60				
2	Melez	Orta-büyük*	9	56-61				
17	English setter	Orta-büyük	9	56-61				
20	Kangal	Büyük-dev	8	55-64				
5	Tibetan terrier	Orta	12	69				
13	Golden retriever	Büyük	11	72				
10	Tibetan terrier	Orta	13	74				
6	Pinscher	Küçük	15	76				
3	Rottweiler	Büyük	12	77				
21	Golden retriever	Büyük	12	77				
16	Melez	Orta-büyük*	13	74-82				
1	Golden retriever	Büyük	13	82				
11	Rottweiler	Büyük	13	82				
26	Tibetan terrier	Orta	16	87				

Çizelge 4.5 ise örneklemdaki bireylerin yaşları ve tümör tipinin değerlendirilebilmesi amacıyla hazırlanmıştır.

Çizelge 4.5. Örneklem grubuna ait yaşlar ve tümör tipi ve histopatolojileri. Sıralama insan yaşlarına göre yapılmıştır. * işareti melez bireyleri göstermektedir. Bu bireylerde cüsse tahmini olarak seçilmiştir.

Örnek	İrk	Boyut	Yaş	İnsan yaşı	Tümör tipi	Histopatoloji
32	Pug (Sağlıklı)	Küçük	4	32	Sağlıklı	-
22	Boxer	Büyük	6	45	Benign	Papiller kistik adenoma
12	Tibetan terrier	Orta	7	47	Malign	Anaplastik karsinoma
25	Yorkshire terrier	Küçük	8	48	Benign	Fibroadenoma
29	Melez	Orta-büyük*	7	47-50	Benign	Benign miks tümör
30	Tibetan terrier	Orta	9	56	Benign	Benign miks tümör
24	Husky	Orta	10	60	Benign	Papiller kistik adenoma
31	English cocker spaniel	Orta	10	60	Benign	Fibroadenoma
2	Melez	Orta-büyük*	9	56-61	Malign	Karsinosarkoma
17	English setter	Orta-büyük	9	56-61	Malign	Malign miks karsinoma
20	Kangal	Büyük-dev	8	55-64	Malign	Malign miks karsinoma
5	Tibetan terrier	Orta	12	69	Malign	Solid karsinoma
13	Golden retriever	Büyük	11	72	Malign	Tübüler adenokarsinoma
10	Tibetan terrier	Orta	13	74	Malign	Tübüler adenokarsinoma
6	Pinscher	Küçük	15	76	Malign	Anaplastik karsinoma
3	Rottweiler	Büyük	12	77	Malign	Karsinosarkoma
21	Golden retriever	Büyük	12	77	Malign	Kompleks adenokarsinoma
16	Melez	Orta-büyük*	13	74-82	Malign	Malign miks karsinoma
1	Golden retriever	Büyük	13	82	Malign	Kompleks adenokarsinoma
11	Rottweiler	Büyük	13	82	Malign	Solid karsinoma
26	Tibetan terrier	Orta	16	87	Benign	Benign miks tümör

Çizelge 4.5'teki verilere göre, genç bireylerde benign, yaşlı bireylerde ise malign tümörler yaygın olarak görülmektedir. Tümör tipi dağılımları 12 ve 26 kodlu bireyler haricinde genç bireylerde benign, yaşlı bireylerde ise malign meme tümörlerinin

yaygın olarak görüldüğünü bildiren çalışmaları destekler niteliktedir. Epidemiyolojik çalışmalarda genel görüş 10-11 yaşlarına kadar KMT insidansında artış görüldüğü; sonrasında ise bu oranın düştüğü yönündedir (Boldizsár ve ark., 1992; Dobson ve ark., 2002; Dorn ve ark., 1967; Gamlem ve ark., 2008 ve Schneider ve ark., 1969) ancak örneklemdaki yaşlar dikkate alındığında KMT hastası 20 bireyden dokuzunun 12 yaş ve üstü olduğu ve neredeyse örneklem grubunun yarısını temsil ettiği görülmektedir. Salas ve ark. (2015), KMT frekansının en yüksek olduğu yaş aralığının dokuz ile 12 yaşları arası dönem olduğunu ifade ederken, Andrade ve ark. (2017), KMT için ortalama yaşın 9,99 olduğunu hesaplamışlardır. Ramesh ve ark. (2019), ise KMT vakalarının en yüksek görüldüğü yaş aralığının sekiz ve 12 yaşları arası olduğunu bildirmişlerdir. Zatloukal ve ark. (2005), meme displazi/hiperplazilerinin sekiz, benign tümörlerin 10, malign tümörlerin ise 13 yaşlı köpeklerde en yüksek frekansa ulaştıklarını bildirmişlerdir. Sorenmo ve ark. (2003) ise benign tümörlerin oluşma yaşını sekiz buçuk; malign tümörlerin oluşma yaşını dokuz buçuk olarak belirlemiştir. Tez çalışmasındaki örneklem grubunda ise benign tümörler altı ve 10 yaşları arasında görülmüş ancak 16 yaşlı bir bireyde de tespit edilmiştir. Malign tümörler ise yedi yaş ve üstü bireylerde tespit edilmiştir. Çalışma grubunun dağılımı Sorenmo (2003)'nın verilerini destekler niteliktedir. Sleecx ve ark. (2011), beş yaşından önce malign meme tümörü oluşmasını nadir gözlenen bir durum olarak ifade etmiştir, örneklem grubu küçük olmasına karşın, tez çalışmasında beş yaşından küçük herhangi bir bireyde malign tümör görülmemiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ırk ve boyut ayrımı yapılmaksızın yaş gruplandırması yapılmıştır. Ancak, en azından ırkların cüsselerine uygun şekilde sınıflandırılarak yaş gruplarına ayrılması, KMT gelişiminde yaş faktörünün araştırılacağı yeni çalışmalar için daha doğru sonuçlar verecektir. Örneklem grubunda genç kabul edilebilecek yaştaki tek bireyin sağlıklı birey olması nedeniyle, insanlarda *PALB2* mutasyonu tespit edilen meme tümörü vakalarındaki yaş dağılımına ilişkin çalışmalar tartışma bölümüne dahil edilmemiştir.

Köpek türünde ırk içi genetik heterojenite diğer türlere nazaran daha düşüktür ve homozigotluktaki bu artış nedeniyle belirli ırklarda veya ırk gruplarında gerek hastalıklara, gerekse spesifik tümör tiplerinde kansere yatkınlık riski artmaktadır (Sargan, 2012). Çalışmaya dahil edilen toplam 11 farklı ırk ve melez bireylere ait

örnekler mevcuttur ve çalışmadaki ırklar Dünya Köpek Organizasyonu (FCI) sınıflandırma sistemine göre (<http://www.fci.be/en/nomenclature/>) Çizelge 4.6’da gruplandırılmıştır (Fédération Cynologique Internationale, 2021). Ana gruplardaki birey sayılarının bir ve altı arasında değiştiği, grupların dengeli olmadığı görülmektedir. Ana gruplardaki varyant dağılımlarından çıkarım yapmak güçtür.

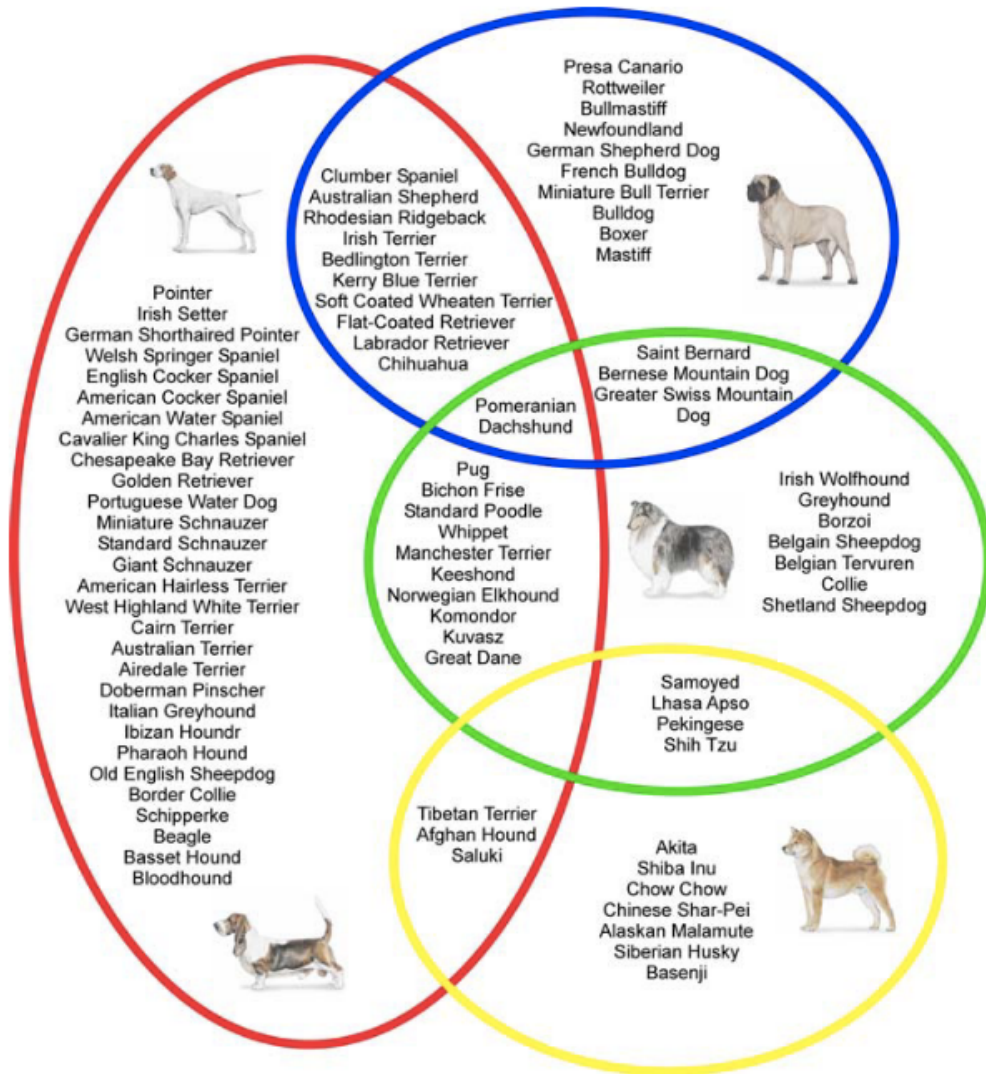
Çizelge 4.6. FCI sınıflandırmasına göre (Fédération Cynologique Internationale, 2021) örneklemdeki bireyler ve varyant dağılımları.

Kırmızı: homozigot mutant genotip, Sarı: heterozigot genotip, Beyaz: homozigot yabancı genotip. İ 6: İntron 6, E 7: Ekzon 7, E 13: Ekzon 13, UTR: 3’ UTR varyantı.

Grup (FCI)	Bölüm	Altbölüm	İrk	Örnek	İ 6	E 7	E 13	UTR
Spitz and Primitive types	Nordic Sledge Dogs	-	Husky	24				
Retrievers - Flushing Dogs - Water Dogs	Retrievers	-	Golden retriever	1				
				13				
				21				
	Flushing Dogs	-	English cocker spaniel	31				
Pinscher and Schnauzer - Molossoid and Swiss Mountain and Cattle dogs	Molossian type	Mastiff type	Rottweiler	3				
				11				
			Boxer	22				
		Mountain type	Kangal	20				
	Pinscher and Schnauzer type	Pinscher	Pinscher	6				
Pointing Dogs	British and Irish Pointers and Setters	Setter	English setter	17				
Terriers	Toy Terriers	-	Yorkshire terrier	25				
Companion and Toy Dogs	Tibetan Breeds	-	Tibetan terrier	5				
				10				
				12				
				26				
				30				
	Small Molossian type Dogs	-	Pug (Sağlıklı)	32				
-	-	-	Melez	2				
-	-	-	Melez	16				
-	-	-	Melez	29				

Köpek ırklarının kökenine ve filogenetiğine ilişkin yapılmış bir çok çalışma bulunmaktadır (Vila ve Leonard, 2012). En geniş kapsamlı çalışmalardan birisi Parker ve ark. (2004)’nın mikrosatelit çalışması, bir diğeri de Vonholdt ve ark. (2010)

tarafından yapılmış genom boyu ilişkilendirme çalışmasıdır. Parker ve ark. (2004), çalışmaları kapsamında 85 köpek ırkında filogenetik analizde, antik kökenlere sahip birkaç ırkı, modern Avrupa kökenli ırklardan ayırmıştır. Ağırlıklı olarak benzer coğrafi kökene, morfolojiye veya insan faaliyetlerindeki rolüne sahip ırkları içeren dört genetik küme belirlemişlerdir. Parker ve Ostrander (2005), bu çalışmaya ilişkin yayınladıkları derleme yayınlarında ırklardaki gruplandırmayı Şekil 4.1'deki gibi tanımlamışlardır.



Şekil 4.1. 85 köpek ırkının popülasyon yapısı (Parker ve Ostrander, 2005).

Çizelge 4.7. Şekil 4.1'deki popülasyon dağılımına göre varyantların durumu.

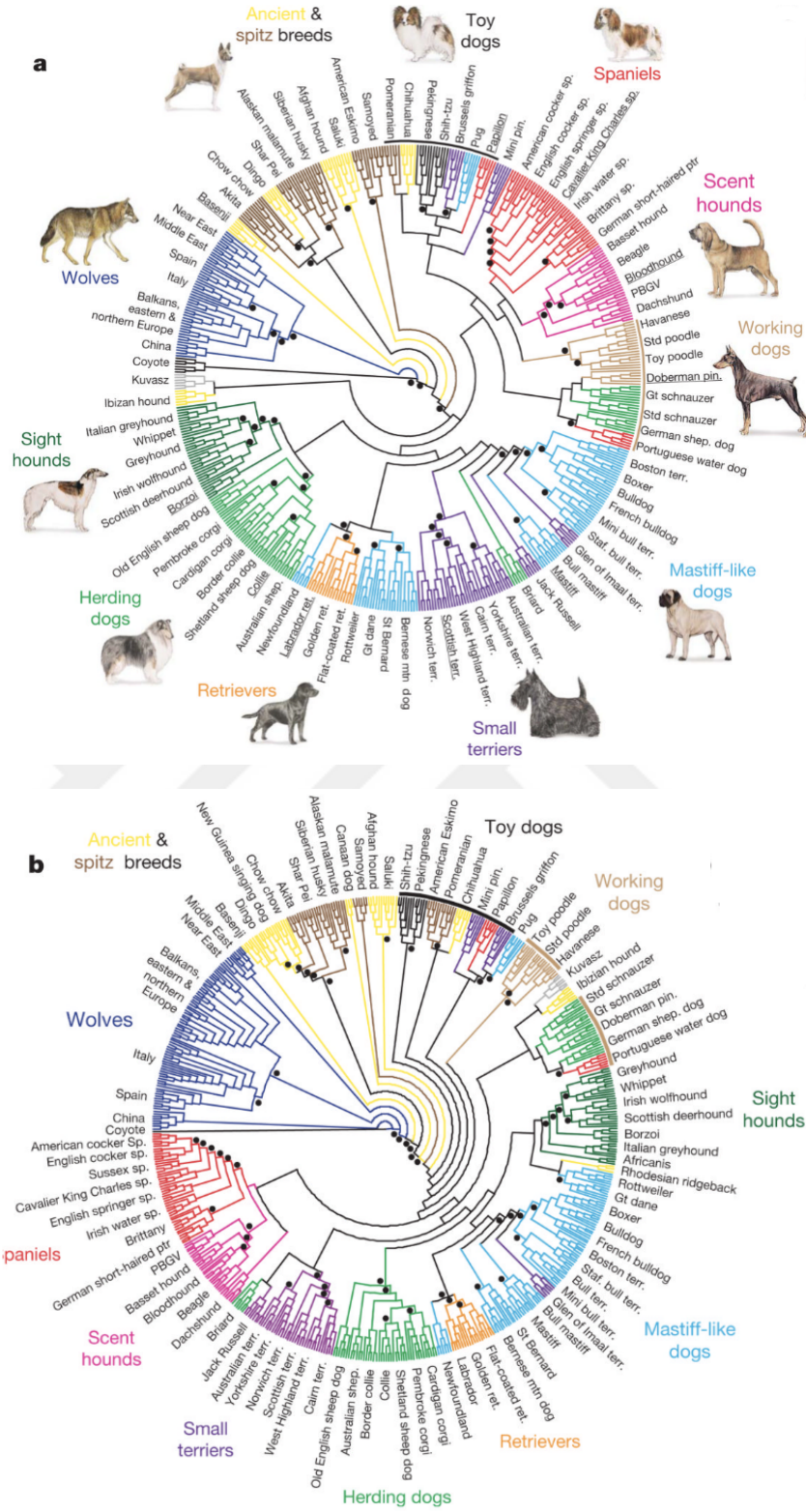
Grup başlığı altındaki renkler Şekil 4.1'deki kümeleri göstermektedir. İ 6: İntron 6, E 7: Ekzon 7, E 13: Ekzon 13, UTR: 3' UTR varyantı. Siyah: homozigot mutant genotip, Gri: heterozigot genotip, Beyaz: homozigot yabancıl genotip.

Grup (Parker ve Ostrander, 2005)	İrk	Örnek	İ 6	E 7	E 13	UTR
Sarı	Husky	24	■			
	Tibetan terrier	5	■		■	■
		10	■			
		12	■		■	■
		26				
		30				
Kırmızı	Golden retriever	1	■			
		13	■	■		
		21	■	■		
	English cocker spaniel	31	■		■	■
	Pug (Sağlıklı)	32				
Mavi	Rottweiler	3	■		■	■
		11	■		■	■
	Boxer	22				
Beyaz	Kangal	20	■			
	Pinscher	6				
	English setter	17				
	Yorkshire terrier	25	■			
	Melez	2	■		■	■
		16				
		29	■	■		

Çizelge 4.7'de Kangal, *Miniature pinscher*, *English setter* ve *Yorkshire terrier* ırkları Parker ve ark. (2004)'nın çalışmalarında yer almadıkları için gruplandırmalara dahil edilememiştir. Sarı renkli grupta *Siberian husky* ve *Tibetan terrier* ırkları bulunmaktadır. İki *Tibetan terrier* ırkı bireyde (26 ve 30 numaralı örnekler) hiçbir varyant tespit edilmemiştir. İntron 6 varyantı hem *Siberian husky* hem de *Tibetan terrier* ırkı bireylerin üçünde (5, 10 ve 12 numaralı örnekler) belirlenmiştir. Bu grupta intron 6 varyantı, *PALB2* varyantı görülen tüm bireylerde mevcuttur diyebiliriz. Ekzon 7 varyantı bu gruptaki bireylerin hiçbirinde bulunmamaktadır. Ekzon 13 ve 3' UTR varyantları iki *Tibetan terrier* ırkı bireyde (5 ve 12 numaralı örnekler) aynı paternde görülmektedir. Kırmızı renkli grupta *Tibetan terrier*, *Golden retriever*, *English cocker*

spaniel ve *Pug* ırkları bulunmaktadır. İki *Tibetan terrier* ırkı birey ve sağlıklı örnek olan *Pug* ırkı birey haricinde intron 6 varyantı bu gruptaki tüm bireylerde görülmektedir. *English cocker spaniel* ırkı birey intron 6, ekzon 13 ve 3' UTR varyantlarını *Tibetan terrier* ırkı iki bireyle aynı paternde göstermektedir. Golden retriever ırkı bireyler incelendiğinde, üç örnekten ikisinde (13 ve 21 numaralı örnekler) intron 6 varyantının yanı sıra, ekzon 7 varyantı da tespit edilmiştir. Yeşil renkli grupta yalnızca sağlıklı birey bulunduğu için bu gruba ilişkin herhangi bir çıkarımda bulunmak mümkün değildir. Mavi renkli grupta ikisi *Rottweiler*, biri *Boxer* ırkı olmak üzere yalnızca üç örnek bulunmaktadır. *Boxer* ırkı bireyde herhangi bir varyant tespit edilmemiştir. *Rottweiler* ırkı bireylerde ise intron 6, ekzon 13 ve 3' UTR varyantları aynı paternde (homozigot/heterozigot/heterozigot) dağılım göstermiştir. Genel olarak ekzon 7 varyantının yalnızca kırmızı grupta görüldüğünü, intron 6, ekzon 13 ve 3' UTR varyantlarının yeşil grup haricindeki tüm gruplarda görüldüğünü söyleyebiliriz. Yeşil grup için herhangi bir çıkarımda bulunamamakla birlikte; ırk ve birey sayısının dengeli olarak artırılacağı çalışmalar bu veriler ışığında *PALB2* varyantlarının dağılımı açısından gruplar içinde ve gruplar arasında bilgilendirici olabilir.

Vonholdt ve ark. (2010) tarafından yapılmış genom boyu ilişkilendirme çalışmasında 85 köpek ırkında paylaşılan allel ve haplotipler göz önünde bulundurularak “*Neighbour-joining (NJ) tree*” oluşturulmuştur. Tez çalışması kapsamında örnekleme dahil edilen bazı ırklar (*Kangal*, *English setter*, *Tibetan terrier*) ilgili çalışmada yer almamaktadır. Haplotiplere göre oluşturulmuş *NJ tree* Şekil 4.2.a'daki gibi görülmektedir. Tez çalışması kapsamında gruplandırmalar için haplotipler göz önüne alınarak Vonholdt ve ark. (2010), tarafından oluşturulan *NJ tree* kullanılmıştır.



Şekil 4.2. Vonholdt ve ark. (2010) tarafından yapılmış genom boyu ilişkilendirme çalışması.

a. 85 ırk için yapılan genom boyu ilişkilendirme çalışmasında elde edilen haplotip verileri ile oluşturulmuş *NJ tree*
b. Aynı çalışmada elde edilen allel verileri ile oluşturulmuş *NJ tree*. Tez çalışması için gruplandırma haplotip verilerine göre yapılmıştır.

Vonholdt ve ark. (2010)'nın çalışmaları sonucunda elde ettikleri haplotiplere ilişkin *NJ tree*'ye göre örneklemedeki *Siberian husky* ırkının dahil olduğu Antik ve *Spitz* ırklarının ayrılmasının ardından, görerek iz süren tazılar, çoban köpekleri, av köpekleri, küçük *terrier*ler ve mastif benzeri köpeklerin bulunduğu geniş bir grup ile *spanieller*, süs köpekleri, iş köpekleri ve koku ile iz süren tazılar ikinci bir geniş grup oluşturmaktadır. Birinci büyük grup içinde görerek iz süren tazılar ve çoban köpekleri diğer gruplara göre daha önce ayrılmaktadır, ancak bu gruplar içindeki ırklardan tez çalışmasındaki örnekleme dahil edilen herhangi bir ırk bulunmamaktadır. Görerek iz süren tazılar ve çoban köpekleri ayrıldıktan sonra *retriever*lar ve mastif benzeri köpeklerin bir kısmı birlikte bir grup oluşturarak ayrılmaktadır. *Golden retriever* ırkı *retriever*ların bulunduğu gruba dahildir. Birlikte ayrılan mastif benzeri ırklar arasında ise *Rottweiler* ve *Great dane* ırkları bir grup, *Saint bernard* ve *Bernese mountain dog* ırkları ise bir başka grup oluşturmaktadır. Tez çalışmasında bulunan *Rottweiler* ırkı bireyler zaten Vonholdt ve ark. (2010)'nın yayınlarında bulunmaktadır ve dağ köpeklerinin oluşturduğu grup içinde mevcuttur. Bu grupların ayrılmasının ardından *Yorkshire terrier*in bulunduğu *terrier*ler grubu ile *Boxer* ve diğer mastif tipi köpeklerin bulunduğu grup birbirinden ayrılmaktadır. Süs köpekleri, *spanieller*, koklayarak iz süren tazılar ve iş köpekleri ile bazı çoban köpeği ırklarının bulunduğu ikinci büyük grupta çoban köpekleri diğer ırklardan ayrı bir grup oluşturmaktadır. Kalan ırklardan *Pug*, *Miniature pinscher* gibi ırkların dahil olduğu süs köpeklerinin ayrı bir grup olarak ayrıldığı, ardından iş köpeklerinin farklı bir grup meydana getirdiği görülmektedir. Kalan ırklar içinden *spanieller* ve koklayarak iz süren tazıların iki ayrı grup oluşturduğu görülmektedir. *English cocker spaniel* ırkı, Vonholdt ve ark. (2010)'nın çalışmasında *spanieller* grubunda yer almış ırklardandır. Bu çalışmada oluşturulmuş haplotip temelli *NJ tree* göz önünde bulundurularak Çizelge 4.8 oluşturulmuş ve örneklemedeki varyantların dağılımı ırklar gruplandırılarak incelenmiştir.

Çizelge 4.8. Vonholdt ve ark (2010)'nın çalışması sonucunda elde edilen haplotip grupları, FCI sınıflandırması ve varyantların dağılımı.

Kırmızı: homozigot mutant genotip, Sarı: heterozigot genotip, Beyaz: homozigot yabancı genotip. İ 6: İntron 6, E 7: Ekzon 7, E 13: Ekzon 13, UTR: 3' UTR varyantı.

Haplotip Grupları	Grup (FCI)	İrk	Örnek	İ 6	E 7	E 13	UTR
1	Spitz and Primitive types	Husky	24				
2	Retrievers - Flushing Dogs - Water Dogs	Golden retriever	1				
			13				
			21				
	Pinscher and Schnauzer - Molossoid and Swiss Mountain and Cattle dogs	Rottweiler	3				
			11				
	Terriers	Yorkshire terrier	25				
	Pinscher and Schnauzer - Molossoid and Swiss Mountain and Cattle dogs	Boxer	22				
3	Companion and Toy Dogs	Pug (Sağlıklı)	32				
	Pinscher and Schnauzer - Molossoid and Swiss Mountain and Cattle dogs	Pinscher	6				
	Retrievers - Flushing Dogs - Water Dogs	English cocker spaniel	31				
-	Pinscher and Schnauzer - Molossoid and Swiss Mountain and Cattle dogs	Kangal	20				
	Companion and Toy Dogs	Tibetan terrier	5				
			10				
			12				
			26				
			30				
	Pointing Dogs	English setter	17				
	-	Melez	2				
			16				
			29				

Çizelge 4.6'da aynı haplotip grupları altındaki gri alanlarla birbirinden ayrılmış ırklar *NJ tree*'deki daha küçük gruplaşmaları ifade etmektedir. Haplotip grupları (Vonholdt ve ark., 2010) ve FCI sınıflandırması (Fédération Cynologique Internationale, 2021) arasında yapılan karşılaştırmada aynı FCI grubunda bulunan bazı ırkların farklı gruplarda bulunan ırklarla haplotip benzerliğinin daha yüksek çıkabildiği görülmektedir. Çizelgede bu verilerin haricinde gruplandırılmamış

bireyler ve melez bireylere ait veriler de görülmektedir. Gerek Vonholdt ve ark. (2010)'nın çalışmasında, gerekse FCI sınıflandırmasında *Siberian Husky* ırkı diğer ırklardan ayrılmış görülmektedir. Bu ırk yalnızca intron 6 varyantını homozigot olarak taşımaktadır. Örnekleme aynı gruba dahil başka bir ırk veya birey olmadığından antik ve *spitz* ırklarının bulunduğu ilk haplotip grubunda varyant dağılımına dair çıkarımda bulunmak güçtür ancak Parker ve ark. (2004)'nın çalışmasında *Tibetan terrier* ırkı *Husky* ile ilişkili görülmüştür ve bu konuya daha önce değinilmiştir. İkinci haplotip grubu *retriever*lar, *terrier*ler ve mastif benzeri ırkların bulunduğu geniş bir gruptur (Vonholdt ve ark., 2010). Burada *Golden retriever* ırkının bulunduğu *retriever*lar grubu ve *Rottweiler* ırkının bulunduğu mastif benzeri grubun haplotipleri daha yüksek benzerlik göstererek Vonholdt ve ark. (2010)'nın çalışmasına göre diğer iki alt gruptan ayrılmıştır ancak *Golden retriever* ırkının *Boxer* ve *Rottweiler* ırklarından keskin bir şekilde ayrıldığını bir önceki gruplandırmada (Parker ve ark., 2004) görmüştük. *PALB2* varyantları açısından incelendiğinde *Golden retriever* ırkında intron 6 varyantı iki bireyde (1 ve 13 numaralı örnekler) homozigot, bir bireyde ise (21 numaralı örnek) heterozigot olarak görülmektedir. Ekzon 7 varyantı örnekleme yalnızca üç bireyde görülmektedir. Ekzon 7'deki varyantlardan ikisi *Golden retriever* ırkı bireylerde (13 ve 21 numaralı örnekler) biri ise melez bireyde (29 numaralı örnek) tespit edilmiştir. Bu ırktaki bireylerin hiçbirinde Ekzon 13 ve 3' UTR varyantlarına rastlanmamıştır. Örneklemin tamamı dikkate alındığında ekzon 7 varyantının *Golden retriever* ırkı için risk teşkil edebileceği görülmekte ve daha geniş bir örneklem grubunda araştırılması önerilmektedir. *Rottweiler*larda her iki bireyde de intron 6 varyantı homozigot, ekzon 13 ve 3' UTR varyantları ise heterozigot olarak tespit edilmiştir. Ekzon 13 ve 3' UTR varyantının görüldüğü toplam altı örnek bulunmaktadır. Bu varyantlardan ikisinin *Rottweiler* ırkında görülmesi ve intron 6 varyantının yine bu ırktaki iki bireyde birden bulunması ve aynı haplotipin görülmesi, bu üç varyantın *Rottweiler* ırkı için risk teşkil edebileceğini göstermektedir. İleride bu varyantlar için yapılacak çalışmalarda daha fazla *Rottweiler* ırkı bireyde araştırma yapılması önerilmektedir. İkinci haplotip grubunda diğer bir alt grubu oluşturan *terrier*leri (Vonholdt ve ark., 2010) tez çalışması örnekleminde yalnızca *Yorkshire terrier* ırkına mensup bir birey temsil etmektedir. Parker ve ark. (2004)'nın çalışmasında bu ırk bulunmadığından herhangi bir gruba dahil edilememiştir. Bu bireyde yalnızca intron 6 varyantı homozigot olarak tespit

edilmiştir ancak tek bir birey bulunduğu için çıkarımda bulunmak güçtür. İkinci haplotip grubundaki son alt grubu temsil eden *Boxer* ırkında ise *PALB2* geninde hiçbir germ hattı mutasyonuna rastlanmamıştır. *Boxer* ırkının Parker ve ark. (2004)'nın çalışmasında *Rottweiler* ırkı ile aynı grupta bulunduğunu görmüştük, ancak Vonholdt ve ark. (2010)'nın çalışmasında ayrı bir alt grup olarak bulunduğunu net bir şekilde görmekteyiz. Haplotip grubu 2 genel olarak değerlendirildiğinde hiçbir varyant tespit edilmemiş olan *Boxer* ırkı birey haricinde örneklerin tümünün intron 6 varyantını en az bir allelinde bulundurduğu görülmektedir. Ekzon 7 varyantı için riski en yüksek grup yine bu haplotip grubudur ve ekzon 13 ve 3' UTR varyantları da bu grupta bulunan bireylerde görülebilmektedir. Süs köpekleri ve *spanieller*in bulunduğu üçüncü ana haplotip grubunda süs köpekleri ilk alt grubu oluşturmaktadır. Bu gruptaki ırkların genellikle Çin kökenli ırklar ve küçük köpekler olduğu görülmüştür. Sağlıklı kontrol olan *Pug* ırkı bu alt grupta bulunmaktadır. Parker ve ark. (2004)'nın çalışmasında bulunmayan *Miniature pinscher* ırkının ise bu alt gruba diğer alt gruplardan daha yakın olduğu Vonholdt ve ark. (2010)'nın çalışmasında görülmektedir. Sağlıklı kontrol olarak örneklemde bulunan *Pug* ırkı ve KMT hastası *Pinscher (Miniature pinscher)* ırkı bireyde herhangi bir varyant tespit edilmemiştir. Bu grubun diğer bir alt grubu olan *spanieller* grubunda ise *English cocker spaniel* ırkı bulunmaktadır. *English cocker spaniel* ırkı bireyde intron 6, ekzon 13 ve 3' UTR varyantları bir arada ve heterozigot olarak tespit edilmiştir. Sınıflandırmaya alınamayan bireylerden Kangal ırkı FCI tarafından *Boxer* ve *Rottweiler* ırklarının bulunduğu “*Molossian*” tipi köpekler sınıfında olduğundan ikinci grupta (Vonholdt ve ark., 2010) ve mavi grupta bulunması mümkün görünmektedir, ancak alt grubu incelendiğinde (bkz Şekil 4.1) “*Mountain*” tipindeki *Saint bernard*, *Bernese mountain dog* gibi aynı alt gruptaki ırkların bulunduğu mavi-yeşil grupların kesişim kümesinde çıkma ihtimali yüksektir (Parker ve ark., 2004). Ancak mikrosatelit ve genom boyu ilişkilendirme çalışmaları yapılmadığı için bunlar hakkında yalnızca fikir yürütmek mümkündür. *Miniature pinscher* ve *English setter* ırkı bireyler muhtemelen kırmızı grupta toplanacaktır ancak bu ırklara ilişkin veriler bulunmadığından herhangi bir varyant tespit edilmemiş olan bu bireyler için çıkarımda bulunmak mümkün değildir. Yalnızca intron 6 varyantının bulunduğu *Yorkshire terrier* ırkı bireyin kırmızı, mavi ya da yeşil renkli popülasyon gruplarında (Parker ve ark., 2004) bulunması olasıdır, ancak elimizde veri olmadığı

için bunu değerlendirebilmemiz mümkün görünmemektedir. Grup dışı kalan melez bireylerden birinde herhangi bir varyant tespit edilmemiştir. 29 numaralı melez birey 13 numaralı *Golden retriever* ırkı örnekle, 2 numaralı melez birey ise 3 ve 11 numaralı *Rottweiler* ırkı örneklerle aynı paternde germ hattı mutasyonuna sahiptir. Melez bireyler incelendiğinde, 16 numaralı örnekte herhangi bir germ hattı mutasyonu tespit edilmemiş, iki numaralı örnekte *Rottweiler* ırkında görülen paternde mutasyon olduğu görülmüştür. 29 numaralı birey ise 13 numaralı *Golden retriever* ırkı bireydeki mutasyon paternini göstermiştir. Melez bireylerde ebeveynlere bağlı olarak gen havuzundaki herhangi bir allelin genotipte tespit edilebilmesi mümkündür. Bu nedenle, tespit edilen tüm varyantlar açısından risk altında oldukları düşünülebilir. Salas ve ark. (2015), yaptıkları retrospektif çalışmada meme tümörü vakalarının safkan ırk fenotipi gösteren bireylerde melez bireylerden yaklaşık dört kat fazla görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu durum, saf ırklardaki homozigotluğun daha yüksek olması (Sargan, 2012) ile açıklanabilir. Irk ve ırk grupları bazında germ hattı mutasyonlarının dağılımının sağlıklı bir biçimde incelenebilmesi için, daha geniş ve dengeli örneklem gruplarına ihtiyaç vardır.

4.2. Varyantların Protein Yapısı ve Fonksiyonuna Etkileri

Tespit edilen varyantların protein yapısı ve fonksiyonuna etkilerinin değerlendirilmesi KMT açısından kritik önem taşımaktadır. Bu nedenle tespit edilen tüm varyantların etkilerine özel olarak değinilmiştir.

4.2.1. *PALB2* Geni İntron 2 Varyantı

Transkriptte ve protein kodlanmasında yer almayan intron 6 (c.3096+8C>G) varyantının etkileri pozisyona bağlanan herhangi bir TF tespit edilmemiş olması nedeniyle yalnızca *splice* mekanizmasına ilişkin veriler üzerinden değerlendirilmiştir. İntron 6'da insan *PALB2* geninde meydana gelebilecek tüm olası varyantların kriptik akseptör bölge aktivasyonuna neden olduğu sonucu elde edilmiştir (Desmet ve ark.,

2009). VEP (McLaren ve ark., 2016) aracında köpek türündeki intron 6 varyantının *splice* bölgesi varyantı olduğu bilgisi ve *Great dane* ırkına ait genomda ENSCAFG00040003287 kodlu *PALB2* genine ait üç farklı transkript bulunması varyantın alternatif *splice*'a neden olabileceği fikrini desteklemektedir. ENSCAFT00040006272.1 transkriptinde ekzon 7 bulunmamakta ve bu transkript 4134 nükleotit uzunluğunda olup, 1301 amino asitlik bir protein ürünü sentezlemektedir. ENSCAFT00040006296.1 transkriptinde ise ekzon 1, ekzon 9 ve ekzon 10 bulunmamakta, 3507 nükleotit uzunluğundaki bu transkript 1092 amino asit uzunluğundaki bir protein ürünü sentezlemektedir (Ensembl, 2021h). Varyantın ENSCAFT00040006272.1 transkriptinin sentezlenmesi ile ilişkisi olması mümkün ve araştırmaya değerdir. Bu transkriptte bulunmayan ekzon 7'nin *WD40* domainine dahil olması nedeniyle, protein ifadesi olmasına karşın *PALB2* proteininin diğer proteinler ile etkileşimine zarar vermesi ihtimal dahilindedir. ENSCAFT00040006296.1 transkripti de *WD40* domaini açısından aynı soruna yol açacaktır. İnsan rs1060504708 varyantının kalıtsal kanser predispozisyonu ile ilişkilendirilmiş olması bu varyanta ilişkin önemli bir bulgudur. Özetle; “intron 6 varyantı alternatif *splice* mekanizması üstünden *PALB2* proteininin yapısını değiştirme potansiyeline sahip olabilir ve KMT predispozisyonu ile ilişkilendirilebilir” şeklinde yeni bir hipotez kurularak araştırma alanını genişletmek mümkündür.

4.2.2. *PALB2* Geni Ekzon 7 Varyantı

Proteinlerin işlevleri üç boyutlu katlanma yapısına dayanmaktadır. Proteinlerin birincil yapısında meydana gelen değişiklikler proteinin ikincil ve üçüncül yapılarını ve dolayısıyla da proteinin üç boyutlu katlanma biçimini belirlemektir (Selzer ve ark., 2019). Geçici protein-protein arası etkileşimlerde proteinin katlanma yapısının farklı fizyolojik koşullar ve ortamlardaki durumu bile bağlanma dinamikleri üzerinden proteinin fonksiyonunu etkilemektedir (Nooren ve Thornton, 2003). Bu nedenle birincil yapıda meydana gelecek herhangi bir değişiklik protein fonksiyonu açısından oldukça önemli etkiler yaratabilme potansiyeline sahiptir. DNA dizi analizi sonucunda

tespit edilen varyantlardan proteinin birincil yapısını değiştiren tek varyant ekzon 7'deki A1050V yanlış anlam mutasyonudur.

Ekzon 7'deki A1050V varyantı için yapılan *in silico* analizlerin sonuçları bu rezidünün protein yapısındaki pozisyonunun yüksek oranda korunmuş olduğunu ve fonksiyonel bir rezidü olduğunu göstermiştir (Ashkenazy ve ark., 2016). Amino asit dizisinin evrimsel süreçteki korunmuşluk durumuna göre yapılandırılmış *SIFT* aracının sonuçları da bu verileri destekler nitelikte "0" olarak bulunmuştur. Bu rezidünün türler arasında yüksek oranda korunmuş olması önemli bir fonksiyona sahip olabileceği ve olası bir mutasyonun organizma için zararlı olabileceğini işaret etmektedir. Yabani proteindeki alanin amino asiti hidrofobik, küçük ve çok küçük amino asitler gruplarında; mutant proteindeki valin amino asiti ise hidrofobik, küçük ve alifatik amino asitler gruplarında sınıflandırılmaktadır (Selzer ve ark., 2019). İnsan türünde kontrol edildiğinde de aynı rezidü değişikliğinin *SIFT* skoru 0 olarak bildirilmiştir (Ensembl, 2021g). *PROVEAN* aracında ise eşik değeri -2,5'tir ve varyantın etkisi -2,450 olarak hesaplanarak nötral olduğu bildirilmiştir (Choi ve Chan, 2015). Elde edilen sonucun eşik değere oldukça yakın olduğu bu skorlardan görülmektedir. Aynı araç insandaki pozisyon için kullanıldığında varyantın -2,612 skoru ile zararlı bir mutasyon olduğu görülmüştür (Choi ve Chan, 2015). *PROVEAN* aracı insan organizmasındaki varyantların değerlendirilmesi amacıyla tasarlanmıştır. Bu nedenle insanda bu varyantın zararlı olduğunun bildirilmesi köpekte de benzer bir etki görülebileceği ihtimalini güçlendirmektedir. *PolyPhen-2* sunucusunun (Adzhubei ve ark., 2010) *HumDiv* modeline göre A1050V varyantı 0,991 (hassasiyet: 0,71; spesifite: 0,97) skoruyla; *HumVar* modeline göre ise 0,986 (hassasiyet: 0,54; spesifite: 0,94) skoruyla "zararlı olma ihtimali oldukça yüksek" olarak değerlendirmiştir. Köpektaki nükleotit değişikliğinin insandaki karşılığı olan c.2639C>T varyantının *PolyPhen* skoru 0,881 (zararlı olması muhtemel) olarak hesaplanmıştır (Ensembl, 2021g). *MutPred2* sunucusunda (Pejaver ve ark., 2020) A1050V varyantının skoru 0,348 olarak hesaplanmış, varyantın patojenite ve fenotipe etkisine ilişkin veriler sunucu tarafından sağlanmamıştır. İnsandaki aynı varyanta ilişkin *MutPred2* sonucu hesaplandığında ise 0,179 değeri ile yine eşik değeri geçemediği ve etkilerinin hesaplanmadığı tespit edilmiştir. *SIFT*, *PROVEAN*,

PolyPhen ve *MutPred2* sonuçlarının iki tür arasında paralellik göstermesi oldukça önemlidir. *PhD-SNP* (Capriotti ve ark., 2006) uygulamasında sekans temelli metot kullanıldığında A1050V varyantı hastalıkla ilişkilendirilmiş polimorfizm (güvenilirlik indeksi: 0); sekans ve profil temelli metot kullanıldığında nötral (güvenilirlik indeksi: 5); hibrit metot kullanıldığında ise hastalıkla ilişkili (güvenilirlik indeksi: 5) olarak değerlendirilmiştir. Güvenilirlik indeksleri değerlendirildiğinde sekans ve profil temelli metot ile hibrit metodun güvenilirliği daha yüksek görünmektedir. Ancak yöntemlerden birinde varyantın etkisi nötral, diğerinde hastalıkla ilişkili olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle *PhD-SNP* aracından elde edilen sonuçlar üzerine yorum yapmak zordur. *SNPEffect 4.0* (De Baets ve ark., 2012) programında A1050V varyantının proteinin agregasyon eğiliminin, amiloid oluşturmaya yatkınlığının ve şaperon bağlama eğiliminin etkilenmediği tespit edilmiştir. Protein yapısının stabilitesi ise geçerli bir yapısal bilgi bulunmadığı için tespit edilememiştir. Ligand bağlanma bölgeleri ve varyantın bu bölgelerde neden olabileceği değişikliklere ilişkin *FTSite Binding Site Prediction* (Kozakov ve ark., 2015) ve *FunFOLD2* (Roche ve ark., 2013) araçlarının verdiği sonuçlar ise birbiri ile örtüşmemektedir.

Köpek türünde A1050V varyantı mevcut tez çalışması öncesinde *Ensembl* veri tabanına bildirilmiştir. İlgili çalışma araştırıldığında, “*High quality variant calls from multiple dog genome project - Run1*” isminde 238 örneğin germ hattında yapılan tüm genom sekanslaması ile karşılaşılmaktadır (European Variation Archive, 2021). Örneklerin ırk, hastalık gibi verileri veya yapılan çalışmaya ilişkin herhangi bir yayına ulaşamamaktadır. Tez çalışmasındaki örneklem grubunda görülmemesine karşın, bu projede A1050V varyantının homozigot olarak da görüldüğü tespit edilmiştir. İnsan çalışmalarında ise köpektaki A1050V varyantının birebir karşılığı olan A880V varyantına ilişkin bildirilmiş herhangi bir vaka bulunmamaktadır. İlgili nükleotit ve amino asit pozisyonunda bildirilen tek varyantın A880D varyantı olduğu görülmüştür (Ensembl, 2021g). Bulgular bölümünde insanda bu pozisyonda görülen potansiyel varyantların ailesel meme tümörü, endometrial tümör ve kalıtsal kanser predispozisyon sendromu ile ilişkilendirildiğine değinilmiştir.

Yapılan *in silico* analizlerden bir kısmı varyantın nötral etkili olduğunu, bir kısmı ise zararlı olduğunu ifade eden sonuçlar vermiştir. Hem köpek hem de insan verilerindeki eksiklikler dikkate alındığında varyantın zararlı olup olmadığına dair kesin sonuca ancak yapılacak vaka-kontrol çalışmaları ve fonksiyonel testler ile ulaşmak mümkündür.

Rezidü değişikliği haricinde A1050V varyantı bulunduğu pozisyona miRNA bağlanabilmesi nedeniyle de önemlidir. Mikro RNA'lar (miRNA) transkripsiyon sonrası gen regülasyonunda aktif olarak görev yapan yaklaşık 18-25 nükleotit uzunluğundaki kodlanmayan RNA molekülleridir. Bu diziler spesifik olarak mRNA dizilerine bağlanarak genin translasyonunu baskılamakta veya mRNA'nın degradasyonunu sağlamaktadır. İnsanlarda tümör ilerlemesi, invazyonu ve metastaziste onkogenik veya tümör baskılayıcı etki gösterebildikleri bilinen miRNA'lar, erken teşhis, prognoz, ve risklerin tanımlanması açısından önem taşımakta, ayrıca kişiselleştirilmiş kanser tedavilerinde ve önleyici tıpta klinik açıdan kullanılabilme potansiyeli bulunan hedeflerdir (Sethi, 2014). Köpeklerdeki meme tümörü vakalarında da miRNA'ların benzer etkiler görülmesi söz konusudur (Boggs ve ark., 2008; Cullen ve Breen, 2016; Fish ve ark., 2018 ve Kaszak ve ark., 2018).

PALB2 geninde, transkripsiyonu yapılan tüm varyantların (Ekzon 7, ekzon 13 ve 3' UTR bölgesi) bulunduğu pozisyonlar tez çalışması kapsamında üç farklı miRNA veri tabanında (*TargetScan*, *miRDB* ve *miRWalk*) araştırılmış ve yalnızca *miRWalk* (Sticht ve ark., 2018) veri tabanında ekzon 7'deki yanlış anlam mutasyonunun bulunduğu bölgeye bağlanma potansiyeli olan dört adet miRNA olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar cfa-miR-222, cfa-miR-8842, cfa-miR-8821 ve cfa-miR-8846 miRNA'larıdır. cfa-miR-222, insan miRNA'ları içinde MIMAT0000279 kodlu hsa-miR-222-3p ile aynı nükleotit dizisine sahip korunmuş bir miRNA'dır (Kozomara ve ark., 2019). *miRWalk* veri tabanında *PALB2* geni için insan türü seçilerek yapılan taramada hsa-miR-222-3p'nin NM_024675 transkriptinde 2921-2938 nt'leri arasındaki bölgeye bağlandığı; XM_011545948 transkriptinde ise 80-111 nt'leri ve 3060-3077 nt'leri arasındaki iki bölgeye bağlanabildiği görülmüştür (Sticht ve ark., 2018). Buna karşın *NCBI* veri tabanında bu transkriptler ve varyant pozisyonu

incelendiğinde varyant pozisyonunun NM_024675 referans transkriptinde 2792'nci pozisyonunda bulunduğu ve miRNA'nın bu bölgeye bağlanmadığı (NCBI, 2021a); XM_011545948 transkriptinde ise varyantın 2931'inci pozisyonunda bulunduğu ve miRNA'nın bu bölgeye bağlanmadığı tespit edilmiştir (NCBI, 2021d). İlgili miRNA'ya (hsa-miR-222-3p) ilişkin insanlarda yapılmış araştırmalara meme tümörü açısından sorgulandığında ise göze çarpan bazı çalışmalar dikkat çekmektedir. Rinnerthaler ve ark. (2016), primer ve metastatik meme tümörü vakalarında yapılacak çalışmalarda normalizasyon için kullanılmak üzere miR-222-3p'nin de dahil olduğu 11 adet miRNA'nın uygunluğunu kontrol etmiş, miR-222-3p'nin farklı tümör alt tiplerinde ifadelerinin farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada verilen bilgiler doğrultusunda miR-222-3p'nin ER α , p27^{Kip1}, p57 ve TIMP3 ifadelerini baskıladığı; ayrıca ilaç direnci ile ilişkilendirilmiş bir onkomiR (onkogenik etki gösteren miRNA) olduğu görülmektedir. Chen ve ark. (2017), üçlü negatif meme tümörü hücre hattı ve ER+/PR+/HER2- hücre hattında yaptıkları mikrodizin çalışmasında miRNA ifadelerindeki farklılıkları incelemişlerdir. Çalışma sonucunda miR-222-3p ifadesinin üçlü negatif meme tümörü hücre hattında diğer hücre hattına göre anlamlı derecede yüksek bulunduğu tespit edilmiştir. Mavrogiannis ve ark. (2018), meme tümörü hücre hatlarında antimitotik etkisi bulunan *vinca* alkaloidlerinin miRNA ifadelerine etkilerini incelemişlerdir. Özellikle üçlü negatif meme tümöründe ifade artışı görüldüğü bilinen miR-222-3p'nin zayıf prognoz ve lenf düğümlerinde metastazis ile ilişkilendirildiğinin belirtildiği çalışmada, *vinca* alkaloidleri ile muamele edilen her iki hücre hattında miR-222-3p'nin regülasyonunun önemli ölçüde değiştiği bildirilmiş, ayrıca kemoterapide destekleyici olarak miR-222-3p antagonisti ile tedavinin güçlendirilebileceği ifade edilmiştir. Amini ve ark. (2018), miR-222-3p ifadesinin tümörlü meme dokularındaki ifade seviyesinin normal meme dokularındaki ifade seviyelerinden anlamlı derecede daha yüksek olduğunu, ancak ifade seviyeleri ile yaş, vücut kitle indeksi, menopoz durumu, histolojik tip, histolojik derece, tümör evresi, tümör boyutu, lenf düğümünde metastazis gibi özelliklerle anlamlı bir ilişkisi bulunmadığını bildirmişlerdir. Çalışmada ayrıca bu miRNA'nın meme tümörü tanısında biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiş ve malignitenin kontrolü için hedeflenme potansiyeli olduğu ifade edilmiştir. Wang ve ark. (2018), erken teşhisli meme kanserinde tanı ve prognozda kullanılmak üzere kan dolaşımındaki

miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelini araştırdıkları çalışmada miR-222-3p'nin dahil olduğu dört farklı miRNA'nın cerrahi müdahale sonrasında ifadelerinde anlamlı derecede düşüş bildirmiş ve bu miRNA'ların (miR-130b-5p, miR-151a-5p, miR-206 ve miR-222-3p) tanı ve prognoz için potansiyel belirteçler olabileceğini ifade etmişlerdir. Bunun yanı sıra, miR-222-3p'nin hastalıksız sağkalım için bağımsız bir prognostik faktör olduğu bildirilmiştir. Fang ve ark. (2019), 13 miRNA'nın plazma konsantrasyonlarının çiftler halinde malign, benign ve sağlıklı örneklerden oluşturulmuş havuzlarda erken evre meme tümörü vakalarında biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelini global miRNA ifade profilendirmesi ile araştırmışlardır. Çalışma kapsamında malign/sağlıklı, malign/benign, malign/sağlıklı+benign örnekler arasında en anlamlı ifade değişikliği görülen miRNA çiftleri tespit edilmiştir. İfadesi araştırılan 13 miRNA'dan biri olmasına karşın miR-222-3p önerilen panellerdeki miRNA çiftleri arasında yer almamıştır. Zhang ve ark. (2019), HER2 pozitif ve üçlü negatif meme tümörü örnekleri arasında miRNA profillerini karşılaştırmış ve miR-20a-5p, miR-221-3p, miR-362-5p, miR-502-3p ve miR-222-3p miRNA ifadelerinin üçlü negatif meme tümörü örneklerinde anlamlı derecede daha yüksek ifade edildiğini bildirmişlerdir. Zhang ve ark. (2020), neoadjuvan terapi alan HER2 pozitif meme tümörü hastalarında serumdaki miR-222-3p ifadesinin patolojik tam yanıtın tahmini, sağkalıma faydaları ve trastuzumab uyarımlı kardiyotoksisite ile ilişkili potansiyel bir etken olabileceğini bildirmişlerdir. Yüksek miR-222-3p ifadesi trastuzumab direnci ile bağlantılı olabilecek düşük patolojik tam yanıt ve zayıf prognozla ilişkili bulunmuştur. Kardiyotoksisite için ise yüksek miR-222-3p ifadesinin kalbin korunmasında etkili olabileceği öne sürülmüştür. Ahmed ve ark. (2021), invaziv ve invaziv olmayan meme tümörü vakalarında, küçük ekstraselüler veziküllerde bulunan miR-181b-5p, miR-222-3p ve let-7a-5p ifadelerinin tanıda biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelini araştırmışlardır. miR-222-3p ifadesinin invaziv meme tümörü vakalarında daha yüksek olduğu bildirilmiş, miR-222-3p ve let-7a-5p ifadeleri birlikte değerlendirildiğinde invaziv ve invaziv olmayan meme tümörü vakalarının ayrımının güçlü bir şekilde yapılabildiği ifade edilmiştir.

Köpekte ve insanda bağlanma bölgeleri farklı olmasına karşın, hsa-miR-222-3p'nin onkogenik etkili olduğu ve her iki türde bu miRNA dizilerinin PALB2 protein

ifadesini baskılayabileceği görülmektedir. Köpektaki varyant pozisyonunda meydana gelen nükleotit değişiminin miRNA affinitesine etkisi ise bu alanda herhangi bir çalışma yapılmış kadar merak konusudur.

cfa-miR-8842, cfa-miR-8821 ve cfa-miR-8846 miRNA'ları ise insanda homologu bulunmayan miRNA'lardır ve bu miRNA'lara ilişkin köpek türünde yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır.

miRNA-mRNA etkileşimlerinde, miRNA dizisi veya hedef gendeki bağlanma bölgesinde bulunan nükleotit dizilerinde meydana gelen polimorfizmler miRNA aracılı transkripsiyon sonrası gen regülasyonunu etkileyebilir. Bunun nedeni polimorfizm görülen miRNA bağlanma bölgelerinde transkript ile miRNA affinitesinin değişmesi nedeniyle daha kuvvetli bağlanma veya daha düşük güçte bağlanma gerçekleşmesidir. İnsanlarda miRNA hedef genlerinde bulunan bağlanma bölgelerindeki tekli nükleotit polimorfizmleri (TNP) genom boyu ilişkilendirme çalışması yapılarak sağlıklı ve kanserli dokularda araştırılmıştır (Ying, 2008). Bazı genlerde miRNA hedef genlerinin miRNA bağlanma bölgelerinde tespit edilen TNP'lerin frekanslarının, popülasyondaki tümörlü bireylerde ve sağlıklı bireylerde farklı bulunduğu bildirilmiştir. Bazı miRNA'ların hedef genlerindeki miRNA bağlanma dizilerinde tespit edilen TNP'lerin frekansı sağlıklı bireylerde; bazı miRNA'ların hedef genlerindeki miRNA bağlanma dizilerinde tespit edilen TNP'lerin frekansı ise tümörlü bireylerde daha yüksek görülmüştür. İlgili çalışma (Ying, 2008) TNP'ler nedeniyle miRNA bağlanma bölgelerinde miRNA'ların yabancı tip dizi ve mutant dizilere affinitesinin farklı olduğunu ve bu nedenle ilgili hedef genlerin transkripsiyon sonrası regülasyonlarında değişiklik meydana geldiğini ve ifadelerinin değiştiğini öne sürmüştür.

Her bir miRNA bağlanma bölgesindeki TNP için Ying ve ark. (2008)'nın önerdiği gibi yabancı dizi ve mutant diziler için gen regülasyonunun etkilenmesi ve gen ifadelerinin değişmesi nedeniyle tümör oluşumunun tetiklenmesi mümkün görünmektedir. Ancak bu şimdilik yalnızca bir hipotezdir ve ilgili durumun deneysel olarak test edilmesi gerekmektedir. Yabancı allel ve mutant allelin miRNA ve mRNA

arasındaki ilişkiye etkisinin ve gen ifadelerindeki potansiyel değişikliklerin belirlenebilmesi için fonksiyonel testlere gereksinim vardır. Tez çalışması kapsamında tespit edilen ve bağlanma skorları %84 olarak görünen (Sticht ve ark., 2018) cfa-miR-222, cfa-miR-8842, cfa-miR-8821 ve cfa-miR-8846 miRNA'larının *PALB2* mRNA dizisine gerçekten bağlanıp bağlanmadığının ve ifade değişimlerinin protein sentezine olan etkilerinin araştırılması için ileri aşamalarda fonksiyonel testlerin kullanılması önerilmektedir.

Ekzon 7 bölgesi varyantının *splice* mekanizmasına etkilerinin araştırılması için yapılan sorgulama sonucunda *EX-SKIP* (Raponi ve ark., 2011) aracı mutant dizide ekzon atlanma ihtimalinin daha yüksek olduğunu bildirmiştir. *Human Splicing Finder* (Desmet ve ark., 2009) aracında ise c.2639C>A ve c.2639C>G olası insan varyantları *splice* sinyallerinde herhangi bir anlamlı etkiye neden olmamış, yalnızca c.2639C>T olası varyantı *splice enhancer* ve *silencer* motif oranlarında değişikliğe neden olmuş ve pozisyon için kriptik donör bölge aktivasyonu olabileceği bildirilmiştir. Ekzon 7'de köpek transkriptinde de sitozinden timin nükleotidine substitüsyon gerçekleşen bu varyantın (insanda c.2639C>T) hem yeni donör bölge yaratması hem de yardımcı sinyallerde değişikliğe yol açması önemlidir. A1050V varyantı alternatif *splice* mekanizmasında da değişikliğe neden olabilir. İntron 6 varyantı değerlendirilirken yapılan yorumların bu varyant üzerine de yapılabilmesi mümkündür.

Ekzon 7 varyantı için son olarak TF bağlanması üzerinde durulmuştur. Transkripsiyon faktörleri (TF) DNA'daki düzenleyici dizilere bağlanarak transkripsiyonu artırmak veya azaltmak suretiyle gen ifadesini düzenlemektedir. Bazı transkripsiyon faktörleri gen ifadesini artırarak aktivatör görevi görmekte, bazıları ise transkripsiyonu baskılayarak represör görevi görmektedir. DNA'da bulunan düzenleyici diziler genin yakınında, uzağında veya gen bölgesinde bulunabilmektedir (Klug ve ark., 2019). Transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinde meydana gelen tekli nükleotid polimorfizmleri regülatör proteinlerin bu bölgelere olan affinitelerini değiştirebilmekte, yeni TF bağlanma bölgelerine neden olabilmekte veya TF bağlanmasına olumsuz etki edebilmekte ve bu nedenle pankreas kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri, Parkinson hastalığı, koroner arter hastalığı, bilişsel hasar,

sistemik lupus eritematozu gibi kompleks hastalıklara ve patolojik durumlara neden olabilmektedir (Degtyareva ve ark., 2021). Meme dokusundaki normal hücrelerin malign karaktere dönüşümünde bir dizi gen ve proteinin aktivitesindeki değişikliklerin rol aldığı ve bu süreçte çeşitli hormonların (bunlar transkripsiyon faktörü olarak görev yapmaktadır) ve transkripsiyon faktörlerinin önemli etkileri olduğu bilinmektedir (Mester ve Redeuilh, 2012). Bu nedenle TF'lerini taklit eden ve meme tümöründe kritik rol oynayan genlerin aktivasyonunu veya baskılanmasını hedefleyen sentetik oligonükleotitler ile bireysel tümör tedavilerine ilişkin çalışmalar yapılması söz konusudur (Piva ve Gambari, 2002). Benzer şekilde TF olarak görev yapan çeşitli hormonlar da farklı preparatlar ile hedeflenerek gen regülasyonu normal seyrine döndürülmeye çalışılmaktadır (Mester ve Redeuilh, 2012).

Ekzon 7 bölgesindeki c.3149C>T varyantının bulunduğu pozisyonda yabancı ve mutant dizilere ortak olarak bağlanabilen iki adet TF olduğu tespit edilmiştir. Yalnızca yabancı diziye bağlanabilen altı, yalnızca mutant diziye bağlanabilen ise üç farklı TF olduğu dikkati çekmiştir. Yabancı tip diziye bağlanabilen ELF1, EZH2, RELA, RUNX1, SP1 ve TRIM28 TF'lerinin meme tümörü ile ilişkileri özetlenmeye çalışılmıştır.

GABPa, *elk-1*, *elf-1* (*E74-like factor-1*) ve *PEA3* gibi ETS (*Erythroblast Transformation Specific*) TF ailesine özgü bağlanma bölgesini taşıyan bazı genlerin insan meme tümörü hücre hatlarında *HER2* promotor bölgesine bağlanma potansiyeli olduğu ve *HER2* gen ifadesini artırabileceği bildirilmiştir (Scott ve ark., 1994). *BRCA2* geni promotor bölgesinde USF-1 ve USF-2 bağlanmadığı takdirde Elf-1 transkripsiyon faktörünün bağlanabildiği ve bu üç TF'nin *BRCA2* regülasyonunda önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Davis ve ark., 1999). Hu ve ark. (2004), *ELF1* ifadesinin sağlıklı fare ve insan meme dokularında yüksek olduğunu, meme tümörü bulunan dokularda ise diğer ETS ailesinde bulunan TF'lerin aksine her iki türde de gen ifadesinin düştüğünü bildirmişlerdir (Hu ve ark., 2004). Gerloff ve ark. (2011) nükleustaki Elf-1 ifadesinin tümörün histolojik derecelendirmesi ve tümör boyutu ile ters orantılı olduğu bildirmiş ancak hastalığın prognozu ile ilişkili herhangi bir çıkarımda bulunulmamıştır. ChIP veri setleri ile meme tümörü hücre hattında yapılan

bir çalışma (Duan ve ark., 2020) sonucunda ELF-1'in kemokin aracılı malign tümör hücrelerinin regülasyonunda görevli olduğu bildirilmiştir.

Yapılan çalışmalara bakıldığında, ELF-1'in meme tümörü tedavisi ve prognozunda önemli olan HER2 ve DNA tamirindeki görevi nedeniyle tümör baskılayıcı komplekste görevli BRCA2 ile etkileşime geçebileceği, ifadesinin fare ve insan türlerinde normal meme dokusunda yüksek, tümörlü dokularda ise düşük olması, bununla birlikte tümörün histolojik derecesi ile ifadesinin ters orantılı olması söz konusudur. PALB2 proteini de DNA tamirinde BRCA2 proteini gibi tümör baskılayıcı komplekste bulunmaktadır. ELF-1'in yabancı diziye bağlanıp mutant diziye bağlanmaması, yabancı diziye taşıyan hücrelerde tümör gelişimini uyarma potansiyeli bulunan çift zincir kırıklarının tamirinde PALB2 ifadesinin uyarılarak tümör baskılayıcı etkiye katkı sunabileceğine ilişkin yeni bir hipotez oluşturulmasını sağlayabilir. Ancak, yabancı dizi ve mutant dizi ile ELF-1 etkileşiminin fonksiyonel testler ile belirlenmesi gerekmektedir.

EZH2 (*Enhancer of zeste-2*) histon metil transferaz aktivitesi bulunan, kromatinin yeniden modellenmesinde ve DNA metilasyonunda direkt olarak görev yapan bir TF olarak bilinmektedir (Chase ve Cross, 2011; Simon ve Lange, 2008 ve Zeidler ve Kleer, 2006). EZH2'de meydana gelen değişikliklerin duruma göre hem tümör baskılayıcı hem de tümör oluşumunu tetikleyici etkileri olabildiği ifade edilmektedir (Anwar ve ark., 2021). İnvaziv ve metastatik meme tümörleri gibi agresif meme tümörlerinde ifade artışı gözlenen bu TF'nin aşırı ifadesi, yüksek histolojik dereceler, ER ve PR negatif vakalar ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Chase ve Cross, 2011; Simon ve Lange, 2008 ve Zeidler ve Kleer, 2006). Yine bu vakaların çoğunlukla HER2 pozitif vakalar olduğu (Wang ve ark., 2015) ve yüksek p53 ifadesi görüldüğü bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2016). EZH2 retinoblastoma ailesindeki tümör baskılayıcı proteinlerin histon deasetilaz-1 aktivitesi ile yarışarak bu genlerin inaktif kalmasına neden olmaktadır ve bu durum tümörlerde agresif karakterle ilişkilendirilmektedir (Tonini ve ark., 2008). EZH2 proteininin PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*) kompleksinin katalitik alt ünitesi olduğu bilinmektedir. Aynı komplekste bulunan EED proteininin kristal yapısına bakıldığında, PALB2

proteinindeki gibi yedi yapraklı β -pervane yapısında bir WD tekrarı içerdiği bu tekrar bölgesi ile EZH2 proteininin amino bölgesinin etkileşim kurduğu bildirilmiştir (Tan ve ark., 2014). Protein domainlerindeki yapısal benzerliğe bakılarak, EZH2 proteininin PALB2 proteini WD40 domaini ile de direkt olarak etkileşime geçebilme potansiyeli olduğuna dair bir çıkarımda bulunmak mümkündür, ancak bu iddianın gerek *in silico* analizler gerekse fonksiyonel testlerle doğrulanması gerekmektedir. EZH2 mutanları ile yapılan çalışmalar, farelerde normal meme bezi gelişiminde de bu proteinin önemli olduğunu göstermiştir (Bae ve Hennighausen, 2014). Yüksek EZH2 ifadesi görülen meme epitel hücrelerinde RAD51 paraloglarının mRNA ifadesinde düşüş olduğu tespit edilmiş ve EZH2 ifadesi ile HR mekanizması arasında bir ilişki olabileceği ve bu ilişkinin araştırılması gerektiği ifade edilmiştir (Zeidler ve Kleer, 2006). EZH2'nin HR mekanizmasında görevli *RAD51* genini hedeflemesinin yanı sıra, BRCA1 mutasyonlarının agresif karakter ve zayıf prognoz gözlemlenen üçlü negatif meme kansinomlarına neden olması ve EZH2 ifadesinin bu tip kanserlerde yüksek görülmesi, EZH2 ifadesi yüksek olduğunda BRCA1 fosforilasyonunun düşmesi sonucu hücre proliferasyonunun uyarılması ve BRCA1 eksikliği bulunan fare meme tümörü vakalarında EZH2 inhibitörüne hassasiyetin 20 kat arttığına dair veriler, BRCA1 ile bu TF arasında ilişki kurulabileceğini göstermiştir (Bae ve Hennighausen, 2014). EZH2'nin hormona dirençli kanserlerde umut verici bir terapötik hedef olduğu ve tedavide EZH2 inhibitörlerinin diğer terapötik ajanlarla birlikte kullanılabileceği bildirilmiştir (Deb ve ark., 2013 ve Walsh ve ark., 2016).

RELA, NF-kB (Nükleer faktör kappa B) alt ünitesidir, transkripsiyon faktörü p65 olarak da bilinmektedir ve hücresel proliferasyon, neoplastik transformasyon, apoptozis kontrolünde yer alan birçok genin regülasyonunu düzenlemektedir. Kim ve ark. (2000), RELA ve AhR'nin bir onkogen olan *c-myc*'nin meme hücrelerinde transaktivasyonunu birlikte sağladıklarını tespit etmiştir. Ricca ve ark. (2001), RELA'nın aşırı ifadesinde hücre proliferasyonunda azalma ve apoptozisin aktivasyonunun uyarıldığını tespit etmiş, ayrıca RELA ifadesi yüksek hücre hatlarının enjekte edildiği atimik farelerde tümör oluşumunun azaldığını ve tümörün görünür hale gelme sürelerinin ortalamasında artış görüldüğünü bildirmiştir. Van Laere ve ark. (2006), yangısal meme tümörü ve yangısal olmayan meme tümörü örneklerinde

yaptıkları araştırmada NF-kB ve hedef genlerinin ifadelerini incelemiş, yangısal meme tümörü örneklerinde NF-kB hedef genlerinin ifadelerinde artış tespit etmiş, ancak RELA ifadesi açısından iki grup arasında herhangi bir farklılık tespit edememişlerdir. Lerebours ve ark. (2008), ise çalışmalarında yangısal meme tümörü grubunda, yangısal olmayan meme tümörü grubuna kıyasla *RELA* dahil olmak üzere birçok NF-kB ilişkili genin ifadesinde anlamlı derecede artış görüldüğünü bildirmiştir. Lee ve ark. (2011), ER negatif bazal benzeri meme tümörü hücrelerinde EZH2'nin RELA ve RELB ile fiziksel etkileşime girerek NF-kB ifadesini artırdığını; bununla birlikte lümen benzeri ER pozitif hücrelerde ise histon metilasyonunu yönlendirerek NF-kB ifadesini baskıladığını göstermişlerdir. Liu ve ark. (2012), RELA'nın fosforilasyonunun, tümör nekrozis faktörüne yanıt olarak DNMT-1'in kromatine doğrudan alınmasını sağladığını; bunun ardından metastazisi önleyici *BRMS1* geninin promotor bölgesinde DNA metilasyonuna neden olduğunu tespit etmiştir. RELA'nın bu şekilde *BRMS1*'in aktif transkripsiyonunu baskılayarak tümör metastazisini uyardığını bildirmişlerdir. Bouchal ve ark. (2015), proteom ve transkriptom çalışmaları sonucunda, düşük dereceli meme tümörlerinde metastazis görülmesi ve RELA'nın dahil olduğu bazı protein ifadelerinin arasında korelasyon görüldüğünü ve bu protein ifadelerinin biyobelirteç olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Kim ve ark. (2018) ise NFATc2 ve NFkB1/RELA'nın, hücre göçü ve invazyonunda etkili bir proto-onkogen olduğu bilinen *ETS1* geninin promotor bölgesinde tespit edilen düzenleyici element ile etkileşime geçerek, gen ifadesini artırdığını tespit etmiştir. Jeong ve ark. (2019), *RELA* geninde DNA metilasyon düzeyinin TNF- α ifadesine bağlı olarak artış gösterdiğini ve bu örneklerde aynı zamanda NF-kB1 ifadesinin arttığını bildirmişlerdir. Biswas ve ark. (2019), primer meme tümörlerinde lenf düğümlerine metastazis ile ilişkisi olduğu tespit edilen *CXCL13* ve *CXCR5* mRNA ifadeleri ile *RELA* ifadesi arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermiş; RELA'nın *CXCL13* promotor bölgesine bağlanarak gen ifadesini artırdığı ve tümör metastazisinde rol oynadığını bildirmişlerdir. Kemoterapide oluşan direnç mekanizmasının üstesinden gelebilme amacıyla, RELA ile negatif bir geri besleme döngüsü oluşturacak miR-519d-5p gibi miRNA'lar veya CRL1101 gibi küçük inhibitör moleküllerin ve kemoterapötik ajanların kombinasyon halinde kullanımına yönelik yeni tedavi stratejileri önerilmektedir (Kanzaki ve ark., 2021 ve Li ve ark., 2021). Yapılan

çalışmalar ele alındığında özetle RELA'nın onkogenlerin ifadelerinde artışa neden olduğu ve metastazisi tetikleyecek gen ifadelerini uyardığı, HR mekanizması ve PALB2 proteinine ilişkin ise herhangi bir çalışma bulunmadığı görülmektedir.

RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*), onkogen veya tümör baskılayıcı gibi davranabilen, aynı aileye bağlı üç transkripsiyon faktöründen birisidir (Chimge ve Frenkel, 2013; Groner ve ark., 2017 ve Janes, 2011). Bu TF, RUNX ailesindeki TF'leri arasından meme epitelinde baskın şekilde ifade edilen ve tümör oluşumlarında regülasyonunda bozukluklar meydana gelebilen bir transkripsiyon faktörüdür (Chimge ve Frenkel, 2013 ve Janes, 2011). Janes (2011), meme tümöründe RUNX1 TF'nün tümör baskılayıcı olarak rol oynayacağı hipotezini öne sürmüştür. Chimge ve Frenkel (2013) ise primer tümör örneklerinde tespit edilen RUNX1 somatik mutasyonlarını, bu TF'nün östrojen sinyali antagonisti olarak görev yapmasını ve ifadesinin agresif tümörlerde azalmasını öne sürerek bu düşüncüyü desteklemiştir. Van Bragt ve ark. (2014), RUNX1'in önemli bir regülatör olduğunu; kaybının ER+ luminal meme tümörü hücrelerinde TP53 ve RB1 kaybına neden olabildiğini farelerde yaptıkları gen susturma çalışmasında göstermişlerdir. Buna karşın Ferrari ve ark. (2014), primer invaziv duktal meme tümörü vakalarında yaptıkları çalışmada üçlü negatif meme tümörü vakalarında RUNX1 ifadesini kötü prognozla ilişkilendirmiştir. Browne ve ark. (2015), transgenik fare meme tümörü modelinde yaptıkları çalışmada RNA interferens ile Runx1 ifadesini baskıladıklarında, agresif kanser fenotipine neden olan hücre göçü ve invazyonunun anlamlı ölçüde ortadan kalktığını göstermiş ve RUNX1'in bu bilgiler doğrultusunda insanlarda da onkogenik etki gösterebileceğini öne sürmüşlerdir. Chimge ve ark. (2016), ER+ meme tümörlerinde RUNX1'in östrojen aracılı AXIN1 supresyonunu engellediğini ve β -catenin aktivasyonunu sağlayarak tümör baskılayıcı olarak görev yaptığını *in vitro* ve *in vivo* olarak göstermişlerdir. Barutçu ve ark. (2016), RUNX1'in meme tümörü hücre hattında kromatin organizasyonu ve gen regülasyonuna etkilerini incelemiş, RUNX1 gen susturmasının hücre dışı matriks içeriği ile ilişkili genlerin ifadesinde düşüşe neden olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada RUNX1 ifadesinin aynı zamanda uzun kodlanmayan RNA'lar olan NEAT1 ve MALAT1 ifadelerini de düzenlediği tespit edilmiş, kromatin organizasyonunda ise genel bir düzenlemede değil, bölgesel olarak

işlevsel olduğu bildirilmiştir. Recouvreux ve ark. (2016), RUNX1'in onkogen RSPO3 ve tümör baskılayıcı GJA1'in promotor bölgelerine bağlanabildiğini, sırasıyla bu proteinlerin ifadelerini artırdığı ve azalttığını tespit etmiş; ayrıca FOXP3 proteini ile normal meme tümörü hücrelerinde fiziksel olarak etkileşime girdiğini ve bu etkileşimin RUNX1 transkripsiyonel aktivitesini bloke ettiğini ve buna bağlı olarak tümör hücrelerinin göçünde düşüş tespit edildiğini bildirmişlerdir. Hong ve ark. (2017), normale benzer MCF10A hücre hattında, epitelyal-mezenkimal transisyon uyarılınca RUNX1 ifadesinde kayıp meydana geldiğini, RUNX1'in tükenmesi sonucunda hücrelerin mezenkimal hücre morfolojisine dönüştüğü gözlemlenmiştir. RUNX1 ifadesi yeniden sağlandığında ise meme tümörü hücrelerinin epitel morfolojisini geri kazanabildiği görülmüş, bunun E-cadherin'in doğrudan kontrolü üzerinden gerçekleştiği bildirilmiştir. Düşük RUNX1 ifadesi kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Karanlı-Ceppioğlu ve ark. (2017), transkripsiyon sonrası histon modifikasyonlarının meme tümörleri üzerine etkisini incelemiş, epigenetik olarak düzenlenmiş ve meme tümörünün ilerlemesi ile ilişkilendirilmiş genlerden oluşan bir ağ yapısı meydana getirmişlerdir. Bu ağ yapısının merkezinde bulunan *PAX3*, *DLX5*, *RUNX1* ve *GATA4* genlerinden, *RUNX1*'in onkogen işlevine sahip olduğu gösterilmiştir. Chimge ve ark. (2017), ER- meme tümörü alt tiplerinde RUNX1 ve AXIN1 ifadeleri arasında korelasyon tespit etmiş, ER+ ve ER- tip tümörlerde agresyonun AXIN1'e özgü farklı *splice* varyantlarının ifade oranları ile ilişkilendirilebileceğini öne sürmüşlerdir. Kulkarni ve ark. (2018), RUNX1 ve RUNX3 ifadelerinin meme epitel hücre hatlarında YAP ifadesini baskılayarak, YAP aracılı hücre göçü ve kök hücre karakteristiği kazanmak gibi faaliyetlerini ve epitelyal mezenkimal transisyonu engellediğini bildirmişlerdir. Hong ve ark. (2018), meme tümörü hücrelerinde RUNX1'in ektopik ekspresyonun, farelerde meme yağ yastığında hücre göçü, invazyon ve *in vivo* tümör büyümesini %57 oranında azalttığını bildirmişlerdir. RUNX1'in kanser kök hücre aktivitesinin baskılanmasındaki mekanizmasının, ZEB1 ifadesinin doğrudan inhibe edilmesi ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Fritz ve ark. (2020), RUNX1 kaybının epitelyal-mezenkimal dönüşümde önemli bir tetikleyici olduğunu bildirmişlerdir. Gao ve Zhou (2021), tümörün patogenezi ve metastazisin immun sistem hücrelerinden etkilenebileceği gerekçesi ile meme tümöründe RUNX ve TGF- β aracılı immun hücre infiltrasyonunun

regülasyonunu araştırmış; RUNX ailesi üyelerinin ifade düzeyleri, mutasyonları, gen kopya sayıları ve metilasyon durumlarına bağlı olarak meme tümöründe çeşitli bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonunu etkileyebileceğini tespit etmişlerdir. Çalışmada RUNX1 mutasyonlarının meme tümöründe CD8⁺T, CD4⁺T hücrelerinin ve makrofajların infiltrasyonunu önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir. Lan ve ark. (2021), meme tümörü dokusunda STAT3, TIPE2 ve RUNX1 protein ifadelerinin, klinik durum ile ilişkisini immunohistokimya ve hasta verilerini karşılaştırarak araştırmıştır. Gözlem grubunda RUNX1 ifadesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Çalışmada STAT3 ifadesinde artış, TIPE2 ve RUNX1 ifadelerinde düşüş, zayıf histolojik farklılaşma, TNM evreleri III ve IV ile uzak dokulardaki metastazis, meme tümörü hastalarının 2 yıllık prognozunu etkileyebilecek faktörler olarak tanımlanmış; üç proteine ait ifadelerin birlikte değerlendirilmesi gerektiği üzerinde durulmuştur. Yapılan çalışmalar RUNX1 ifadesinin meme tümöründe onkogen veya tümör baskılayıcı işlevlerinin bulunabileceğini göstermiş, ancak HR mekanizması veya PALB2 proteini ile ilişkili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

SP1 (*Specificity protein 1*) transkripsiyon faktörü, meme tümöründe onkogen gibi fonksiyon gösteren birçok genin regülasyonunda rol oynamaktadır. Örneğin, ER⁺ meme tümörü hücre hattında, *c-fos* protoonkogeninin (Duan ve ark., 1998), IGFBP-4 (Qin ve ark., 1999), ADA (Xie ve ark., 1999), *cad* (Khan ve ark., 2003), PR (Petz ve Nardulli, 2000; Petz ve ark., 2004 ve Schultz ve ark., 2003), VEGF (Stoner ve ark., 2004), IGF-1R (Maor ve ark., 2006), $\alpha_5\beta_1$ integrin (Sisci ve ark., 2010) proteinlerinin östrojen ile uyarımı için SP1'in ER ile oluşturduğu kompleksin gerekli olduğu tespit edilmiştir. SP1, ER α ifadesi için gereklidir (DeGraffenried ve ark., 2002), ayrıca canlı meme tümörü hücrelerinde ER α ve SP1 arasındaki etkileşim FRET (Floresan rezonans enerji transferi) analizi ile *in vitro* olarak kanıtlanmış (Kim ve ark., 2005), DNA-SP1/ER α ilişkisi PR gen ifadesi üstünden SPR (Yüzey plazmon rezonans) spektroskopisi ile gerçek zamanlı olarak gösterilmiştir (Siew ve ark., 2009). ER⁺ meme tümörü hücrelerinde, epitel hücrelerinde büyümenin baskılanmasına neden olan TGF- β 'ya karşı gelişen direncin mekanizması araştırılmış; SP1 düzeyi kararlı halde olmayan hücrelerde TGF- β reseptörü tip II'nin ifadesinde düşüş görüldüğü ve kararlı

SP1 düzeylerinde bu reseptörün ifadesinin artarak hücrelerin TGF- β için duyarlı hale geldiği bildirilmiştir (Ammanamanchi ve ark., 1998). Benzer şekilde SP1 eksikliği bulunan hücrelerde TGF- β reseptörü tip I'in ifadesinin baskılandığı tespit edilmiştir (Periyasamy ve ark., 2000). Abdelrahim ve ark. (2002), SP1 transkripsiyon faktörünü siRNA ile inhibe ettikleri çalışmada, bazal ve östrojen uyarımlı büyüme ile gen ifadelerinde SP1'in kritik derecede önemli olduğunu bildirmişlerdir. Meme tümörü hücrelerinde SP1'in yağ asidi sentezlenmesinde görevli FAS'ı regüle ederek lipogenez ve hücre proliferasyonunu uyardığı bildirilmiştir (Lu ve Archer, 2010). SP1 ayrıca çeşitli proteinlerin birbirlerinin ifadelerini uyardığı durumlarda aracı olarak işlev görebilmekte; buna örnek olarak prolaktin reseptörü ile progesteron (Goldhar ve ark., 2011), HBXIP ile PDGFB onkoproteinleri (Zhang ve ark., 2013) veya benzer şekilde HBXIP ile LMO4 (Yue ve ark., 2013) arasındaki ilişki gösterilebilmektedir. HBXIP onkogeninin SP1 aracılığıyla ZEB1 (Jiang ve ark., 2018) ve FGF4 (Shi ve ark., 2016) gibi proliferasyon ve migrasyonu uyuracak proteinlerin ifadesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir. Knappskog ve ark. (2011), p53 proteinine bağlanarak inhibisyonuna neden olan MDM2 fosfoproteininin promotor bölgesinde tespit edilen iki varyantın, SP1 ile etkileşimini nasıl etkilediğini SPR spektroskopisi ile incelemiş; SNP309T>G promotor polimorfizminin SP1 bağlanmasını artırarak kanser riskinde yükselişe; SNP285G>C polimorfizminin ise SP1 bağlanmasını azaltarak, tespit edildiği Kafkas popülasyonunda yumurtalık ve meme kanseri riskinde düşüşe neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu durum hedef genlerde SP1 bağlanma bölgesinde meydana gelen varyantların kansere yatkınlık ve direnç durumunda değişikliğe yol açabileceğini göstermiştir. SP1 ile ilgili daha önce bahsedilen proteinlerin karsinogenik etkileri ve proliferasyonu artırmaları söz konusu olduğu halde, ilerlemiş meme tümörü vakalarında SP1 hedeflerinden biri olan DIRAS3 ifadesinin SP1 yokluğuna bağlı olarak düşüş göstermesinin metastazisi uyardığı tespit edilmiş, tümör başlangıcında terapötik olarak hedeflenme potansiyeli bulunan SP1'in geç dönemde ifadesinin uyarılmasının prognoz açısından önemli olabileceği üstünde durulmuştur (Li ve ark., 2014). Benzer bir şekilde luminal meme tümörü alt tipinde düşük PAR3 ifadesinin tümör oluşumu ve artan metastazis ile ilişkilendirildiği ve bu protein ifadesinin SP1 tarafından tetiklendiği, SP1 ifadesinin susturulması söz konusu olduğunda ise metastatik davranışta artış ve kötü prognoz görüldüğü bildirilmiştir (Zhao ve ark.,

2021). SP1 aktivitesi ve HR mekanizmasında görevli proteinler arasındaki ilişki araştırıldığında ise BRCA1 ve BRCA2 proteinleri ile ilişkili çalışmalar göze çarpmaktadır. Maor ve ark. (2000), tarafından gerçekleştirilen çalışmada IGF-IR ifadesinin BRCA1 tarafından baskılandığı tespit edilmiş, iki protein arasındaki bu ilişkinin SP1 aracılığıyla gerçekleşebileceği hipotezi öne sürülmüştür. Abramovitch ve ark. (2003), aynı ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında EMSA ve birlikte immunopresipitasyon analizleri ile BRCA1 ve IGF-IR arasında doğrudan bir ilişki olmadığını göstermiş, BRCA1 proteininin SP1 ile etkileşime girerek IGF-IR'nin promotor bölgesine bağlanmasına engel olduğunu bildirmişlerdir. Maor ve ark. (2007), IGF-I'in SP1 aracılığıyla BRCA1 ifadesini uyardığını ifade etmişlerdir. Aynı yıl yaptıkları bir başka çalışmada ise *BRCA1* mutasyonu bulunan ve bulunmayan primer meme tümörü örneklerinde, immunohistokimya ile IGF-IR düzeylerinin mutasyon bulunan örneklerde anlamlı derecede yüksek çıktığını belirlemiş, kromatin immunopresipitasyon ile SP1'in BRCA1 transaktivasyonunda görev aldığını göstermişlerdir. Jin ve ark. (2008), BRCA2, p53, ER α , ER β etkileşimlerinin BRCA2 ifadesine etkilerini araştırdıkları çalışmada, BRCA2 promotor bölgesinde bulunan SP1 bağlanma bölgeleri dikkat çekmektedir. Yapılan çalışmalar SP1'in hedef genlerinin promotor bölgelerine bağlandığını ve genlerin ifadelerini artırdığını göstermektedir. Ayrıca bu hedef genlerin bazı istisnalar haricinde onkogenik etki gösteren, hücre büyümesi, proliferasyonu, invazyonu ve metastazisi uyarıcı etkilerde bulunan genler olduğunu söylemek mümkündür.

Ekzon 7 bölgesinde yalnızca yabancı diziye bağlanabildiği görünen son transkripsiyon faktörünün TRIM28 (*Tripartite motif containing 28*) olduğu görülmüştür. Bu transkripsiyon faktörünün meme ve akciğer tümörlerinde mRNA ifadesinin sağlıklı dokulara nazaran daha yüksek olduğu ve erken evre akciğer kanserlerinde TRIM28 ifadesi yüksek bulunan hastalarda sağkalımın daha yüksek olduğu gözlemi, Chen ve ark. (2012)'nin bu proteinin proliferasyonu engellediğine ilişkin bir hipotez geliştirmelerini sağlamıştır. Bu hipotezin test edilmesi için gerçekleştirilen çalışmada, meme ve akciğer tümörü hücre kültürlerinde TRIM28 ifadesinin hücre proliferasyonunu E2F ailesinde bulunan transkripsiyon faktörlerini

baskılayarak engellediği tespit edilmiştir. HR mekanizması ve TRIM28 aktivitesine ilişkin ise herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır.

Ekzon 7 bölgesi için AIRE, EGR3 ve SETDB1 transkripsiyon faktörlerinin mutant diziye bağlanabileceği tespit edilmiştir. Bu transkripsiyon faktörlerinin meme tümörü ve varsa HR mekanizması ile ilişkileri özetlenmeye çalışılmıştır.

AIRE (*Autoimmune regulator gene*) T lenfositlerin canlının kendi dokularında üretilen antijenlere karşı tolerans geliştirmesini düzenleyen, defekt bulunması durumunda çeşitli otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilebilen bir transkripsiyon faktörüdür. Bianchi ve ark. (2016), AIRE ifadelerini araştırmış ve meme tümörü vakalarının üçte birinde AIRE ifadesi tespit etmişlerdir. AIRE ifadesi bulunan grubun sağkalım süresinin diğer gruba göre daha yüksek olduğu bildirilmiş, ER+ meme tümörü vakalarında AIRE ifadesi ve iyi prognoz arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmiş, ayrıca luminal meme tümörü hücre hatlarında AIRE ifadesinin tümör agresyonunda düşüş ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir.

EGR3 (*Early growth response 3*) ekzon 7 bölgesindeki varyant pozisyonunun dahil olduğu nükleotit dizisine bağlanabilen diğer bir TF'dir. Inoue ve ark. (2004), ER+ meme tümörü hücre hattında EGR3'ün östrojen sinyal yolağında bulunduğunu, östrojen etkisiyle uyarılarak ifade artışı gösterdiğini tespit etmiş, ayrıca NAB2, FasL ve TSC403 ifadelerini uyararak meme tümörünün ilerlemesi ve metastaziste etkili olabileceğini ifade etmişlerdir. Suzuki ve ark. (2007), EGR3 ifadesindeki artışın lenf yumrularının durumu, uzak organ metastazisi ve bazı hastalarda tümörün nüksetmesi ile pozitif korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. Hayashi ve Yamaguchi (2008) ise EGR3'ün ER α tarafından hedeflendiğini ve meme tümöründe invazyonu uyardığını bildirmiştir. Buna karşın, Li ve ark. (2017), NCBI-GEO'dan elde ettikleri 14 meme tümörü veri seti ile yaptıkları biyoinformatik çalışmada, EGR3 ifadesinin meme dokusu örneklerinde düşüş, kan örneklerinde ise artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Yapılan bir başka biyoinformatik çalışmada (Liu ve ark., 2021) EGR3 ile hastalığın prognozu arasında anlamlı bir korelasyon tespit edildiği bildirilmiş, bu görüş prostat,

mide, akciğer kanserleri ve lösemide bu TF'nin tümör baskılayıcı etki gösterdiğine ilişkin yapılan araştırmalar öne sürülerek desteklenmeye çalışılmıştır.

Ekzon 7 varyantının bulunduğu pozisyona bağlanabilen son TF ise SETDB1 (*SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1*) olarak tespit edilmiştir. Zhang ve ark. (2014), miR-7 ile onkogen olarak kabul edildiği bildirilen SETDB1 transkripsiyon faktörünü inhibe ederek, epitelyal mezenkimal transisyonu (EMT) kısmen engellemiş, meme kanseri kök hücrelerinin hareketlerini kısıtlamıştır. SETDB1, EMT'nin baskılanması, kanser kök hücresi oluşumu, kanser hücrelerinin hareketliliği, invazyon, metastazis ve bazı kanser ilaçlarına karşı hassasiyet ile ilişkilidir. Du ve ark. (2018), meme tümöründe SETDB1 ifadesinde artış gözlenmesine karşın, EMT sırasında meme tümörü hücre kültürlerinde epitelyal karakterin azalarak invazyonun artması için SETDB1 ifadesinde düşüş meydana geldiğini ayrıca SETDB1 ifadesindeki düşüşün kanser invazyonu ve hücre göçünü kolaylaştırabileceğini ve meme tümörü hastalarında daha düşük hayatta kalma olasılığı ile ilişkilendirebileceğini bildirmiştir. Ayrıca ifade değişikliklerinin bazı terapötik ajanlara karşı duyarlılığı etkilediği ifade edilmiştir. Buna karşın Yang ve ark. (2019), SETDB1 ifadesi düşüşünde hücre proliferasyonunda farklı hücre hatlarında farklı sonuçlarla karşılaşmıştır. SETDB1 eksikliğinde hücre göçü ve invazyonunun baskılandığı, *in vivo* olarak akciğer metastazisini azalttığını bildirmiş; aşırı ifade artışının ise MCF7 hücre hattında SNAIL transkripsiyon faktörü aracılığıyla EMT'yi uyardığını göstermişlerdir.

4.2.3. *PALB2* Geni Ekzon 13 Sinonim Varyantı

Sinonim mutasyonlar amino asit dizisinde herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır, ancak mRNA'nın ikincil yapısında ve stabilitesinde değişikliğe, mRNA'nın diğer RNA'lar ve proteinler gibi spesifik ligandlarla etkileşiminde değişikliklere, farklı hücresel kullanılabilirliğe sahip tRNA'lar tarafından okunan kodonların değiştirilerek translasyon kinetiğinin ve protein katlanmasının etkilenmesine (Fernández-Calero ve ark., 2016), *splice* doğruluğu ve etkinliğine

(Cartegni ve ark., 2002; Fernández-Calero ve ark., 2016 ve Pagani ve ark., 2005), kodon uygunluğuna bağlı olarak translasyon hızında değişikliğe (Fernández-Calero ve ark., 2016 ve Li ve ark., 2021) neden olabilmektedir. İnsanlarda sinonim mutasyonlara bağlı olarak karaciğer kanseri gelişimi (Li ve ark., 2021), çoklu ilaç direnci gelişimi (Kimchi-Sarfaty ve ark., 2007), kistik fibrozis gelişimi (Pagani ve ark., 2005), kronik obstrüktif pulmoner hastalık gibi patolojik durumlar (Rauscher ve Ignatova, 2018), sığırlarda ise kantitatif özelliklerin etkilendiğine dair bilgiler (Nayyef, 2020) mevcuttur. Tez çalışması kapsamında R1354R sinonim varyantı tespit edilmiştir. *ConSurf* sunucusu (Ashkenazy ve ark., 2016) verilerine göre bu varyant yüksek oranda korunmuş bir bölgede değildir. Korunmuşluk derecesi 2 olarak tespit edilen arjinin rezidüsü, insan PALB2 proteininde histidin rezidüsü (1184'üncü amino asit) olarak görülmektedir (The Uniprot Consortium, 2021g). Zararlı sinonim mutasyonların listelendiği *dbDSM v2.0* (Wen ve ark., 2016) veri tabanında yalnızca insanlarda tespit edilen zararlı sinonim mutasyonlar listelenmektedir. İnsan *PALB2* geninde bu veri tabanında yalnızca dört adet zararlı sinonim mutasyon bulunmuş, bu mutasyonların amino asit pozisyonları incelendiğinde R1354R varyantının insanda karşılığı olan 1184'üncü amino asit pozisyonunda zararlı bir sinonim varyant bildirilmediği görülmüştür.

Ekzon 13 bölgesi varyantı için yapılan sorgulama sonucunda *EX-SKIP* (Raponi ve ark., 2011) aracı mutant dizide ekzon atlanma ihtimalinin daha yüksek olduğu sonucunu vermiştir. *Human Splicing Finder* (Desmet ve ark., 2009) aracında ise tüm olası varyantlar için *splice enhancer* ve *silencer* motif oranlarında değişiklik tespit edilmiş, c.3552C>G varyantında ise bunun yanı sıra kriptik akseptör bölge aktivasyonu bildirilmiştir. Ekzon 13 bölgesinde köpek transkriptinde de sitoizinden timin nükleotidine substitüsyon gerçekleşen varyantın (insanda c.3552C>T) yalnızca yardımcı motiflerinde oransal değişiklik bildirilmiştir.

Ekzon 13'ün protein kodlanmasına dahil olan dizisinde tespit edilen c.4062C>T varyantının bulunduğu pozisyona (R1354R) tek başına bağlanabilen herhangi bir TF tespit edilmemiştir. Ancak yine ekzon 13'te bulunan ve 3'UTR bölgesinde yer alan

c.4071T>C varyantı pozisyonuna bağlanabilen ve her iki varyantın pozisyonlarını kapsayan bölgeye bağlanabilen TF'ler tespit edilmiştir.

Ekzon 13'teki her iki varyantın bulunduğu bölgede yabancı diziye bağlanabilen dört farklı transkripsiyon faktörü tespit edilmiştir. EP300, ESR1, KDM1A ve TCF12 TF'leri ile meme tümörü arasındaki ilişkin bilgiler sunulmuştur.

EP300 (*E1A binding protein P300*) hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında önemli, histon asetiltransferaz görevi üstlenen tümör baskılayıcı bir proteindir ve DNA bağlama işlevi bulunan bazı proteinler için transkripsiyonel koaktivatör görevi görmektedir. Ayrıca hücre döngüsü ve p53'ün asetilasyonunda da görev aldığı bilinmektedir (Wirtenberger ve ark., 2006). Wang ve ark. (2013), HR mekanizmasında kritik öneme sahip olan BRCA1 ifadesinin düzenlenmesinde, NRF2 transkripsiyon faktörünün CBP ve EP300 ile etkileşime girerek aktif transkripsiyon kompleksi oluşturduğunu bildirmiştir. MCF7 meme tümörü hücre hattında yapılan çalışmada, östrojen uyarımıyla baskılanan genler, aktive edilen genler ve östrojen tarafından düzenlenmeyen genler karşılaştırılmıştır. Baskılanan genlerin östrojen uyarımı sonrasındaki erken dönemde ER ile geçici olarak bağlandığı tespit edilmiş, ayrıca östrojen uyarımı sonrasında EP300'ün ER olmayan *enhancer*lerden ER *enhancer*lara kantitatif olarak yeniden dağılım gösterdiği bildirilmiştir (Guertin ve ark., 2014). MCF7 hücre hattında yapılan bir diğer çalışmada, EP300'ün MRTF-A ile birlikte hücre göçünde görev alarak metastazisi etkileyen genlerin ifadesini artırdığı bildirilmiştir (He ve ark., 2015).

ESR1 (*Estrogen receptor 1*) ER α olarak da bilinmektedir. Meme tümörü hücrelerinde steroid hormonlar büyüme, proliferasyon ve metastazisi etkileyebilmektedir (Bettuzzi ve ark., 1992 ve Hansen ve Fuqua, 1999). ESR1, ligand ile aktive edilen ve hormon yanıt elementi olarak adlandırılan DNA *enhancer*larına bağlanan, *trans*-aktive edici transkripsiyon faktörleri arasında yer almaktadır (Bettuzzi ve ark., 1992). Östrojenler proliferatif etkilerini hücre içi bir reseptör olan ER aracılığıyla gerçekleştirirler. Östrojenler hücre zarından geçer ve ER'yi bağlar ve bu sayede ER'yi DNA'yı bağlayan ve çeşitli genlerin ifadesini düzenleyen aktif bir

transkripsiyon faktörüne dönüştürür (Hansen ve Fuqua, 1999). ESR1'in aktivitesi için östrojen ile aktive edilmesinin yanı sıra, hedef genlerine ait östrojen yanıt elementinin kromatinde erişilebilir konumda olması gerekmektedir; bu nedenle epigenetik damgalama, RECQ1 (Lu ve ark., 2021) ile FOXA1 (Arruabarrena-Aristorena ve ark., 2020) gibi öncü faktörler ve histon modifikasyonları gibi bir çok faktör TF işlevinde aktif olarak görev yapmaktadır (Magnani ve Lupien, 2014). İnsan genomunda 71 119 östrojen yanıt elementi bulunduğu tespit etmiş, bu yanıt elementlerinin yaklaşık %1'inin insan ve fareler arasında korunmuş olduğunu ve insan genomunda 230'dan fazla östrojen tarafından uyarılabilme potansiyeline sahip gen bulunduğunu bildirmişlerdir (Bourdeau ve ark., 2004). Bu durum ESR1 transkripsiyon faktörünün birçok gen ifadesinin düzenlenmesinde aktif olarak görev yapabileceğini ve çok sayıda gen ile etkileşime geçebileceğini göstermektedir. Klinik veriler meme tümörü vakalarında ER kaybının agresif karakter (DeGraffenried ve ark., 2002), endokrin direnç, nüks ve kötü prognoza neden olduğu bilinmektedir (Stossi ve ark., 2012). Bailey ve ark. (2016), ER+ meme tümörlerinin %7'sinde ESR1 ifadesini düzenleyen ve birçok kanser risk lokusundaki regülatör elementlerde meydana gelen somatik mutasyonların ESR1 ifadesini etkilediğini bildirmiş ve bu düzenleyici elementlerin tek bir gen üzerindeki etkisinin birlikte ele alınması gerektiği üzerinde durmuştur. ESR1 mutasyonlarının ER+ meme tümörlerinde endokrin terapilerine direnç geliştirebildiği bildirilmiştir (Freitag ve ark., 2021). HR mekanizmasında aktif olarak bulunan BRCA1 proteininde mutasyon tespit edilen çoğu meme tümörünün ER- olduğu bilinmektedir, Hosey ve ark. (2007), tarafından bu durumun altında yatan neden araştırılmıştır. BRCA1 yokluğu veya fonksiyonel BRCA1 proteini bulunmaması halinde ESR1 mRNA'sının ifadesinde düşüş meydana geldiği tespit edilmiş, ESR1 ifadesi için Oct-1 ile BRCA1'in etkileşime geçerek ESR1'in promotor bölgesine bağlanması gerektiği bildirilmiştir.

KDM1A (*Lysine demethylase 1A*) LSD1 olarak da bilinen, histon demetilaz aktivitesine sahip bir transkripsiyon faktörüdür. Gen ifadesinin düzenlenmesinde transkripsiyonu uyarabilmekte veya baskılayabilmektedir (Perillo ve ark., 2020). Hu ve ark. (2019), luminal meme tümöründe KDM1A'nın invazyon, hücre göçü ve metastazisi baskıladığını ve tümör baskılayıcı olarak görev yaptığını göstermişlerdir.

Bennesch ve ark. (2016), KDM1A'nın ESR1'in östrojen ve cAMP tarafından aktive edilebilmesi için CoREST baskılayıcı kompleksini devreye soktuğunu bildirmişlerdir. Zheng ve ark. (2018) ise meme tümörü hücrelerinde SIX3/LSD1/NuRD kompleksi üzerinden karsinogenez ve metastazisin baskılandığını bildirmiştir. Kanser hücrelerinin çekirdeğindeki LSD1'in epigenetik inhibitörler aracılığıyla yeniden programlanması ile kombine edilmiş bir immunoterapinin nüks etme riski bulunan ve metastatik özellik gösteren vakalarda kullanılmasının gerekliliği Tu ve ark. (2020), tarafından farelerde gerçekleştirilen deneysel çalışma sonuçları göz önünde bulundurularak önerilmiştir.

TCF12 (*Transcription Factor 12*) ekzon 13'teki her iki yabancı tip diziye ortak olarak bağlanabildiği tespit edilmiş son TF'dür. Meme tümörü alanında yapılmış çalışmalarda TCF12 ile ilişkili fazla veri bulunmamaktadır. Tang ve ark. (2016), kanser ilişkili fibroblastların aktivasyonunun hücre dışında oluşturdukları matriks proteinleri aracılığıyla kanser hücrelerinde invazyonu tetiklediğini bildirmişlerdir. Normal meme dokusuna ait stromaya nazaran invaziv meme tümörü dokusuna ait stromada TCF12 ifadesinde artış görüldüğü bildirilmiş, ER- meme tümörü dokularında bu ifade artışının ER+ vakalara kıyasla daha yüksek olduğu ve kötü prognozla ilişkilendirildiği ifade edilmiştir.

Ekzon 13 sinonim varyantının nükleotit pozisyonunda meydana gelen potansiyel insan varyantlarının her ne kadar bölge korunmuş olmasa da ailesel meme kanseri, kalıtsal kanser predispozisyonu sendromu ve akciğer tümörü ile ilişkili olduğuna bulgular bölümünde değinilmiştir.

4.2.4. PALB2 Geni 3' UTR Varyantı

Transkriptte bulunan, ancak protein yapısına katılmayan 3' UTR varyantı (c.4071T>C) *splice* mekanizması ve TF bağlanması yönünden incelenmiştir.

Ekzon 13 bölgesi varyantı için yapılan sorgulama sonucunda *EX-SKIP* (Raponi ve ark., 2011) aracı mutant dizide ekzon atlanma ihtimalinin daha yüksek olduğu sonucunu vermiştir. *Human Splicing Finder* (Desmet ve ark., 2009) aracında ise 3'UTR varyantında yapılan analizlere göre c.*13T>G ve c.*13T>C olası varyantlarında *splice enhancer* ve *silencer* motif oranlarında değişiklik tespit edilmiş, c.*13T>A varyantında ise kriptik akseptör bölge aktivasyonu bildirilmiştir. c.4071T>C varyantının da *splice* mekanizmasını etkileyebileceğini söylemek mümkündür.

TF bağlanma bölgeleri için yapılan analiz sonuçlarına bakıldığında ise 3'UTR bölgesinde yer alan c.4071T>C pozisyonunun yabancı tip dizisine bağlanıp, mutant dizisine bağlanmayan FOXO3, FOXP2 ve TCF7L2 TF'lerine ilişkin bilgiler sunulmuştur.

FOXO3 (*Forkhead Box O3*) transkripsiyon faktörünün ERα regülasyonunda oldukça önemli olduğu ve meme tümörü hücre hattında ERα ifadesinin aktif FOXO3 düzeyi ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Guo ve Sonenshein, 2004). Tümör baskılayıcı fonksiyon gösterdiği ifade edilen FOXO3'ün, ERα ve ERβ proteinleri ile etkileşime girdiği, östrojen bağımlı, ER tarafından düzenlenen transkripsiyonel aktiviteleri inhibe ettiği ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin ifadesini artırarak hücre büyümesini engellediği tespit edilmiştir (Zou ve ark., 2008). İnvaziv meme tümörü hastalarında FOXO3 proteininin lokalizasyonu araştırılmış, hem çekirdek hem de sitoplazmada ifade edilen proteinin çekirdekte baskın olarak ifade edildiği örneklerde iyi prognozla ilişkilendirilmiş biyobelirteçler tespit edilmiş, sağkalım süresi ve uzak metastazis görülmeyen dönemin bu hastalarda daha uzun olduğu bildirilmiştir (Habashy ve ark., 2011). Jiang ve ark. (2013), FOXO3 ifadesini ER+ karakter, histolojik dereceler I ve II, aksiller lenf düğümünde metastazis görülmemesi ve TNM evreleri I ve II ile ilişkilendirmiş, ayrıca yüksek protein ifadesinin sağkalıma olumlu etkisini bildirerek FOXO3'ü prognostik bir belirteç olarak tanımlamıştır. Sisci ve ark. (2013), FOXO3'ün invazyon ve metastazis üzerindeki fonksiyonunu ERα varlığına bağlı olarak gerçekleştirdiğini; ER+ vakalarda invazyon ve metastaziste baskılanma olmasına karşın ER- vakalarda bu karakterlerde artış görüldüğünü

bildirmişlerdir. Song ve ark. (2021) ise FOXO3 ifadesinin miR-29b-2 ve miR-338 mikroRNA'larının ifadesini uyardığını ve bu miRNA'lar üzerinden EMT, hücre göçü, invazyon ve metastazisi baskıladığını bildirmişlerdir.

FOXP2 (*Forkhead box P2*) transkripsiyon faktörünün meme tümörü hücrelerinde susturulmasının kanser kök hücresi yayılımını, tümör başlangıcını ve metastazisi uyarması ile malign tümörlerde ve kötü prognozlu hastalarda düşük seviyede ifade edilmesi (Cuiffo ve ark., 2014) tümör baskılayıcı bir TF olabileceğini göstermektedir. FOXP2 ifadesindeki düşüşün TGF β /SMAD sinyal yolağı üzerinden meme tümöründe invazyon ve hücre göçünü uyarması (Chen ve ark., 2018) bu verileri destekler niteliktedir. Yapılan en güncel çalışmada ise FOXP2'nin meme tümörü hücrelerinde FOXA2 ile etkileşim kurduğunu, E-cadherin ve PHF2 proteinlerini kodlayan genlerin transkripsiyonunu uyararak EMT'yi inhibe edebildiğini göstermiştir (Liu ve ark., 2021).

TCF7L2 (*The transcription factor 7-like 2*) Wnt/ β -catenin yolağında bulunan ve anormal gen ifadesinin onkogenik etkileri olduğu bildirilen bir TF'dir. Normal meme dokusunda osteopontin ifadesini baskıladığı ifade edilen bu TF'nin, meme tümörü vakalarında ifadelerinde normal meme dokusuna nazaran düşüş görüldüğüne ilişkin veriler mevcuttur (El-Tanani ve ark., 2008). Bunun haricinde bu TF'de tespit edilen polimorfizmlerin meme tümörüne predispozisyon yarattığını bildiren çok sayıda çalışma ve bunların değerlendirildiği birçok meta-analiz bulunmaktadır (Burwinkel ve ark., 2006; Chen ve ark., 2013; Connor ve ark., 2012; Goode ve ark., 2009; Lu ve ark., 2015; Min ve ark., 2016; Naidu ve ark., 2012; Wang ve ark., 2015; Wang ve ark., 2021 ve Zhang ve ark., 2018). Lan ve ark. (2011), TCF7L2'nin miR-21 örneği üzerinden miRNA'ların da transkripsiyonlarını uyararak kanser hücrelerinde proliferasyon ve invazyon gibi etkilere neden olabileceklerini göstermişlerdir.

3' UTR bölgesi varyantının insandaki nükleotit pozisyonunda meydana gelen *indel* mutasyonunun kalıtsal kanser predispozisyonu sendromuyla ilişkili olduğu verisine bulgular bölümünde değinilmiştir.

4.3. Fonksiyonel Çalışmalara İlişkin Öneriler

Tez çalışması kapsamında *splice* bölgesi varyantı, yanlış anlam mutasyonu, sinonim mutasyon ve 3' UTR bölgesi varyantı gibi farklı türde varyantlar tespit edilmiş ve biyoinformatik analizlerle etkileri ortaya konulmuştur. Her bir varyantın etkilerini tartışırken bu etkilerin fonksiyonel analizlerle doğrulanması gerektiği üstünde durulmuştur. Bu bölümde *in silico* analizlerde tespit edilen etkilerin doğrulanması için önerilebilecek fonksiyonel testlerden bahsedilmiştir.

Fonksiyonel çalışmalar patojeniteyi destekleyen güçlü bir araç olabilir, ancak tüm fonksiyonel çalışmalar, bir gen veya protein fonksiyonu üzerindeki etkiyi tahmin etmede etkili değildir, fonksiyonel bir testin geçerliliğini değerlendirmek için testin biyolojik ortamı ne kadar yansıttığı önemlidir (Richards ve ark., 2015).

PALB2 proteini, homolog rekombinasyon aracılı DNA tamir mekanizmasında aktif rol oynamaktadır, bu nedenle homoloji aracılı tamir analizi (*Homology-directed repair (HDR) assay*) veya diğer bir isimle çift zincir kırığı tamiri-yeşil floresan proteini raportör analizi (*DR-GFP reporter assay*) ile mutant PALB2 proteininin indüklenmiş çift zincir kırıklarında HR mekanizmasındaki aktivitesi değerlendirilebilir (Boonen ve ark., 2020 ve Guidugli ve ark., 2014). Keza CRISPR-LMNA HR analizi ile homolog rekombinasyon etkinliğinin mutant ve yabancıl tip proteinler için ölçülmesi mümkündür. RAD51 odağı oluşumu analizi (*RAD51 foci formation assay*), *PARPi* hayatta kalma analizi (*PARPi survival assay*) ve *cisplatin* hayatta kalma analizi (*cisplatin survival assay*) gibi yöntemler ile G2/M kontrol noktası analizi (*G2/M checkpoint assay*) yine HR mekanizmasının aktivitesinin etkilenip etkilenmediğine yönelik kullanılabilecek yöntemlerdir (Boonen ve ark., 2020). Benzer şekilde, HR mekanizmasının sekteye uğraması nedeniyle SSA (tek zincir bağlanması) gibi hataya açık DNA tamir mekanizmalarındaki artışın tespit edildiği, insan hücrelerinde homolog rekombinasyon analizi (*Homologous recombination assay in human cells*) gibi dolaylı yöntemler kullanılabilir. Maya rekombinasyon analizi (*Yeast recombination assay*) de yine HR mekanizmasının aktivitesinin ölçüldüğü fonksiyonel testlerden birisidir. Embriyonik kök hücre temelli fonksiyonel analiz (*Embryonic stem*

cell-based functional assay) yapılarak da HR mekanizmasında protein fonksiyonun etkilenip etkilenmediği tespit edilebilir (Guidugli ve ark., 2014).

Proteinin faaliyetini düzgün bir biçimde gerçekleştirebilmesi için hücre döngüsünün çeşitli fazlarında hücrenin belirli lokalizasyonlarında bulunması gereklidir. Bunun kontrolü için ise yeşil floresan işaretli protein kullanılarak çekirdek konum analizi (*Nuclear localization assay*) yapılması önerilebilir (Guidugli ve ark., 2014).

Protein-protein etkileşimlerinin ne derece etkilendiğinin ölçülebilmesi amacıyla birlikte immünopresipitasyon (*Co-immunoprecipitation*), maya veya memeli iki-hibrit analizi (*Yeast two-hybrid assay / Mammalian two-hybrid assay*), *Far-Western* analizi doğrudan; elektroforetik hareketlilik kaydırma analizi (*Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)) dolaylı olarak proteinlerin birbirlerine bağlanmalarındaki değişikliklerin ölçülebilmesi için önerilebilecek fonksiyonel analizlerdir (Boonen ve ark., 2020; Guidugli ve ark., 2014 ve Lieberman ve Hopkins, 2010).

miRNA çalışmalarında kullanılabilen birçok analiz bulunmaktadır. Çalışılan miRNA sayısı, örneklem büyüklüğü, çalışmanın amacı ve laboratuvardaki ekipmana göre kullanılacak yöntem avantaj ve dezavantajları göz önünde bulundurularak belirlenebilir. miRNA saptama ve profil oluşturma için en yaygın kullanılan stratejiler hibridizasyon ve PZR tabanlı tekniklerdir. miRNA ifadelerinin kantitatif olarak ölçülebilmesi için kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (*Stem-loop Real-time RT PCR / qRT-PCR*), tek hücre kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (*Single Cell Stem-looped Real-time PCR*), altın nanopartikül prob (*Gold Nanoparticle Probe Method*) yöntemleri kullanılabilir. Bunun yanı sıra ters transkripsiyon PZR (*RT-PCR*) sonrasında miRNA'ların adaptörlere bağlanarak kullanıldığı mikrodizi (*array*) temelli ifade profillendirme yöntemi de mevcuttur. miRNA-hedef mRNA etkileşimleri için ise miRNA fonksiyonu-raportör ifade analizi (*miRNA Function-Reporter Expression Assay*) (Wang ve Yang, 2010), gen raportör analizi (Yousef ve Allmer, 2014), hedef mRNA'nın immünopresipitasyonu sonrasında miRNA dizisini içeren prob ile *Northern blot* analizi, *in vitro* ve *in vivo* gen susturma ve miRNA aracılı RNA

interferens deney tasarımları ve transgenik model hayvan çalışmaları (Ying, 2006), CRISPR/Cas9 tekniğiyle fonksiyonel miRNA-hedef gen etkileşimlerinin araştırılması (Dalmay, 2017), miRNA ve hedef mRNA'sının bağlı olduğu argonat proteini veya TNRC6'nın birlikte immunopresipitasyonu kapsayan CLIP (*Cross-linking immunoprecipitation*) analizi (Beitzinger ve Meister, 2014 ve Thomson ve ark., 2011), lüsiferaz raportör analizi (*Luciferase reporter assay*), *Western blot* analizi, 5' RLM-RACE analizi (*5' rapid identification of cDNA ends*), PARE analizi (*Parallel analysis of RNA ends*), HITS-CLIP (*High throughput sequencing of cross-linking immunoprecipitation*) analizi, PAR-CLIP (*Photoactivatable-ribonucleoside-enhanced cross-linking and immunoprecipitation*) analizi, biyotin ile etiketlenmiş miRNA'nın immunopresipitasyonunu izleyen mikrodizi analizi (Thomson ve ark., 2011) gibi çeşitli yöntemler bulunmaktadır.

Biyoinformatik analizlerde *PALB2* geninde tespit edilen varyantların bulunduğu bölgeleri kapsayan dizilere bağlanabilen çok sayıda TF tespit edilmiş, bunlardan bazılarının yalnızca yabanıl diziye, bazılarının yalnızca mutant diziye, bir kısmının ise her iki diziye birden bağlanabildiği görülmüştür. Gen ifadesinin bu transkripsiyon faktörlerinden etkilenip etkilenmediğinin tespit edilebilmesi için iki hibrit analizi, EMSA, lüsiferaz analizi, birlikte immunopresipitasyon ve SPR (Yüzey plazmon rezonans) spektroskopisi gibi çeşitli fonksiyonel testler ile doğrulanması gerekmektedir. TF'lerin meme tümörü ile ilişkileri araştırıldığında ise bazılarının onkogen, bazılarının tümör baskılayıcı, bazılarının ise her iki şekilde de etki gösterebildiği görülmüş, bir kısmının ise meme tümörü ile ilişkisi yeterli düzeyde belirlenememiştir. Gelecekte yapılabilecek fonksiyonel testler ile varyantlar ve TF'ler arasındaki ilişkinin açığa çıkarılması durumunda, *PALB2* proteini üzerinden meme tümörü oluşumunu ne şekilde etkilediklerine dair çıkarım yapılabilmesi mümkün olabilir.

Alternatif *splice* mekanizması belirli sayıdaki genlerden sayıca daha fazla protein üretilmesini sağlayarak proteom havuzunu zenginleştiren bir mekanizmadır. Bu sayede, canlıların gelişimsel süreç veya hücre tipine spesifik ve ihtiyaca göre şekillenmiş, farklı fonksiyonları gerçekleştirebileceği geniş bir protein

repertuarına sahip olması mümkün olmaktadır. Alternatif *splice* mekanizması DNA dizisinde bulunan akseptör ve donör bölgeler, dallanma noktaları ve yardımcı regülatör motifler ile bunlara bağlanan transkripsiyon faktörleri, RNA ve proteinlerden oluşan *spliceosome* kompleksi aracılığıyla düzenlenmektedir. *Splice* sinyallerinde meydana gelen nokta mutasyonları bu mekanizmayı etkileyerek ekzon eklenmesi veya ekzon atlanmasına neden olur ve protein yapısını değiştirerek hastalık veya kanser fenotipine neden olabilir (Baralle ve ark., 2009; Cartegni ve ark., 2002 ve Chen ve ark., 2019). Örneğin, meme veya ovaryum tümörlerinde *RAD51C* geninde incelenen 20 varyantın 19'u *splice* mekanizmasını etkilemiş, 18'i ciddi anomalilere neden olmuştur (Sanoguera-Miralles ve ark., 2020). *Splice* sinyallerinde meydana gelen nokta mutasyonlarının hastalık ile ilişkisinin araştırılabilmesi için çeşitli biyoinformatik araçlar geliştirilmiştir (Grodecká ve ark., 2017). *In silico* analizlerde elde edilen sonuçların doğrulanabilmesi için fonksiyonel testlerin yapılması gerekmektedir. Fonksiyonel analizler DNA, RNA, RNA-protein etkileşimleri veya protein düzeyinde yapılabilmektedir. En etkin yöntemin hastadan alınan RNA örneğinin cDNA'ya dönüştürülmesinin ardından DNA dizi analizine tabi tutulması olduğu ifade edilmektedir. Diğer yöntemler ise minigen analizi, qRT-PZR, protein kesme analizi olarak sayılabilmektedir (Anna ve Monika, 2018). Tez çalışması kapsamında elde edilen veriler göz önünde bulundurulduğunda özellikle intron 6 ve ekzon 7 varyantları için fonksiyonel test yapılması önerilmektedir.

İnsanlarda yapılan araştırmalar için *Human Splicing Finder* (Desmet ve ark., 2009) gibi güçlü araçlar bulunmasına karşın, bu araçların bir çoğunun köpek türünde kullanılamıyor olması (Grodecká ve ark., 2017) büyük bir dezavantaj olsa da, en azından insan ve köpek türleri arasında varyantların etkilerine ilişkin çıkarım sağlamaya imkan tanımıştır. Veteriner Hekimlik alanında yapılan ve yapılacak çalışmalarda *splice* mekanizmasına etki edebilecek varyantların araştırılabilmesi için *EX-SKIP* gibi araçlar bulunsa da, yeterli güçte değildir ve bu alanda farklı türler için geliştirilebilecek yeni programlara gereksinim olduğu da gözden kaçmamıştır.

4.4. BRCA2, RAD51 ve PALB2 Etkileşimlerinin Değerlendirilmesi

Yapılan tez çalışması kapsamında hedeflerden birisi de HR mekanizmasında görevli diğer proteinlerde (BRCA2 ve RAD51) aynı örnekleme tespit edilen varyantların KMT açısından birlikte değerlendirilmesiydi. *PALB2* geninde toplam dört adet germ hattı varyantı tespit edilmiştir. *BRCA2* geninin *PALB2* proteininin *WD40* domaini ile etkileşim bölgesini kapsayan bölgesinde ise bir adet intronik germ hattı varyantı saptanmıştır. Tespit edilen bu germ hattı mutasyonları haricinde aynı örnekleme gerçekleştirilen çalışmalarda, *BRCA2* proteininin *RAD51* proteini ile etkileşim bölgelerinde (Ozmen ve ark., 2017a) ve *RAD51* proteininin *BRCA2* ve *PALB2* proteinleri ile etkileşim bölgelerinde (Ozmen ve ark., 2017b) tümör dokularında somatik mutasyonlar bildirilmiştir. Germ hattı mutasyonları ve somatik mutasyonların bir arada değerlendirilmesi her ne kadar tartışmalı olsa da germ hattında tespit edilen varyantların tümör dokularında da görülmesi söz konusudur. Ancak tümör hücrelerinin kontrolsüz bölünmesi ve zaten hipotezin temel aldığı DNA tamir mekanizmalarındaki olası bozukluklar tümör dokularında germ hattına nazaran daha fazla mutasyon tespit edilebilme ihtimalini mümkün kılmaktadır. Özmen ve ark. (2017a; 2017b) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda tespit edilmiş olan, protein kodlamasına katılan ve sinonim olmayan varyantlar tez çalışmasına dahil edilen örneklerle sınırlandırılmış, benign özellik gösteren varyantlar dışlanarak Şekil 4.3'teki çizelge oluşturulmuştur.

Gen	Varyant	Malign													Benign							Sağlık
		Malign mix karsinom			Kompleks adenokarsinom		Karsinosarkom		Solid karsinom		Anaplastik karsinom		Tübüler adenokarsinom		Benign mix tümör			Papiller kistik adenom		Fibroadenom		
		16	17	20	1	21	2	3	5	11	6	12	10	13	26	29	30	22	24	25	31	
PALB2 (Kan)	A1050V																					
RAD51 (Tümör)	N196D																					Veri yok
	H199D																					Veri yok
	T225S																					Veri yok
BRCA2 (Tümör)	K801Q																					
	V919A																					
	Q1072P																					
	S1078W																					
	F1096S																					
	K1179Q																					
	T1425P																					
	L1601I																					

Şekil 4.3. PALB2, RAD51 ve BRCA2 genlerinin etkileşim bölgelerinde tespit edilen sinonim olmayan varyantlar.

Sarı: Heterozigot, Kırmızı: Homozigot, Bej: Homozigot veya heterozigot olabilir (Haplotip verileri ile oluşturulmuştur).

Örnekleme incelendiğinde, 2 ve 17 numaralı bireyler haricinde sağlıklı birey dahil olmak üzere tüm örneklerde en az bir varyant tespit edildiği görülmüştür. 32 kodlu sağlıklı birey RAD51 proteininin BRCA2 ve PALB2 proteinleri ile etkileşim bölgelerinde yapılan çalışmaya (Ozmen ve ark., 2017b) dahil edilmediği için bu bireyde RAD51 mutasyonuna ilişkin bir veri bulunmamaktadır.

Proteinlerin birincil yapısında meydana gelen değişiklikler proteinin ikincil ve üçüncül yapılarını ve dolayısıyla da proteinin üç boyutlu katlanma biçimini, dolayısıyla da fonksiyonunu etkilemektedir (Selzer ve ark., 2019). Geçici protein-protein arası etkileşimlerde, proteinin katlanma yapısının farklı fizyolojik koşullar ve ortamlardaki durumu bile fonksiyonu açısından önemlidir (Nooren ve Thornton, 2003). PALB2 proteini A1050V varyantı bulgular bölümünde ifade edildiği üzere, türler arasında yüksek oranda korunmuş bir pozisyonda bulunmuş, *in silico* analizlerin bazılarında zararlı, bazılarında ise nötral olarak değerlendirilmiştir. Birincil yapıda değişiklik meydana getirmesi nedeniyle henüz fonksiyonel testlerle doğrulanmış olmasa da bu kısımda zararlı bir mutasyon olarak değerlendirilecektir.

BRCA2 ve PALB2 proteinleri arasındaki etkileşim, tez çalışması kapsamında ilgili bölgelerde DNA dizi analizi ile araştırılmış, BRCA2 proteininin PALB2 ile etkileşim bölgesini kapsayan ekzonik dizilerde herhangi bir varyant tespit edilmemiştir. İki protein arasındaki ilişkiyi etkileyerek HR mekanizmasında sorun yaratabilecek tek varyantın PALB2 proteini *WD40* domainindeki A1050V mutasyonu olduğu tespit edilmiştir. PALB2 proteininde tespit edilen mutasyonların homozigot olarak görülmesi insanlarda *fanconi* anemi, heterozigot olarak görülmesi ise meme tümörü ile ilişkilendirilmiştir (Adank ve ark., 2011; Antoniou ve ark., 2014; Nepomuceno ve ark., 2021 ve Xia ve ark., 2007). A1050V varyantının heterozigot olarak görülmesi insanlar ile benzer şekilde köpeklerde de PALB2 proteini mutasyonlarının meme tümörü ile ilişkisi olabileceğini göstermektedir. 13, 21 ve 29 numaralı KMT hastaları için, “BRCA2-PALB2 etkileşimindeki aksaklık nedeniyle HR mekanizmasında bozukluk meydana gelerek tümör oluşumunu tetiklemiştir” şeklinde bir hipotez kurulabilir. Elbette ki bu etkileşimdeki olası aksaklıkların fonksiyonel testlerle doğrulanması gerekecektir. BRCA2-PALB2 ilişkisi germ hattında mutasyon taranarak gerçekleştirildiği için, bu etkileşimdeki aksaklıkların insanlardaki gibi ailesel meme tümörü vakaları veya tümör predispozisyonu ile ilişkili olması muhtemeldir.

PALB2-RAD51 ilişkisi ele alındığında, PALB2’nin RAD51 proteini ile etkileşime geçtiği iki farklı bölge bulunmaktadır (Park ve ark., 2014 ve Prakash ve ark., 2015). Bu bölgeler *coiled-coil* yapısı ve tez çalışması kapsamında DNA dizi analizi yapılan *WD40* domainidir (Buisson ve ark., 2010). Özmen ve ark. (2017b), tarafından RAD51 proteininin PALB2 ile etkileşim bölgesinde tespit edilen N196D, H199D, A209S ve T225S varyantlarından yalnızca üçü (N196D, H199D ve T225S) tez projesinin örnekleme dahil edilen bireylerde görülmektedir. *In silico* analiz sonuçları üç varyantın da zararlı olabileceğini göstermiştir. Uemura ve ark. (2019) ise yaptıkları fonksiyonel çalışmada, A209S ve T225S mutantlarının (Ozmen ve ark., 2017b) PALB2 proteini ile etkileşimini aksattığını memeli iki hibrit analizi ile göstermişlerdir. N196D ve H199D mutasyonları ise fonksiyonel çalışmaya dahil edilmediği için yalnızca *in silico* analiz sonuçlarına ilişkin veriler mevcuttur. Ayrıca *in silico* analizlerde benign olarak görülen A209S mutantının (Ozmen ve ark., 2017b)

fonksiyonel çalışmada protein-protein etkileşimini aksatması (Uemura ve ark., 2019) önemli bir bilgidir, ancak tez çalışmasında bu mutantı taşıyan örnek olmaması nedeniyle RAD51-PALB2 arasındaki etkileşim değerlendirilirken göz önünde bulundurulmayacaktır. Her iki proteindeki varyantlar *in silico* analizlerden elde edilen sonuçlara göre zararlı kabul edilerek örneklem incelendiğinde 1, 12, 13, 20, 21 ve 29 numaralı örnekler için “PALB2-RAD51 etkileşimi zarar görerek HR mekanizmasının sekteye uğramasına ve dolayısıyla meme tümörü gelişimine neden olmaktadır” hipotezi öne sürülebilmektedir. Memeli iki hibrit analizi sonuçlarında protein etkileşimlerinde aksaklık görülmesi 1 numaralı örnek için destekleyici olmakla birlikte (Uemura ve ark., 2019) diğer varyantlar için de benzer fonksiyonel çalışmalar yapılması ve protein-protein etkileşimleri ile sınırlı kalınmayarak HR mekanizması üzerindeki etkilerin araştırılacağı ileri çalışmalar gerekli görünmektedir. RAD51 proteininde tespit edilen varyantlar, germ hattında değil, tümör dokusunda tarandığı için 1, 12 ve 20 numaralı bireylerdeki tümör vakalarında germ hattında aynı RAD51 mutasyonlarının bulunup bulunmadığına dair bir veri bulunmamaktadır. 13, 21 ve 29 numaralı vakalar için ise PALB2-BRCA2 etkileşimi üzerine yapılan yorumlar PALB2-RAD51 etkileşimi üzerine de yapılabilir.

BRCA2 ve RAD51 etkileşimini araştırmak üzere *BRCA2* geninde yapılan çalışmada, K801Q, V919A, S1078W, F1096S ve T1425P varyantlarının *SIFT* algoritmasında protein fonksiyonunu etkilediği, K801Q, V919A, Q1072P, S1078W, F1096S, K1179Q, T1425P varyantlarının *PROVEAN* algoritmasında zararlı olduğu tespit edilmiştir (Ozmen ve ark., 2017a). *PolyPhen* sonuçları ise *HumDiv* algoritması için K801Q, Q1072P, S1078V, K1179Q, T1425P ve L1601I varyantları “zararlı olma ihtimali oldukça yüksek”, F1096S varyantı ise “zararlı olabilir” şeklinde değerlendirilmiştir. *HumVar* sonuçlarına bakıldığında ise S1078W, K1179Q, T1425P ve L1601I varyantları “zararlı olma ihtimali oldukça yüksek”, Q1072P ise “zararlı olabilir” şeklinde değerlendirilmiştir. S1078W varyantının etkileri MutPred aracı haricindeki tüm *in silico* araçlarda zararlı olarak tespit edilmiştir, T1425P varyantı ise tüm araçlara göre zararlı tespit edilmiştir, ayrıca bu varyant RAD51 ile sıkı bir etkileşim sağlayan ilk dört BRC tekrarlarından BRC3 tekrarında bulunmaktadır ve bu nedenle oldukça önemlidir. İnsanlardaki T1430P mutasyonu ile benzer etkiler

gösterdiği tespit edilen (Yoshikawa ve ark., 2012) T1425P varyantının RAD51 ile etkileşimi zayıflatığı memeli iki hibrit analizi ile belirlenmiştir (Ochiai ve ark., 2015). 3, 6, 10, 11 ve 26 numaralı örneklerle ait tümör dokularında bu varyant tespit edilmiştir (Ozmen ve ark., 2017a). RAD51 proteinindeki T225S varyantı da dahil edildiğinde 1, 3, 6, 10, 11 ve 26 numaralı örneklerde HR mekanizmasında meydana gelebilecek aksaklıkların tümör gelişimine neden olabileceği hipotezinin daha güçlü bir şekilde desteklendiği görülmüştür (Ochiai ve ark., 2015; Ozmen ve ark., 2017a ve Uemura ve ark., 2019). HR mekanizmasının bu bireylerde gerçekten önemli ölçüde etkilenip etkilenmediğinin anlaşılabilmesi için fonksiyonel testlerin gerektiği ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. 2, 17 ve 29 numaralı bireyler için BRCA2-RAD51 etkileşimine zarar verebilecek hiçbir mutasyon tespit edilmemiştir, diğer bireylerin ise 1, 3, 6, 10, 11 ve 26 numaralı örnekler kadar olmasa da HR mekanizmasını etkileme potansiyelleri mevcuttur. Bu örneklerle ilişkin veriler Çizelge 4.9'daki gibi görünmektedir.

Çizelge 4.9. Fonksiyonel analizlerle desteklenen zararlı varyantların bulunduğu bireylere ilişkin veriler.

Vaka Kodu	İrk	Yaş	Tümör Tipi	Akciğer Metastaz Durumu
1	<i>Golden retriever</i>	13	Kompleks adenokarsinoma	-
3	<i>Rottweiler</i>	12	Karsinosarkoma	+
6	<i>Pinscher</i>	15	Anaplastik karsinoma	-
10	<i>Tibetan terrier</i>	13	Tubuler adenokarsinoma	-
11	<i>Rottweiler</i>	13	Solid karsinoma	-
26	<i>Tibetan terrier</i>	16	Benign miks tümör	-

RAD51 ve BRCA2 için yapılan çalışmalar meme tümörü dokularında gerçekleştirildiği için germ hattında bu mutasyonların bulunup bulunmadığı bilinmemektedir. Çizelge 4.10'da proteinler arasındaki etkileşimler ve bireylerde bu

etkileşimleri ve HR mekanizmasını etkileme potansiyeli bulunan varyant sayıları verilmeye çalışılmıştır.

Çizelge 4.10. Örneklemdaki bireyler ve bu bireylerde protein-protein etkileşimlerini etkileyebilecek varyant sayıları.
Çizelgedeki her bir yıldız (*), o mekanizmada potansiyel bir soruna yol açabilecek varyant sayısını vermektedir. *= 1 varyant, **= 2 varyant, ***= 3 varyant, ****= 4 varyantı ifade etmektedir. HR sütunu haricindeki tüm sütunlar birbirinden bağımsızdır; HR sütunu ise bir bireyde incelenen tüm genlerdeki toplam varyantların sayısını göstermektedir.

Örnek	BRCA2-PALB2	RAD51-PALB2	BRCA2-RAD51	HR
1		*	**	**
2				
3			**	**
5			*	*
6			**	**
10			***	***
11			****	****
12		*	**	**
13	*	*	*	**
16			**	**
17				
20		**	****	****
21	*	*	*	**
22			*	*
24			*	*
25			**	**
26			**	**
29	*	*		*
30			**	**
31			**	**

İnsan çalışmaları dikkate alındığında meme tümörü vakalarında bir mekanizma ile ilişkili birden fazla gende veya bir gende birden fazla pozisyonda mutasyon tespit

edilmesi söz konusu olabilmektedir (Cock-Rada ve ark., 2018 ve Urbina-Jara ve ark., 2019).

Tez çalışması kapsamında PALB2-BRCA2 etkileşiminin incelenebilmesi için BRCA2 proteininin PALB2 ile etkileşime geçtiği amino asit dizilerini kodlayan bölgeleri de DNA dizi analizine tabi tutulmuş ancak protein kodlayan bölgelerinde herhangi bir varyant tespit edilmemiştir. İntron 2 bölgesinde ise c.68-104C>T varyantı tespit edilmiştir. *Splice* mekanizmasının araştırılmasına yönelik bulgulara bakıldığında yalnızca c.68-105T>G varyantının kriptik akseptör bölge aktivasyonu ve *splice* mekanizmasında potansiyel değişikliğe neden olabileceği bildirilmiştir (Desmet ve ark., 2009). Bu varyantın bulunduğu pozisyonda yabancı tip diziye bağlanabilen TBX2 ve TRIM28, yalnızca mutant diziye bağlanabilen ise CUX1, NR1H2 ve NR1H3 transkripsiyon faktörlerinin tespit edildiği (Hu ve ark., 2019) bulgular bölümünde ifade edilmiştir. PALB2 varyantları değerlendirilirken de ifade edildiği gibi, *splice* mekanizmasında meydana gelebilecek değişiklikler ve TF bağlanma bölgelerinde meydana gelen değişikliklerin HR mekanizmasına olan etkilerinin fonksiyonel testler ile araştırılması BRCA2 varyantı için de gereklidir. Bu tür değişikliklerin hastalık ve kanser fenotiplerine neden olabilmesi ihtimali mevcuttur.

Örneklemdaki 2 ve 17 numaralı bireylerde herhangi bir mutasyon tespit edilmemiştir. HR mekanizmasında görevli proteinler yalnızca BRCA2, PALB2 ve RAD51 ile sınırlı değildir, BRCA1 başta olmak üzere mekanizmada görevli birçok protein mevcuttur (Wright ve ark., 2018). Bunun yanı sıra, HR mekanizması haricindeki genlerin onkogenik veya tümör baskılayıcı etkilerinin mutasyonlar nedeniyle değişmesi veya protein fonksiyonları etkilenmeksizin epigenetik mekanizmalar nedeniyle gen ifadelerinde anormallikler görülmesi de tümör gelişiminde etkili olabilmektedir (Klopfleisch ve ark., 2011).

4.5. Varyantların İnsan ve Köpek Türleri Arasında Karşılaştırılması

Kanser gelişimi insan ve köpeklerde spontan olarak görülmektedir (Dobson ve ark., 2002; Gamlem ve ark., 2008; Hamilton, 1974; Merlo ve ark., 2008; Moulton ve ark., 1970; Sleecx ve ark., 2011; Sorenmo, 2003 ve Vascellari ve ark., 2009). KMT vakaları insan meme tümörleri ile klinik, histopatolojik, biyokimyasal ve sitolojik bulgular ile oluşum mekanizmaları bakımından yüksek oranda benzerlik göstermektedir (Abdelmegeed ve Mohammed, 2018; Antuofermo ve ark., 2007; Cassali ve ark., 2007; Kumaraguruparan ve ark., 2006a; Kumaraguruparan ve ark., 2006b; Rivera ve ark., 2009 ve Rivera ve von Euler, 2011). Ayrıca, yaş (Egenvall ve ark., 2005), en yaygın görülen malign tümörlerin basit karsinomalar olması (Sorenmo ve ark., 2009), anjiyogenez ve kan damarlarının morfolojilerinin benzerlik göstermesi (Sleecx ve ark., 2014), patolojik ve immunofenotipik benzerlikler (Ferreira ve ark., 2010), mammografik anomalilerin benzerliği (Mohammed ve ark., 2011), kanser ilişkili stromanın benzerlik göstermesi (Ettlin ve ark., 2017), prognostik belirteçler (Nguyen ve ark., 2018), *BRC1*, *BRC2*, *RAD51*, *EGFR*, *Ki-67*, *HER2/neu*, *p53*, *p63* genlerinin her iki türde de tümör gelişiminde kritik rol oynaması ve uzun süre östrojene maruziyetin tümör görülme riskini artırması (Abdelmegeed ve Mohammed, 2018), insan ve köpeklerde *BRC1* ve *BRC2* genlerinde korunmuş bölgelerde ortak mutasyonlar bulunması (Goebel ve Merner, 2017), PI3K/AKT, KRAS, PTEN, WNT-beta katenin ve MAPK gibi kanser ile ilişkili yolların her iki türde de benzer şekilde etkilenecekleri (Uva ve ark., 2009) gibi faktörler tümör gelişiminde insan ve köpek türleri arasında yüksek oranda benzerlik bulunduğunu göstermektedir. Bu nedenle meme tümörü çalışmalarında köpek türü model organizma olarak kullanılabilme potansiyelindedir (Grosse ve ark., 2014 ve Rasotto ve ark., 2014).

Tez çalışması kapsamında *PALB2* geni *WD40* domaininde tespit edilen varyantların insan genomundaki pozisyonları ve bu pozisyondaki insan varyantları ile meme tümörü gelişimine etkileri incelendiğinde, intron 6 varyantının insandaki pozisyonunda DNA dizisinde farklı bir nükleotit bulunduğu (Ensembl, 2021b), ancak insanda bu pozisyonda tespit edilmiş kalıtsal kanser yatkınlık sendromu ile ilişkili bir TNP varlığı dikkat çekmektedir (Ensembl, 2021o). Ayrıca bu varyant VEP aracında

hem köpek hem de insan türünde *splice* bölgesi varyantı olarak görülmektedir. Bunun yanı sıra, HSF (Desmet ve ark., 2009) aracında insanlardaki pozisyonunda oluşabilecek tüm varyantların kriptik akseptör bölge aktivasyonu nedeniyle *splice* mekanizmasında potansiyel değişikliğe neden olacağı tespit edilmiştir.

Ekzon 7 bölgesi varyantında ise DNA dizisindeki nükleotitin iki türde aynı olduğu (Ensembl, 2021b) ve bu bölgede her ne kadar aynı amino asit değişikliği (köpekte A1050V/ insanda A880V) bildirilmemişse de; insanlarda bildirilen diğer varyantların ailesel meme tümörü (A880A ve A880D), kalıtsal kanser yatkınlık sendromu (A880A) ve endometriyal tümör (A880D) gibi fenotipler ile ilişkili olduğu görülmüştür (Ensembl, 2021d; Ensembl, 2021r; Ensembl, 2021s). Kaldı ki insanlarda meydana gelen meme tümörü vakalarında A880V varyantının henüz bildirilmemiş olması ilerleyen dönemlerde bildirilmeyeceği anlamına gelmemektedir. Ayrıca ekzon 7 bölgesindeki gerek nükleotit gerek amino asit dizisinin korunmuş olması, bu bölgede meydana gelen bir mutasyonun kanser riski oluşturabileceği düşüncesini de güçlendirmektedir. Bu varyant için (A1050V/A880V) *SIFT* (Kumar ve ark., 2009) ve *PolyPhen* (Choi ve ark., 2012) skorları iki türde de mutasyonun zararlı olabileceğine ilişkin sonuç vermiş, ayrıca *MutPred2* (Pejaver ve ark., 2020) aracında iki türde de varyantın etkisi eşik değeri geçemeyerek hesaplanamamıştır. Ekzon 7 varyantı *splice* mekanizması açısından incelendiğinde, insandaki yabanıl tip nükleotitin köpek türüyle aynı olmasının yanı sıra, köpekte meydana gelen mutasyon insan türünde gerçekleştiğinde meydana gelen kriptik donör bölge aktivasyonu ve *splice* sinyallerindeki değişikliğin insanda alternatif *splice*'a neden olabileceği verisi (Desmet ve ark., 2009) diğer varyant bölgelerine kıyasla, bu bölgedeki substitüsyonun daha önemli olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra, tespit edilen varyantlar arasında miRNA bağlanma bölgesi içerisinde bulunan tek pozisyonun ekzon 7 varyantı olduğu görülmüş (Sticht ve ark., 2018), köpekler ve insanlar arasında cfa-miR-222/hsa-miR-222-3p'nin nükleotit dizilerinin %100 örtüşmesi (Kozomara ve ark., 2019) ve her iki türde de bu miRNA dizisinin (her ne kadar bağlanma bölgeleri farklı olsa da) PALB2 transkriptini hedeflediği tespit edilmiştir. İnsan çalışmalarında bu miRNA'nın onkomiR (Rinnerthaler ve ark., 2016) olarak görev yapması dikkat çekmiştir. PALB2 proteininin DNA tamirindeki görevi göz önünde

bulundurulduğunda, insan meme tümörlerinde ifade düzeyi yüksek olduğu bilinen bu miRNA'nın, her iki türde PALB2 ifadesini baskılayarak tümör gelişimini farklı bir mekanizma üzerinden de tetiklemesi mümkün görünmektedir.

Ekzon 13 için ise ekzon 7 bölgesinde ifade edilen durum söz konusu değildir. DNA dizisindeki nükleotit türleri arasında korunmuş görünmesine karşın, amino asit dizileri iki tür arasında farklılık göstermektedir ve bu pozisyon için iki tür arasında karşılaştırma yapılabilecek kuvvetli bir argüman bulunmamaktadır. Ancak insanda bu pozisyonun karşılığı olan 1184'üncü rezidüye denk gelen TNP kaydının (Ensembl, 2021q) neden olduğu yanlış anlam mutasyonunun ailesel meme tümörü ve kalıtsal kanser predispozisyonu sendromuna neden olmasına karşın, sinonim mutasyon bulunduğuna ilişkin herhangi bir kayıt söz konusu değildir.

3' UTR varyantında ise bölgedeki nükleotitin DNA dizilerinde aynı olduğu tespit edilmiştir (Ensembl, 2021b). Bu varyant miRNA bağlanması açısından değerlendirilmiş, ancak köpek ve insan türleri arasında bu bölgeye bağlanan korunmuş bir miRNA tespit edilmemiştir (Agarwal ve ark., 2015; Chen ve Wang, 2020 ve Sticht ve ark., 2018). *Splice* mekanizması için ise bölgedeki substitüsyonun insandaki karşılığının yalnızca yardımcı motiflerin oranlarında değişikliğe neden olduğu görülmüştür (Desmet ve ark., 2009). İnsandaki nükleotit pozisyonunu kapsayan bölgede tespit edilen bir *indel* mutasyonunun, kalıtsal kanser predispozisyonu sendromu ile ilişkilendirildiğine bulgular bölümünde değinilmiştir (Ensembl, 2021p).

Bu veriler ışığında, PALB2 proteini açısından insan ile en çok benzerlik gösteren varyantın ekzon 7'deki A1050V varyantı olduğu söylenebilir, diğer varyantlar için ise bu derecede bir benzerlik görülmemektedir. Tez kapsamında tespit edilen KMT vakalarındaki *PALB2* geni *WD40* domaini varyantlarının *PALB2* geni ile ilişkili insan meme tümörü araştırmalarında model olarak kullanılabilme potansiyeli olduğunu fonksiyonel testler ve hücre kültüründe yapılacak çalışmalar olmaksızın söylemek mümkün değildir, ancak ekzon 7 varyantının bu tür çalışmalar için potansiyelinin daha yüksek olduğu *in silico* analizler ve türler arasında yapılan karşılaştırmalar göz önünde bulundurulduğunda söylenebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Meme tümörü vakaları hem kadınlarda hem de dişi köpeklerde en sık karşılaşılan tümör vakalarıdır. *PALB2* geni mutasyonları insanlarda meme tümörü vakalarında ayrıntılı olarak araştırılmış ve tümör oluşumuna etkisi ortaya çıkartılmıştır. Ancak gerek veteriner hekimlik alanında köpeklerin sağlığı açısından, gerekse meme tümörü vakalarında model organizma olarak kullanılabilmesi açısından *PALB2* mutasyonları ve KMT vakalarının arasındaki ilişkinin daha önce araştırılmadığı görülmüştür. Tez çalışması kapsamında *PALB2* geni *WD40* domainindeki germ hattı mutasyonlarının meme tümörü gelişimi ve malignitesi üstünde doğrudan veya dolaylı olarak etkili olabileceği hipotezi, DNA dizi analizi ile araştırılmıştır. Çalışmanın hedeflerinden bir diğeri de köpek ve insan türleri arasında meme tümörü açısından benzerlik ve farklılıkların *PALB2* germ hattı mutasyonları kapsamında değerlendirilmesi ve köpeklerin model organizma olarak kullanılabilme potansiyeli ve KMT vakalarında insanlarda kullanılan tedavi yöntemlerinin uygulanabilip uygulanamayacağının tartışılmasıdır. Araştırma için 20 KMT hastası ve bir sağlıklı örnek kullanılmış; örneklem grubundaki hastaların dağılımı 13 malign, yedi benign tümör örneği şeklinde belirlenmiş, histopatoloji çalışmalarında yaygın görülen tümör tipleri seçilerek histopatolojik tipler sınırlandırılmıştır. Örneklem grubundaki birey sayısının kısıtlı olmasının yanı sıra; tümörlerin histopatolojik derecelerinin, örneklemdeki ırkların, kısırlaştırma durumunun, akciğer metastazisinin ve örneklerin yaşlarının dağılımı düzenli değildir. Örneklerin ebeveyn hatlarında KMT vakası görülüp görülmediğine dair veri olmadığından vakaların sporadik mi yoksa kalıtsal mı seyrettiği bilinmemektedir. Ayrıca *PALB2* proteininin diğer proteinler ile etkileşime geçen ikinci önemli bölgesi olan *coiled-coil* yapısı çalışmaya dahil edilememiştir. Çalışmadaki eksiklikler biraz önce belirtildiği gibi olmakla birlikte, aynı örneklem grubunda *PALB2* proteininin tümör baskılayıcı komplekste etkileşime geçtiği *RAD51* ve *BRCA2* proteinlerinin etkileşim bölgelerinde yapılan önceki projenin verileri *PALB2* varyantları ile birlikte değerlendirilerek HR mekanizmasının *BRCA2*, *RAD51*

ve PALB2 tümör baskılayıcı kompleksi mutasyonlarından nasıl etkilendiğini görebilmek açısından çalışma sonuçlarını kuvvetlendirmektedir.

DNA dizi analizi sonucunda daha önce rs24292038 kodu ile bildirilmiş olan bir adet *splice* bölgesi varyantı (c.3096+8C>G), biri rs853188656 koduyla daha önce bildirilmiş olan (c.3149C>T, p.A1050V), diğeri ise ilk kez bu çalışmada tespit edilen (c.4062C>T, p.R1354R) iki adet ekzon bölgesi varyantı ve yine ilk kez bu çalışmada tespit edilen bir adet 3' UTR bölgesi varyantı (c.4071T>C) bulunmuştur. Varyant etkileri *in silico* analizler ile protein yapısı ve fonksiyonundaki değişiklikler, ligand bağlanma bölgelerindeki değişiklikler, miRNA ve TF bağlanma bölgelerindeki değişiklikler, *splice* mekanizması üzerindeki olası etkiler ve sessiz mutasyonun etkilerini kapsayacak şekilde farklı açılardan araştırılmıştır. Örneklemdeki altı KMT hastasında heterozigot, sekiz KMT hastasında homozigot olarak bulunan intronik varyantın (c.3096+8C>G) *splice* bölgesi varyantı olduğu ve insandaki ilgili nükleotitte gerçekleşebilecek tüm mutasyonların *splice* mekanizmasını değiştireceği biyoinformatik olarak tespit edilmiştir. Köpek türünde de benzer bir sonucun meydana gelme ihtimali olmasına karşın bu türde mutasyonun *splice* mekanizmasına etkisinin ölçülebildiği kuvvetli bir araç bulunamamıştır. Aynı varyantın bulunduğu bölgenin ne yabanıl tip ne de mutant tip dizi için herhangi bir TF bağlanma bölgesi içermediği biyoinformatik olarak tespit edilmiştir. Örneklemdeki altı bireyde heterozigot olarak bulunan ekzon 13'teki varyantın (c.4062C>T, p.R1354R) türler arasında korunmuş olmadığı tespit edilmiştir. Bölgeye bağlanan herhangi bir miRNA bulunmamıştır. Bölge tek başına değerlendirildiğinde herhangi bir TF'nin bağlanma dizisini içermemektedir. Ancak, 3' UTR bölgesi varyantı ile birlikte seyreden bu varyant yabanıl dizide EP300, ESR1, KDM1A ve TCF12 TF'lerinin bağlanma dizisini içermektedir. Zararlı sinonim mutasyonların bulunduğu veri tabanında bu varyantın insandaki pozisyonuna ilişkin herhangi bir zararlı etki tespit edilmemiştir. *Splice* mekanizması için yapılan analizlerde mutant dizide ekzon atlanma ihtimalinin yabanıl diziden yüksek olduğu ve insandaki nükleotit bölgesinde üç olası substitüsyonun da yardımcı motiflerde değişikliğe neden olduğu, bir substitüsyonun ise kriptik akseptör bölge aktivasyonuna neden olarak *splice* mekanizmasında potansiyel bir değişikliğe neden olacağı biyoinformatik olarak tespit edilmiştir. Köpek türünde de benzer bir etki

görülebilmesi muhtemeldir. 3' UTR varyantının (c.4071T>C) tespit edilen tüm bireylerde Ekzon 13 varyantıyla birlikte görüldüğü göze çarpmıştır. Klonlama yapılarak doğrulanmamış olmasına karşın bu iki varyantın pozisyonları da dikkate alınarak haplotip oluşturabileceği iddia edilebilir. 3' UTR bölgesine bağlanan herhangi bir miRNA tespit edilmemiştir, ancak yabancı dizinin bulunduğu bölge tek başına düşünüldüğünde FOXO3, FOXP2 ve TCF7L2 TF'lerinin bağlanma dizisini; ekzon 13 varyantı ile birlikte ise EP300, ESR1, KDM1A ve TCF12 TF'lerinin bağlanma dizisini içermektedir. *Splice* mekanizmasındaki olası etkilere bakıldığında ise iki olası substitüsyonun insanlarda yardımcı motiflerin oranında değişikliğe neden olacağı, bir substitüsyonun ise kriptik akseptör bölge aktivasyonu nedeniyle *splice* mekanizmasını değiştirebileceği tespit edilmiştir. Köpek türünde de bu tür bir ihtimalin varlığı değerlendirilebilir. DNA dizi analizi sonucunda elde edilen en önemli varyant ekzon 7'deki A1050V varyantı olarak görülmektedir. KMT hastası üç bireyde heterozigot olarak tespit edilmiştir. Türler arasında yüksek oranda korunmuş olduğu tespit edilen bu yanlış anlam mutasyonu bazı biyoinformatik araçlarda protein yapısını ve fonksiyonunu etkilemekte, bazı araçlarda ise nötral kabul edilmektedir. Ligand bağlanma bölgeleri için de benzer bir durumdan bahsedilebilir. Ayrıca bölgeye bağlanabilme potansiyeli olan dört farklı miRNA (cfa-miR-222, cfa-miR-8842, cfa-miR-8821 ve cfa-miR-8846) tespit edilmiş, yabancı tip dizi için altı farklı TF bağlanma dizisi (ELF1, EZH2, RELA, RUNX1, SP1 ve TRIM28), mutant dizi için ise üç farklı TF bağlanma dizisi (AIRE, EGR3, SETDB1) saptanmıştır. *Splice* mekanizmasına bakıldığında mutant dizide yabancı diziye oranla ekzon atlanma ihtimali daha yüksek bulunmuş, varyantın insandaki birebir karşılığında hem yardımcı motif oranlarında değişiklik hem de kriptik donör bölge aktivasyonu olduğu tespit edilmiştir.

HR mekanizması açısından çıkarım yapılabilmesi amacıyla BRCA2 proteininin PALB2 ile etkileşim bölgesinde de mutasyon taranmış, yalnızca intron 2 bölgesinde bir varyant (c.68-104C>T) tespit edilmiştir. Tek bir olası varyantının kriptik akseptör bölge aktivasyonu ve *splice* mekanizmasında potansiyel değişikliğe neden olabileceği bulunmuş, varyantın bulunduğu pozisyonda yabancı tip diziye bağlanabilen TBX2 ve TRIM28; yalnızca mutant diziye bağlanabilen ise CUX1, NR1H2 ve NR1H3 TF bağlanma dizileri tespit edilmiştir.

Varyantların HR mekanizması üstünden tümör gelişimine neden olup olmadığının belirlenebilmesi için biyoinformatik analiz sonuçlarının fonksiyonel testler ile araştırılması gerekmektedir. Bunun için HR mekanizmasının sağlıklı bir şekilde çalışıp çalışmadığının kontrol edilebileceği deneysel çalışmalar veya protein-protein etkileşimlerinin varyantlardan nasıl etkilendiği araştırılabilir. Keza miRNA ve transkripsiyon faktörlerinin yabanıl ve mutant dizilere gerçekten bağlanıp bağlanmadığının tespiti ve alternatif *splice* gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrolü için fonksiyonel testler yapılması gerekli görülmektedir. Varyantların tümör karakterini (benign/malign) etkilemediği görülmüş, ırk, metastazis durumu, tümör histopatolojisi ve kısırlaştırma durumunu ne şekilde etkilediklerine dair bir yorum yapılamamıştır. Tespit edilen varyant pozisyonları insanlarda araştırıldığında ailesel meme tümörü, endometriyal tümör, kalıtsal kanser predispozisyonu sendromu gibi kanserle ilişkili fenotiplerle karşılaşılmıştır ancak iki tür arasındaki benzerliğin *PALB2* dizisi açısından sınırlı olduğu görülmüştür. Bu nedenle deneysel çalışmalar için KMT vakalarının model olarak kullanımına ilişkin eldeki mevcut verilere dayanarak öneride bulunmak mümkün görünmemekte, ileri araştırmalara gereksinim duyulmaktadır. HR mekanizması çerçevesinde bakıldığında ise amino asit değişimine neden olan tüm varyantlar riskli kabul edilerek değerlendirildiğinde yalnızca iki bireyin hiçbir mutasyon barındırmadığı görülmüştür. İleride yapılabilecek benzer çalışmalarda örneklemin sayıca artırılması, ırk, yaş, kısırlaştırma durumu, metastazis durumu, ailesel tümör geçmişi gibi verilerin dengeli bir şekilde ele alınması ve diğer bir fonksiyonel bölge olan *coiled-coil* yapısının ve etkileşime geçtiği *BRCAl* geninin de çalışmalara dahil edilmesi faydalı olacaktır.

ÖZET

Köpek Meme Tümörlü (KMT) Hastalarda *PALB2* Geni *WD40* Domaini Genetik Analizi

DNA tamir mekanizmalarının bozulması, tümör oluşumu için önde gelen genetik faktörlerden biridir. BRCA2, RAD51 ve PALB2 (*Partner and Localizer of BRCA2*) proteinleri arasındaki etkileşimler, DNA çift zincir kırıklarının hatasız tamirini sağlayan homolog rekombinasyon aracılı DNA tamir mekanizmasında (HR) kilit rol oynamaktadır. Tez çalışması kapsamında, köpek PALB2 proteininin BRCA2 ve RAD51 proteinleri ile etkileşime geçtiği bilinen *WD40* domainine ait nükleotit dizilerindeki germ hattı mutasyonları köpek meme tümörü (KMT) hastaları (n=20) ve sağlıklı kontrolde (n=1) Sanger DNA dizileme ile araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, bir intron (c.3096+8C>G), iki ekzon (c.3149C>T/p.A1050V ve c.4062C>T/p.R1354R) ve bir 3' UTR (c.4071T>C) varyantı olmak üzere toplamda dört adet varyant tespit edilmiştir. c.4062C>T/p.R1354R ve c.4071T>C varyantları ilk kez bu çalışmada saptanmıştır. Tespit edilen varyantların etkileri *in silico* analizler ile araştırılmıştır. p.A1050V yanlış anlam mutasyonu etkileri bakımından önemli görülmüş ancak bu mutasyona ilişkin *in silico* analiz sonuçlarında tutarsızlıklar bulunmuştur. Tüm tespit edilen varyantlar için biyoinformatik analizlerin fonksiyonel testlerle doğrulanması gereklidir. Varyantların tümör malignitesine ilişkin herhangi bir etkisi bulunamamıştır. Aynı örneklem grubunun dahil edildiği daha önceki çalışmaların verileri de değerlendirilerek, HR mekanizması ve KMT arasındaki ilişki bütüncül olarak ele alınmıştır. Örneklem grubundaki iki birey haricinde tüm KMT hastası bireylerde BRCA2, RAD51 ve PALB2 etkileşim bölgelerinin en az birinde zararlı olma potansiyeli bulunan bir varyant görülmüştür. İnsanlarda germ hattı *PALB2* mutasyonlarına bağlı gelişen meme tümörü vakaları ile köpeklerde tez çalışması kapsamında tespit edilen varyantlar karşılaştırılarak, yeteri derecede benzerlik saptanmamıştır. Sonuç olarak, köpeklerin *PALB2* mutasyonları açısından model olarak kullanımının uygun olup olmadığının tartışılabilmesi için veriler yetersizdir ve daha geniş bir örneklem ve fonksiyonel testlerle yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Köpek meme tümörü, KMT, Partner and localizer of BRCA2, PALB2, WD40 domaini.

SUMMARY

Genetic Analysis of *PALB2* Gene *WD40* Domain in Canine Mammary Tumour (CMT)

Patients

Disruption of DNA-repair mechanisms is one of the leading genetic factors for tumorigenesis. Interactions of BRCA2, RAD51, and PALB2 (*Partner and Localizer of BRCA2*) proteins have a key role in the DNA-repair mechanism mediated by homologous recombination (HR), which ensures the error-free repair of DNA double-strand breaks. Within the scope of the dissertation project, germline mutations in the nucleotide sequences of the *WD40* domain of the canine *PALB2* gene, which is known to interact with the BRCA2 and RAD51 proteins, were investigated by Sanger sequencing in samples of canine mammary tumour (CMT) (n=20) and a healthy control (n=1). In the results of study, four nucleotide variants were detected, which were an intronic (c.3096+8C>G), two exonic (c.3149C>T/p.A1050V and c.4062C>T/ p.R1354R) and a 3' UTR variant (c.4071T>C). c.4062C>T/p.R1354R and c.4071T>C novel variants were detected for the first time in this study. The effects of detected variants were investigated by *in silico* analysis. The p.A1050V missense mutation is found important in terms of its effects. However, the results of *in silico* analysis of this mutation have inconsistencies. Confirmation of results of bioinformatics analysis with functional studies is essential for all variants. It seems there's no effect of variants on tumour malignancy. Data from previous studies was also used for the same sample group to consider the relationship between HR mechanism and CMT and discussed holistically. At least one potentially pathogenic variant was seen in one of the BRCA2, RAD51, or PALB2 interaction sites in CMT, except for two samples. Breast cancer cases due to germline *PALB2* mutations in humans, and variants detected within the scope of the dissertation study in dogs with CMT, were compared. However, sufficient similarity could not be determined. In conclusion, data are insufficient to discuss whether dogs are suitable as a model for *PALB2* mutations of breast cancer cases, and further studies with a larger sample group and functional studies are needed.

Keywords: Canine mammary tumour, CMT, Partner and localizer of BRCA2, PALB2, WD40 domain.

KAYNAKLAR

- ABADIE J, NGUYEN F, LOUSSOUARN D, PEÑA L, GAMA A, RIEDER N, BELOUSOV A, BEMELMANS I, JAILLARDON L, IBISCH C, CAMPONE M (2018). Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. *Breast Cancer Research and Treatment* Springer US, **167** (2): 459–468. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4542-8>.
- ABASS S, FATIMA W, MAHMOOD S (2016). Homologous DNA repair: Safeguarding genome territories from knives. *Current Science*, **111** (8): 1335–1339. <https://doi.org/10.18520/cs/v111/i8/1335-1339>.
- ABDELMEGEED SM, MOHAMMED S (2018). Canine mammary tumors as a model for human disease (Review). *Oncology Letters*, **15** (6): 8195–8205. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8411>.
- ABDELRAHIM M, SAMUDIO I, SMITH R, BURGHARDT R, SAFE S (2002). Small inhibitory RNA duplexes for Sp1 mRNA block basal and estrogen-induced gene expression and cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, **277** (32): 28815–28822. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203828200>.
- ABRAMOVITCH S, GLASER T, OUCHI T, WERNER H (2003). BRCA1-Sp1 interactions in transcriptional regulation of the IGF-IR gene. *FEBS Letters*, **541** (1–3): 149–154. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00315-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00315-6).
- ADANK MA, VAN MIL SE, GILLE JJP, WAISFISZ Q, MEIJERS-HEIJBOER H (2011). PALB2 analysis in BRCA2-like families. *Breast Cancer Research and Treatment*, **127** (2): 357–362. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1001-1>.
- ADEDOKUN B, ZHENG Y, NDOM P, GAKWAYA A, MAKUMBI T, ZHOU AY, YOSHIMATSU TF, RODRIGUEZ A, MADDURI RK, FOSTER IT, SALLAM A, OLOPADE O, HUO D (2020). Prevalence of Inherited Mutations in Breast Cancer Predisposition Genes among Women in Uganda and Cameroon. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **29** (2): 359–367. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0506>.
- ADZHUBEI IA, SCHMIDT S, PESHKIN L, RAMENSKY VE, GERASIMOVA A, BORK P, KONDRASHOV AS, SUNYAEV SR (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, **7** (4): 248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>.
- AGARWAL V, BELL GW, NAM J-W, BARTEL DP (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, **4**: 1–38. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>.
- AHMED SH, ESPINOZA-SÁNCHEZ NA, EL-DAMEN A, FAHIM SA, BADAWY MA, GREVE B, EL-SHINAWI M, GÖTTE M, IBRAHIM SA (2021). Small extracellular vesicle-encapsulated miR-181b-5p, miR-222-3p and let-7a-5p: Next generation plasma biopsy-based diagnostic biomarkers for inflammatory breast cancer. *PLOS ONE*, **16** (4): e0250642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250642>.

- AKCAY IM, CELIK E, AGAOGLU NB, ALKURT G, KIZILBOGA AKGUN T, YILDIZ J, ENC F, KIR G, CANBEK S, KILIC A, ZEMHERI E, EZBERCI F, OZCELIK M, DINLER DOGANAY G, DOGANAY L (2021). Germline pathogenic variant spectrum in 25 cancer susceptibility genes in Turkish breast and colorectal cancer patients and elderly controls. *International Journal of Cancer*, **148** (2): 285–295. <https://doi.org/10.1002/ijc.33199>.
- ALORAIFI F, MCDEVITT T, MARTINIANO R, MCGREEVY J, MCLAUGHLIN R, EGAN CM, CODY N, MEANY M, KENNY E, GREEN AJ, BRADLEY DG, GERAGHTY JG, BRACKEN AP (2015). Detection of novel germline mutations for breast cancer in non-BRCA1/2 families. *FEBS Journal*, **282** (17): 3424–3437. <https://doi.org/10.1111/febs.13352>.
- AMINI P, NASSIRI S, ETTLIN J, MALBON A, MARKKANEN E (2019). Next-generation RNA sequencing of FFPE subsections reveals highly conserved stromal reprogramming between canine and human mammary carcinoma. *Disease models & mechanisms*, **12** (8): dmm040444. <https://doi.org/10.1242/dmm.040444>.
- AMINI P, NASSIRI S, MALBON A, MARKKANEN E (2020). Differential stromal reprogramming in benign and malignant naturally occurring canine mammary tumours identifies disease-modulating stromal components. *Scientific Reports*, **10** (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62354-8>.
- AMINI S, ABAK A, ESTIAR MA, MONTAZERI V, ABHARI A, SAKHINIA E (2018). Expression analysis of MicroRNA-222 in breast cancer. *Clinical Laboratory*, **64** (4): 491–496. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2017.171002>.
- AMMANAMANCHI S, KIM SJ, SUN LZ, BRATTAIN MG (1998). Induction of transforming growth factor- β receptor type II expression in estrogen receptor-positive breast cancer cells through SP1 activation by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Journal of Biological Chemistry*, **273** (26): 16527–16534. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.16527>.
- ANCOT F, ARCAND SL, MES-MASSON AM, PROVENCHER DM, TONIN PN (2015). Double PALB2 and BRCA1/BRCA2 mutation carriers are rare in breast cancer and breast-ovarian cancer syndrome families from the French Canadian founder population. *Oncology Letters*, **9** (6): 2787–2790. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3123>.
- ANDRADE FO, NGUYEN NM, WARRI A, HILAKIVI-CLARKE L (2019). Reversal of increased mammary tumorigenesis by valproic acid and hydralazine in offspring of dams fed high fat diet during pregnancy. *Scientific Reports*, **9** (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56854-5>.
- ANDRADE MB, GUIMARÃES EC, COLETO AF, SOARES NP, MEDEIROS-RONCHI AA (2017). Retrospective Study of Mammary Lesions in Bitches - Uberlândia, MG, Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, **45** : 1509. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.80788>.
- ANNA A, MONIKA G (2018). Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *Journal of Applied Genetics*, **59** (3): 253–268. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0444-7>.
- ANTONIOU AC, CASADEI S, HEIKKINEN T, BARROWDALE D, PYLKÄS K, ROBERTS J, LEE A, SUBRAMANIAN D, DE LEENEER K, FOSTIRA F, TOMIAK E, NEUHAUSEN SL, TEO ZL, KHAN S, AITOMÄKI K, MOILANEN JS, TURNBULL C, SEAL S, MANNERMAA A, KALLIONIEMI A,

- LINDEMAN GJ, BUYS SS, ANDRULIS IL, RADICE P, TONDINI C, MANOUKIAN S, TOLAND AE, MIRON P, WEITZEL JN, DOMCHEK SM, POPPE B, CLAES KBM, YANNOUKAKOS D, CONCANNON P, BERNSTEIN JL, JAMES PA, EASTON DF, GOLDFAR DE, HOPPER JL, RAHMAN N, PETERLONGO P, NEVANLINNA H, KING M-C, COUCH FJ, SOUTHEY MC, WINQVIST R, FOULKES WD, TISCHKOWITZ M (2014). Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med*, **371** (6): 497–506. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1400382>.
- ANTUOFERMO E, MILLER MA, PIRINO S, XIE J, BADVE S, MOHAMMED SI (2007). Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs - A model of breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **16** (11): 2247–2256. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0932>.
- ANWAR T, GONZALEZ ME, KLEER CG (2021). Noncanonical Functions of the Polycomb Group Protein EZH2 in Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*, **191** (5): 774–783. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.01.013>.
- ARRUABARRENA-ARISTORENA A, MAAG JLV, KITTANE S, CAI Y, KARTHAUS WR, LADEWIG E, PARK J, KANNAN S, FERRANDO L, COCCO E, HO SY, TAN DS, SALLAKU M, WU F, ACEVEDO B, SELENICA P, ROSS DS, WITKIN M, SAWYERS CL, REIS-FILHO JS, VERMA CS, JAUCH R, KOCHER R, BASELGA J, RAZAVI P, TOSKA E, SCALTRITI M (2020). FOXA1 Mutations Reveal Distinct Chromatin Profiles and Influence Therapeutic Response in Breast Cancer. *Cancer Cell*, **38** (4): 534–550.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.08.003>.
- ASHKENAZY H, ABADI S, MARTZ E, CHAY O, MAYROSE I, PUPKO T, BEN-TAL N (2016). ConSurf2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic acids research*, **44** (W1): W344–W350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw408>.
- ATALAY VURAL S, AYDIN Y (2001). Ankara’da 1973-1998 Yılları Arasında İncelenen Köpek Meme Tümörleri. *Türk J Vet Anim Sci*, **25**: 233–239.
- ATTIA MA (1982). Cytological study on the anterior pituitary of senile untreated Beagle bitches with spontaneous mammary tumours. *Archives of Toxicology*, **50** (1): 35–45. <https://doi.org/10.1007/BF00569235>.
- BAE WK, HENNIGHAUSEN L (2014). Canonical and non-canonical roles of the histone methyltransferase EZH2 in mammary development and cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **382** (1): 593–597. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.05.002>.
- BAILEY SD, DESAI K, KRON KJ, MAZROOEI P, SINNOTT-ARMSTRONG NA, TRELOAR AE, DOWAR M, THU KL, CESCO DW, SILVESTER J, YANG SYC, WU X, PEZO RC, HAIBE-KAINS B, MAK TW, BEDARD PL, PUGH TJ, SALLARI RC, LUPINI M (2016). Noncoding somatic and inherited single-nucleotide variants converge to promote ESR1 expression in breast cancer. *Nature Genetics*, **48** (10): 1260–1266. <https://doi.org/10.1038/ng.3650>.
- BALIA C, SENSI E, LOMBARDI G, RONCELLA M, BEVILACQUA G, CALIGO MA (2010). PALB2: A novel inactivating mutation in a Italian breast cancer family. *Familial Cancer*, **9** (4): 531–536. <https://doi.org/10.1007/s10689-010-9382-1>.
- BARALLE D, LUCASSEN A, BURATTI E (2009). Missed threads. *EMBO reports*, **10** (8): 810–816.

<https://doi.org/10.1038/embor.2009.170>.

- BARUTCU AR, HONG D, LAJOIE BR, MCCORD RP, VAN WIJNEN AJ, LIAN JB, STEIN JL, DEKKER J, IMBALZANO AN, STEIN GS (2016). RUNX1 contributes to higher-order chromatin organization and gene regulation in breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, **1859** (11): 1389–1397. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.08.003>.
- BEAUVAIS W, CARDWELL JM, BRODBELT DC (2012). The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs- a systematic review. *Journal of Small Animal Practice*, **53**: 314–322. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2012.01220.x>.
- BEITZINGER M, MEISTER G (2014). Experimental Identification of MicroRNA Targets. *Handbook of RNA Biochemistry: Second, Completely Revised and Enlarged Edition* **2** (2): 1087–1096. <https://doi.org/10.1002/9783527647064.ch49>.
- BENAVENTE MA, BIANCHI CP, ABA MA (2019). Expression of Oxytocin Receptors in Canine Mammary Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, **170**: 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2019.05.005>.
- BENNESCH MA, SEGALA G, WIDER D, PICARD D (2016). LSD1 engages a corepressor complex for the activation of the estrogen receptor α by estrogen and cAMP. *Nucleic Acids Research*, **44** (18): 8655–8670. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw522>.
- BERGSTROM C, PENCE C, BERG J, PARTAIN N, SADEGHI N, MAUER C, PIRZADEH-MILLER S, GAO A, LI H, UNNI N, SYED S (2021). Clinicopathological Features and Outcomes in Individuals with Breast Cancer and ATM, CHEK2, or PALB2 Mutations. *Annals of Surgical Oncology*, **28** (6): 3383–3393. <https://doi.org/10.1245/s10434-020-09158-2>.
- BETTUZZI S, ROBINSON A, FUCHS-YOUNG R, GREENE GL (1992). Estrogen and progesterone receptor structure and action in breast cancer cells. In: DICKSON RB, LIPPMAN ME (ed.) *Genes, Oncogenes, and Hormones*. Springer US, Boston, MA. 301–307. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3500-3>.
- BHATTACHARJEE S, NANDI S (2016). Choices have consequences: the nexus between DNA repair pathways and genomic instability in cancer. *Clinical and Translational Medicine*, **5** (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40169-016-0128-z>.
- BIANCHI F, SOMMARIVA M, DE CECCO L, TRIULZI T, ROMERO-CORDOBA S, TAGLIABUE E, SFONDRINI L, BALSARI A (2016). Expression and prognostic significance of the autoimmune regulator gene in breast cancer cells. *Cell Cycle*, **15** (23): 3220–3229. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1241918>.
- BISWAS S, ROY CHOWDHURY S, MANDAL G, PUROHIT S, GUPTA A, BHATTACHARYYA A (2019). RelA driven co-expression of CXCL13 and CXCR5 is governed by a multifaceted transcriptional program regulating breast cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **1865** (2): 502–511. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.12.002>.
- BLEUYARD J-Y, FOURNIER M, NAKATO R, COUTURIER AM, KATOU Y, RALF C, HESTER SS, DOMINGUEZ D, RHODES D, HUMPHREY TC, SHIRAHIGE K, ESASHI F (2017). MRG15-mediated

- tethering of PALB2 to unperturbed chromatin protects active genes from genotoxic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **114** (29): 7671–7676. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620208114>.
- BODILY WR, SHIRTS BH, WALSH T, GULSUNER S, KING MC, PARKER A, ROOSAN M, PICCOLO SR (2020). Effects of germline and somatic events in candidate BRCA-like genes on breast-tumor signatures. *PLoS ONE*, **15** (9): e0239197. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239197>.
- BOGDANOVA N, SOKOLENKO AP, IYEVLEVA AG, ABYSHEVA SN, BLAUT M, BREMER M, CHRISTIANSEN H, RAVE-FRÄNK M, DÖRK T, IMYANITOV EN (2011). PALB2 mutations in German and Russian patients with bilateral breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **126** (2): 545–550. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1290-4>.
- BOGGS RM, WRIGHT ZM, STICKNEY MJ, PORTER WW, MURPHY KE (2008). MicroRNA expression in canine mammary cancer. *Mammalian Genome*, **19** (7–8): 561–569. <https://doi.org/10.1007/s00335-008-9128-7>.
- BOLDIZSÁR H, SZENCI O, MURAY T, CSENKI J (1992). Studies on canine mammary tumours. I. Age, seasonal and breed distribution. *Acta Veterinaria Hungarica*, **40** (1–2): 75–87.
- BOONEN RACM, VREESWIJK MPG, VAN ATTIKUM H (2020). Functional Characterization of PALB2 Variants of Uncertain Significance: Toward Cancer Risk and Therapy Response Prediction. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **7**: 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00169>.
- BORGE KS, BØRRESEN-DALE AL, LINGAAS F (2011). Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. *Veterinary and Comparative Oncology*, **9** (4): 241–250. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2010.00250.x>.
- BORGE KS, NORD S, LOO PV, LINGJÆRDE OC, GUNNES G, ALNÆS GIG, SOLVANG HK, LÜDERS T, KRISTENSEN VN, BØRRESEN-DALE AL, LINGAAS F (2015). Canine mammary tumours are affected by frequent copy number aberrations, Including amplification of myc and loss of pten. *PLoS ONE*, **10** (5): 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126371>.
- BOUCHAL P, DVOŘÁKOVÁ M, ROUMELIOTIS T, BORTLÍČEK Z, IHNATOVÁ I, PROCHÁZKOVÁ I, HO JTC, MARYÁŠ J, IMRICOVÁ H, BUDINSKÁ E, VYZULA R, GARBIS SD, VOJTĚŠEK B, NENUTIL R (2015). Combined Proteomics and Transcriptomics Identifies Carboxypeptidase B1 and Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Associated Proteins as Putative Biomarkers of Metastasis in Low Grade Breast Cancer. *Molecular & Cellular Proteomics*, **14** (7): 1814–1830. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.041335>.
- BOURDEAU V, DESCHÊNES J, MÉTIVIER R, NAGAI Y, NGUYEN D, BRETSCHNEIDER N, GANNON F, WHITE JH, MADER S (2004). Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Molecular Endocrinology*, **18** (6): 1411–1427. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0441>.
- BOWMAN-COLIN C, XIA B, BUNTING S, KLIJN C, DROST R, BOUWMAN P, FINEMAN L, CHEN X, CULHANE AC, CAI H, RODIG SJ, BRONSON RT, JONKERS J, NUSSENZWEIG A, KANELLOPOULOU C, LIVINGSTON DM (2013). Palb2 synergizes with Trp53 to suppress mammary tumor formation in a model of inherited breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110** (21): 8632–8637. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305362110>.

- BRIGGS MH (1980). Progestogens and mammary tumours in the beagle bitch. *Research in Veterinary Science*, **28**: 199–202.
- BROWNE G, TAIPALEENMÄKI H, BISHOP NM, MADASU SC, SHAW LM, VAN WIJNEN AJ, STEIN JL, STEIN GS, LIAN JB (2015). Runx1 is associated with breast cancer progression in MMTV-PyMT transgenic mice and its depletion in vitro inhibits migration and invasion. *Journal of Cellular Physiology*, **230** (10): 2522–2532. <https://doi.org/10.1002/jcp.24989>.
- BUISSON R, DION-CÔTÉ A-M, COULOMBE Y, LAUNAY H, CAI H, STASIAK AZ, STASIAK A, XIA B, MASSON J-Y (2010). Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nature Structural & Molecular Biology*, **17** (10): 1247–1254. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1915>.
- BUISSON R, MASSON J-Y (2012). PALB2 self-interaction controls homologous recombination. *Nucleic Acids Research*, **40** (20): 10312–10323. <https://doi.org/10.1093/nar/gks807>.
- BUISSON R, NIRAJ J, PAUTY J, MAITY R, ZHAO W, COULOMBE Y, SUNG P, MASSON JY (2014). Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase η in recombination-associated DNA Synthesis At Blocked Replication Forks. *Cell Reports*, **6** (3): 553–564. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.009>.
- BUNNELL AE, GARBY CA, PEARSON EJ, WALKER SA, PANOS LE, BLUM JL (2017). The Clinical Utility of Next Generation Sequencing Results in a Community-Based Hereditary Cancer Risk Program. *Journal of Genetic Counseling*, **26** (1): 105–112. <https://doi.org/10.1007/s10897-016-9985-2>.
- BURWINKEL B, SHANMUGAM KS, HEMMINKI K, MEINDL A, SCHMUTZLER RK, SUTTER C, WAPPENSCHMIDT B, KIECHLE M, BARTRAM CR, FRANK B (2006). Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variant is associated with familial breast cancer risk: a case-control study. *BMC Cancer*, **6** (1): 268. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-268>.
- CACERES S, PEÑA L, LACERDA L, ILLERA MJ, DE ANDRES PJ, LARSON RA, GAO H, DEBEB BG, WOODWARD WA, REUBEN JM, ILLERA JC (2017). Canine cell line, IPC-366, as a good model for the study of inflammatory breast cancer. *Veterinary and Comparative Oncology*, **15** (3): 980–995. <https://doi.org/10.1111/vco.12238>.
- CALECA L, CATUCCI I, FIGLIOLI G, DE CECCO L, PESARAN T, WARD M, VOLORIO S, FALANGA A, MARCHETTI M, IASCONI M, TONDINI C, ZAMBELLI A, AZZOLLINI J, MANOUKIAN S, RADICE P, PETERLONGO P (2018). Two Missense Variants Detected in Breast Cancer Probands Preventing BRCA2-PALB2 Protein Interaction. *Frontiers in Oncology*, **8**: 480. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00480>.
- CANADAS A, SANTOS M, NOGUEIRA A, ASSIS J, GOMES M, LEMOS C, MEDEIROS R, DIAS-PEREIRA P (2018). Canine mammary tumor risk is associated with polymorphisms in RAD51 and STK11 genes. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **30** (5): 733–738. <https://doi.org/10.1177/1040638718789231>.
- CAO AY, HUANG J, HU Z, LI WF, MA ZL, TANG LL, ZHANG B, SU FX, ZHOU J, DI GH, SHEN KW, WU J, LU JS, LUO JM, YUAN WT, SHEN ZZ, HUANG W, SHAO ZM (2009). The prevalence of PALB2

- germline mutations in BRCA1/BRCA2 negative Chinese women with early onset breast cancer or affected relatives. *Breast Cancer Research and Treatment*, **114** (3): 457–462. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0036-z>.
- CAO AY, YU K Da, YIN WJ, JIN W, DI GH, SHEN ZZ, SHAO ZM (2010). Five common single nucleotide polymorphisms in the PALB2 gene and susceptibility to breast cancer in eastern Chinese population. *Breast Cancer Research and Treatment*, **123** (1): 133–138. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0637-1>.
- CAPRIOTTI E, CALABRESE R, CASADIO R (2006). Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics*, **22** (22): 2729–2734. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl423>.
- CARTEGNI L, CHEW SL, KRAINER AR (2002). Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics*, **3** (4): 285–298. <https://doi.org/10.1038/nrg775>.
- CARVALHO MI, PIRES I, PRADA J, QUEIROGA FL (2014). A Role for T-Lymphocytes in Human Breast Cancer and in Canine Mammary Tumors. *BioMed Research International*, **2014**: 130894. <https://doi.org/10.1155/2014/130894>.
- CASADEI S, NORQUIST BM, WALSH T, STRAY S, MANDELL JB, LEE MK, STAMATOYANNOPOULOS JA, KING M (2011). Contribution to Familial Breast Cancer of Inherited Mutations in the BRCA2-Interacting Protein PALB2. *Cancer Research*, **71** (6): 2222–2229. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3958>.
- CASKEY R, SINGLETARY B, AYRE K, PARKER C, KRONTIRAS H, LANCASTER RB (2020). Expectations of Surveillance for Non-BRCA Gene Mutation Carriers at Increased Risk for Breast Cancer. *Journal of Surgical Research*, **256**: 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2020.06.029>.
- CASSALI GD, GOBBI H, MALM C, SCHMITT FC (2007). Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: Comparative features with human tumours. *Cytopathology*, **18** (3): 191–196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2303.2007.00412.x>.
- CASSALI GD, LAVALLE GE, DE NARDI AB, FERREIRA E, BERTAGNOLLI AC, ESTRELA-LIMA A, ALESSI AC, DALECK CR, SALGADO BS, FERNANDES CG, SOBRAL RA, AMORIM RL, GAMBA CO, DAMASCENO KA, AULER PA, MAGALHÃES GM, SILVA JO, RAPOSO JB, FERREIRA AMR, OLIVEIRA LO, MALM C, ZUCCARI DAPC, TANAKA NM, RIBEIRO LR, CAMPOS LC, SOUZA CM, LEITE JS, SOARES LMC, CAVALCANTI MF, FONTELES ZGC, SCHUCH ID, PANIAGO J, OLIVEIRA TS, TERRA EM, CASTANHEIRA TLL, FELIX AOC, CARVALHO GD, GUIM TN, GUIM TN, GARRIDO E, FERNANDES SC, MAIA FCL, DAGLI MLZ, ROCHA NS, FUKUMASU H, GRANDI F, MACHADO JP, SILVA SMMS, BEZERRIL JE, FREHSE MS, DE ALMEIDA ECP, CAMPOS CB (2011). Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, **4** (2): 153–180.
- CECCALDI R, RONDINELLI B, D'ANDREA AD (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology*, **26** (1): 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>.
- CHAMBERS PL, GÜNZEL P (1979). Mechanism of Toxic Action on Some Target Organs Arch. Toxicol., Suppl.

2. Springer Berlin Heidelberg. 11; 24–35; 46–49; 54 ss.

CHAPMAN JR, TAYLOR MRG, BOULTON SJ (2012). Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*, **47** (4): 497–510. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029>.

CHASE A, CROSS NCP (2011). Aberrations of EZH2 in Cancer. *Clinical Cancer Research*, **17** (9): 2613–2618. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2156>.

CHÁVARRI-GUERRA Y, MARCUM CA, HENDRICKS CB, WILBUR D, CESCOT T, HAKE C, ABUGATTAS J, RODRIGUEZ Y, VILLARREAL-GARZA C, YANG K, CERVANTES A, SAND S, CASTILLO D, HERZOG J, MOKHNATKIN J, SEDRAK MS, SOTO-PEREZ-DE-CELIS E, WEITZEL JN (2021). Breast cancer associated pathogenic variants among women 61 years and older with triple negative breast cancer. *Journal of Geriatric Oncology*, **12** (5): 749–751. <https://doi.org/10.1016/j.jgo.2020.11.008>.

CHEN J, YUAN T, LIU M, CHEN P (2013). Association between TCF7L2 Gene Polymorphism and Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, **8** (8): e71730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071730>.

CHEN J, CHEN Z, HUANG J, CHEN F, YE W, DING G, WANG X (2017). Bioinformatics identification of dysregulated microRNAs in triple negative breast cancer based on microRNA expression profiling. *Oncology Letters*, **64**: 3017–3023. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7707>.

CHEN L, CHEN D-T, KURTYKA C, RAWAL B, FULP WJ, HAURA EB, CRESS WD (2012). Tripartite Motif Containing 28 (Trim28) Can Regulate Cell Proliferation by Bridging HDAC1/E2F Interactions. *Journal of Biological Chemistry*, **287** (48): 40106–40118. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.380865>.

CHEN MT, SUN HF, LI LD, ZHAO Y, YANG LP, GAO SP, JIN W (2018). Downregulation of FOXP2 promotes breast cancer migration and invasion through TGFβ/SMAD signaling pathway. *Oncology Letters*, **15** (6): 8582–8588. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8402>.

CHEN P, LIANG J, WANG Z, ZHOU X, CHEN L, LI M, XIE D, HU Z, SHEN H, WANG H (2008). Association of common PALB2 polymorphisms with breast cancer risk: A case-control study. *Clinical Cancer Research*, **14** (18): 5931–5937. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0429>.

CHEN S-Y, LI C, JIA X, LAI S-J (2019). Sequence and Evolutionary Features for the Alternatively Spliced Exons of Eukaryotic Genes. *International Journal of Molecular Sciences*, **20** (15): 3834. <https://doi.org/10.3390/ijms20153834>.

CHEN Y, WANG X (2020). miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Research*, **48** (D1): D127–D131. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>.

CHIMGE N-O, FRENKEL B (2013). The RUNX family in breast cancer: relationships with estrogen signaling. *Oncogene*, **32** (17): 2121–2130. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.328>.

CHIMGE N-O, AHMED-ALNASSAR S, FRENKEL B (2017). Relationship between RUNX1 and AXIN1 in ER-negative versus ER-positive Breast Cancer. *Cell Cycle*, **16** (4): 312–318. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1237325>.

- CHIMGE N-O, LITTLE GH, BANIWAL SK, ADISETIYO H, XIE Y, ZHANG T, O'LAUGHLIN A, LIU ZY, ULRICH P, MARTIN A, Mhaweche-Fauceglia P, ELLIS MJ, TRIPATHY D, GROSHEN S, LIANG C, LI Z, SCHONES DE, FRENKEL B (2016). RUNX1 prevents oestrogen-mediated AXIN1 suppression and β -catenin activation in ER-positive breast cancer. *Nature Communications*, **7** (1): 10751. <https://doi.org/10.1038/ncomms10751>.
- CHOI HJ, JANG S, RYU JE, LEE HJ, LEE HB, AHN WS, KIM HJ, LEE HJ, LEE HJ, GONG GY, SON WC (2016). Significance of EZH2 expression in canine mammary tumors. *BMC Veterinary Research*, **12** (1): 1–7. <https://doi.org/10.1186/S12917-016-0789-2>.
- CHOI Y, CHAN AP (2015). PROVEAN web server: A tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*, **31** (16): 2745–2747. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195>.
- CHOI Y, SIMS GE, MURPHY S, MILLER JR, CHAN AP (2012). Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE*, **7** (10): e46688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>.
- CHU LL, RUTTEMAN GR, KONG JMC, GHahremani M, SCHMEING M, MISDORP W, VAN GARDEREN E, 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. <https://doi.org/10.1023/A:1006010526813>
- CHURPEK JE, WALSH T, ZHENG Y, MOTON Z, THORNTON AM, LEE MK, CASADEI S, WATTS A, NEISTADT B, CHURPEK MM, HUO D, ZVOSEC C, LIU F, NIU Q, MARQUEZ R, ZHANG J, FACKENTHAL J, KING MC, OLOPADE OI (2015). Inherited predisposition to breast cancer among African American women. *Breast Cancer Research and Treatment*, **149** (1): 31–39. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3195-0>.
- CLIFFORD E, HUGHES KS, ROBERTS M, PIRZADEH-MILLER S, MCLAUGHLIN SA (2016). Assessing, Counseling, and Treating Patients at High Risk for Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, **23** (10): 3128–3132. <https://doi.org/10.1245/s10434-016-5399-5>.
- COCK-RADA AM, OSSA CA, GARCIA HI, GOMEZ LR (2018). A multi-gene panel study in hereditary breast and ovarian cancer in Colombia. *Familial Cancer*, **17** (1): 23–30. <https://doi.org/10.1007/s10689-017-0004-Z>.
- COHEN D, REIF JS, BRODEY RS, KEISER H (1974). Epidemiological Analysis of the Most Prevalent Sites and Types of Canine Neoplasia Observed in a Veterinary Hospital. *Cancer Research*, **34** (11): 2859–2868.
- CONCANNON PW, SPRAKER TR, CASEY HW, HANSEL W (1981). Gross and histopathologic effects of medroxyprogesterone acetate and progesterone on the mammary glands of adult beagle bitches. *Fertility and Sterility*, **36** (3): 373–387. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)45741-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)45741-9).
- CONNOR AE, BAUMGARTNER RN, BAUMGARTNER KB, KERBER RA, PINKSTON C, JOHN EM, TORRES-MEJIA G, HINES L, GIULIANO A, WOLFF RK, SLATTERY ML (2012). Associations between TCF7L2 polymorphisms and risk of breast cancer among Hispanic and non-Hispanic White women: the Breast Cancer Health Disparities Study. *Breast Cancer Research and Treatment*, **136** (2): 593–602. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2299-7>.

- CORREDOR J, WOODSON AH, GUTIERREZ BARRERA A, ARUN B (2020). Multigene panel testing results in patients with multiple breast cancer primaries. *Breast Journal*, **26** (7): 1337–1342. <https://doi.org/10.1111/tbj.13762>.
- COSTA-SANTOS K, DAMASCENO K, PORTELA RD, SANTOS FL, ARAÚJO GC, MARTINS-FILHO EF, SILVA LP, BARRAL TD, SANTOS SA, ESTRELA-LIMA A (2019). Lipid and metabolic profiles in female dogs with mammary carcinoma receiving dietary fish oil supplementation. *BMC Veterinary Research*, **15** (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2151-y>.
- COUCH FJ, HART SN, SHARMA P, TOLAND AE, WANG X, MIRON P, OLSON JE, GODWIN AK, PANKRATZ VS, OLSWOLD C, SLETTEDAHN S, HALLBERG E, GUIDUGLI L, DAVILA JI, BECKMANN MW, JANNI W, RACK B, EKICI AB, SLAMON DJ, KONSTANTOPOULOU I, FOSTIRA F, VRATIMOS A, FOUNTZILAS G, PELTTARI LM, TAPPER WJ, DURCAN L, CROSS SS, PILARSKI R, SHAPIRO CL, KLEMP J, YAO S, GARBER J, COX A, BRAUCH H, AMBROSONE C, NEVANLINNA H, YANNOUKAKOS D, SLAGER SL, VACHON CM, ECCLES DM, FASCHING PA (2015). Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **33** (4): 304–311. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.1414>.
- CUIFFO BG, CAMPAGNE A, BELL GW, LEMBO A, ORSO F, LIEN EC, BHASIN MK, RAIMO M, HANSON SE, MARUSYK A, EL-ASHRY D, HEMATTI P, POLYAK K, MECHTA-GRIGORIOU F, MARIANI O, VOLINIA S, VINCENT-SALOMON A, TAVERNA D, KARNOUB AE (2014). MSC-regulated microRNAs converge on the transcription factor FOXP2 and promote breast cancer metastasis. *Cell Stem Cell*, **15** (6): 762–774. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.001>.
- CULLEN JM, BREEN M (2016). An Overview of Molecular Cancer Pathogenesis, Prognosis, and Diagnosis. *İçinde: Tumors in Domestic Animals*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/9781119181200.ch1>
- CYBULSKI C, KLUŻNIAK W, HUZARSKI T, WOKŁORCZYK D, KASHYAP A, RUSAK B, STEMPA K, GRONWALD J, SZYMICZEK A, BAGHERZADEH M, JAKUBOWSKA A, DĘBNIAK T, LENER M, RUDNICKA H, SZWIEC M, JARKIEWICZ-TRETYN J, STAWICKA M, DOMAGAŁA P, NAROD SA, LUBIŃSKI J, AKBARI MR (2019). The spectrum of mutations predisposing to familial breast cancer in Poland. *International Journal of Cancer*, **145** (12): 3311–3320. <https://doi.org/10.1002/ijc.32492>.
- D'ARVILLE CN, PIERREPOINT CG (1979). The demonstration of oestrogen, androgen and progestagen receptors in the cytosol fraction of canine mammary tumours. *European Journal of Cancer (1965)*, **15** (6): 875–883. [https://doi.org/10.1016/0014-2964\(79\)90229-9](https://doi.org/10.1016/0014-2964(79)90229-9).
- DALMAY T (2017). MicroRNA Detection and Target Identification. Cilt 1580. Springer New York, New York. 79–95 ss. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6866-4>
- DANSONKA-MIESZKOWSKA A, KLUSKA A, MOES J, DABROWSKA M, NOWAKOWSKA D, NIWINSKA A, DERLATKA P, CENDROWSKI K, KUPRYJANCZYK J (2010). A novel germline PALB2 deletion in Polish breast and ovarian cancer patients. *BMC Medical Genetics*, **11** (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-20>.

- DAVIS PL, MIRON A, ANDERSEN LM, IGLEHART JD, MARKS JR (1999). Isolation and initial characterization of the BRCA2 promoter. *Oncogene*, **18** (44): 6000–6012. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202990>.
- DE BAETS G, VAN DURME J, REUMERS J, MAURER-STROH S, VANHEE P, DOPAZO J, SCHYMKOWITZ J, ROUSSEAU F (2012). SNPeffect 4.0: On-line prediction of molecular and structural effects of protein-coding variants. *Nucleic Acids Research*, **40** (D1): 935–939. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr996>.
- DE LAS MULAS JM, ORDÁS J, MILLÁN Y, FERNÁNDEZ-SORIA V, Y CAJAL SR (2003). Oncogene HER-2 in Canine Mammary Gland Carcinomas. *Breast Cancer Research and Treatment*, **80** (3): 363–367. <https://doi.org/10.1023/a:1024929730165>.
- DEB G, THAKUR VS, GUPTA S (2013). Multifaceted role of EZH2 in breast and prostate tumorigenesis. *Epigenetics*, **8** (5): 464–476. <https://doi.org/10.4161/epi.24532>.
- DEGRAFFENRIED LA, HILSENBECK SG, FUQUA SAW (2002). Sp1 is essential for estrogen receptor α gene transcription. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **82** (1): 7–18. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(02\)00151-6](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(02)00151-6).
- DEGTYAREVA AO, ANTONTSEVA EV, MERKULOVA TI (2021). Regulatory SNPs: Altered Transcription Factor Binding Sites Implicated in Complex Traits and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **22** (12): 6454. <https://doi.org/10.3390/ijms22126454>.
- DEINNOCENTES P, PERRY AL, GRAFF EC, LUTFUL KABIR FM, CURTIS BIRD R (2015). Characterization of HOX gene expression in canine mammary tumour cell lines from spontaneous tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, **13** (3): 322–336. <https://doi.org/10.1111/vco.12062>.
- DELGADO L, GÄRTNER F, DIAS PEREIRA P (2015). Activation of mammalian target of rapamycin in canine mammary carcinomas: An immunohistochemical study. *Journal of Comparative Pathology*, **152** (2–3): 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.12.004>.
- DESMET FO, HAMROUN D, COLLOD-BÉROUD G, CLAUSTRES M, BÉROUD C (2010). Bioinformatics identification of splice site signals and prediction of mutation effects. *Research Advances In Nucleic Acids Research*, (**May 2014**): 1–14. URL: http://www.umd.be/HSF/Desmet_2010.pdf <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01671042>.
- DESMET FO, HAMROUN D, LALANDE M, COLLOD-BÉROUD G, CLAUSTRES M, BÉROUD C (2009). Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research*, **37** (9): 1–14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp215>.
- DEVERYSHETTY J, PETERLINI T, RYZHIKOV M, BRAHITI N, DELLAIRE G, MASSON J-Y, KOROLEV S (2019). Novel RNA and DNA strand exchange activity of the PALB2 DNA binding domain and its critical role for DNA repair in cells. *eLife*, **8**: 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.44063>.
- DING YC, ADAMSON AW, STEELE L, BAILIS AM, JOHN EM, TOMLINSON G, NEUHAUSEN SL (2018). Discovery of mutations in homologous recombination genes in African-American women with breast cancer.

- Familial Cancer*, **17** (2): 187–195. <https://doi.org/10.1007/s10689-017-0036-4>.
- DING YC, STEELE L, CHU LH, KELLEY K, DAVIS H, JOHN EM, TOMLINSON GE, NEUHAUSEN SL (2011a). Germline mutations in PALB2 in African-American breast cancer cases. *Breast Cancer Research and Treatment*, **126** (1): 227–230. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1271-7>.
- DING YC, STEELE L, KUAN C-J, GREILAC S, NEUHAUSEN SL (2011b). Mutations in BRCA2 and PALB2 in male breast cancer cases from the United States. *Breast Cancer Research and Treatment*, **126** (3): 771–778. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1195-2>.
- DO CARMO SILVA H, DE OLIVEIRA AR, DOS SANTOS HORTA R, RASSELE MERÍSIO AC, DE SENA BV, CARLOS DE SOUZA MC, FLECHER MC (2019). Epidemiology of canine mammary gland tumours in Espírito Santo, Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, **47**: 1640. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.89901>.
- DOBSON JM, SAMUEL S, MILSTEIN H, ROGERS K, WOOD JLN (2002). Canine neoplasia in the UK : estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*, **43**: 240–246.
- DOBSON JM (2013). Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. *ISRN Veterinary Science*, **2013**: 1–23. <https://doi.org/10.1155/2013/941275>.
- DONNAY I, DEVLEESCHOUWER N, WOUTERS-BALLMAN P, LECLERCQ G, VERSTEGEN J (1996). Relationship between receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, **60** (3): 251–254. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(96\)90049-1](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(96)90049-1).
- DORN CR, TAYLOR DON, SCHNEIDER R, KLAUBER MR (1967). Survey of Animal Neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California . II . Cancer Morbidity in Dogs and Cats From Alameda Country. *Journal of the National Cancer Institute*, **40** (2): 307–318.
- DU D, KATSUNO Y, MEYER D, BUDI EH, CHEN S, KOEPPEN H, WANG H, AKHURST RJ, DERYNCK R (2018). Smad3-mediated recruitment of the methyltransferase SETDB1/ESET controls Snail1 expression and epithelial–mesenchymal transition . *EMBO reports*, **19** (1): 135–155. <https://doi.org/10.15252/embr.201744250>.
- DUAN H, HE H, HU Q, LIN Y, CAO S, LAN X, LI L, PANG D (2020). Comparison of regulatory networks of E74-like factor 1 and cold-shock domain-containing E1 in breast cancer cell lines using ChIP datasets. *Experimental and Therapeutic Medicine*, **20** (6): 1–1. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9375>.
- DUAN R, PORTER W, SAFE S (1998). Estrogen-induced c-fos protooncogene expression in MCF-7 human breast cancer cells: Role of estrogen receptor Sp1 complex formation. *Endocrinology*, **139** (4): 1981–1990. <https://doi.org/10.1210/endo.139.4.5870>.
- DUCY M, SESMA-SANZ L, GUITTON-SERT L, LASHGARI A, GAO Y, BRAHITI N, RODRIGUE A, MARGAILLAN G, CARON M-C, CÔTÉ J, SIMARD J, MASSON J-Y (2019). The Tumor Suppressor PALB2: Inside Out. *Trends in Biochemical Sciences*, **44** (3): 226–240. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.10.008>.

- EGENVALL A, BONNETT BN, ÖHAGEN P, OLSON P, HEDHAMMAR Å, VON EULER H (2005). Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Preventive Veterinary Medicine*, **69**: 109–127. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.014>.
- EL ETREBY MF, GRÄF KJ (1979). Effect of contraceptive steroids on mammary gland of beagle dog and its relevance to human carcinogenicity. *Pharmac Ther*, **5**: 369–402.
- EL ETREBY MF, GRÄF KJ, BEIER S, ELGER W, GÜNZEL P, NEUMANN F (1979). Suitability of the beagle dog as a test model for the tumorigenic potential of contraceptive steroids “short review”. *Contraception*, **20** (3): 237–256. [https://doi.org/10.1016/0010-7824\(79\)90096-9](https://doi.org/10.1016/0010-7824(79)90096-9).
- EL ETREBY MF, MÜLLER-PEDDINGHAUS R, BHARGAVA AS, FATH EL BAB MR, GRÄF KJ, TRAUTWEIN G (1980). The Role of the Pituitary Gland in Spontaneous Canine Mammary Tumorigenesis. *Veterinary Pathology*, **17** (1): 2–16. <https://doi.org/10.1177/030098588001700101>.
- EL ETREBY MF (1979). Thyroid functions in the dog and its possible relationship to mammary tumorigenesis. *Pharmac Ther*, **5**: 403–405.
- ELLING H, UNGEMACH FR (1983). Simultaneous occurrence of receptors for estradiol, progesterone, and dihydrotestosterone in canine mammary tumors. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **105** (3): 231–237. <https://doi.org/10.1007/BF00395750>.
- EL-TANANI M, RAVINDRANATH A, O’CONNELL A, JOHNSTON P (2008). The Role of LEF/TCF Factors in Neoplastic Transformation. *Current Molecular Medicine*, **8** (1): 38–50. <https://doi.org/10.2174/156652408783565559>.
- ENCINAS G, SABELNYKOVA VY, DE LYRA EC, KATAYAMA MLH, MAISTRO S, VALLE PWM de V, PEREIRA GF de L, RODRIGUES LM, SERIO PA de MP, DE GOUVÊA ACRC, GEYER FC, BASSO RA, PASINI FS, DIZ MPE, BRENTANI MM, GÓES JCGS, CHAMMAS R, BOUTROS PC, FOLGUEIRA MAAKOIKE (2018). Somatic mutations in early onset luminal breast cancer. *Oncotarget*, **9** (32): 22460–22479. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25123>.
- ENGİNLER SO, AKIŞ I, TOYDEMİR TSF, OZTABAK K, HAKTANIR D, GÜNDÜZ MC, KIRŞAN I, FIRAT I (2014). Genetic variations of BRCA1 and BRCA2 genes in dogs with mammary tumours. *Veterinary Research Communications*, **38** (1): 21–27. <https://doi.org/10.1007/s11259-013-9577-7>.
- ENSEMBL (2021a). 3’ UTR.
Erişim: [https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP/Results?field1=SYMBOL;operator1=is;time=1630680183704.704;tl=Izkx7Ts0LxqvDXT-7612219;value1=PALB2#Results]. Erişim Tarihi: [17.04.21].
- ENSEMBL (2021b). Comparative Genomics-Genomic alignments.
Erişim: [https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Comparative_Alignments?db=core;g=ENSG000000083093;r=16:23603160-23641310]. Erişim Tarihi: [17.04.21].
- ENSEMBL (2021c). Comparative Genomics-Genomic alignments.

Erişim: [https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Compare_Alignments?align=710--Canis_lupus_familiaris--25:7733497-7798493;db=core;g=ENSG00000139618;r=13:32314486-32400868].
Erişim Tarihi: [17.04.21].

ENSEMBL (2021d). COSV55166669.
Erişim: [https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=16:23625845-23626845;tl=4fgn620xLmsm2bP6-7612216;v=COSV55166669;vdb=variation;vf=741227026]. Erişim Tarihi: [17.04.21].

ENSEMBL (2021e). COSV55168966.
Erişim: [https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=16:23602970-23603970;v=COSV55168966;vdb=variation;vf=741228544]. Erişim Tarihi: [17.04.21].

ENSEMBL (2021f). Ekzon 13.
Erişim: [https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP/Results?field1=SYMBOL;operator1=is;time=1630585258316.316;tl=zfX9KCurOxvItDC3-7612217;value1=PALB2#Results]. Erişim Tarihi: [17.04.21].

ENSEMBL (2021g). Ekzon 7.
Erişim: [https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP/Results?field2=SYMBOL;operator2=is;tl=4fgn620xLmsm2bP6-7612216;value2=PALB2#Results]. Erişim Tarihi: [17.04.21].

ENSEMBL (2021h). Ensembl PALB2 (Dog Gene) Search Results.
Erişim: [https://www.ensembl.org/Dog/Search/Results?q=PALB2;site=ensembl;facet_species=Dog;page=1;facet_feature_type=Gene]. Erişim Tarihi: [17.04.21].

ENSEMBL (2021i). Gene: ENSCAFG00030020559.
Erişim: [https://www.ensembl.org/Canis_lupus_familiaris/basenji/Gene/Summary?db=core;g=ENSCAFG00030020559;r=6:55528757-55557259;t=ENSCAFT00030037718]. Erişim Tarihi: [17.04.21].

ENSEMBL (2021j). Gene: ENSCAFG00040003287.
Erişim: [https://www.ensembl.org/Canis_lupus_familiaris/greatdane/Gene/Summary?db=core;g=ENSCAFG00040003287;r=6:22156546-22184915]. Erişim Tarihi: [17.04.21].

ENSEMBL (2021k). Gene: PALB2 ENSCAFG00000030772.
Erişim: [https://www.ensembl.org/Canis_lupus_familiaris/Gene/Summary?db=core;g=ENSCAFG00000030772;r=6:22209384-22237745;t=ENSCAFT00000049192]. Erişim tarihi: [17.04.21].

ENSEMBL (2021l). Gene: PALB2 ENSG00000083093.
Erişim: [https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000083093;r=16:23603160-23641310]. Erişim Tarihi: [17.04.21].

ENSEMBL (2021m). İtron 2.
Erişim: [https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP/Results?field1=SYMBOL;operator1=is;time=1630683840786.786;tl=UCShmd3u05Zjwicz-7612221;value1=BRCA2#Results]. Erişim Tarihi: [17.04.21].

- ENSEMBL (2021n). İtron 6.
Erişim: [https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Tools/VEP/Results?tl=X9sU1fbW6C5li8AU-7612215].
Erişim Tarihi: [17.04.21].
- ENSEMBL (2021o). rs1060504708.
Erişim:[https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=16:23628696-23629696;tl=X9sU1fbW6C5li8AU-7612215;v=rs1060504708;vdb=variation;vf=377660892]. Erişim tarihi:[17.04.21].
- ENSEMBL (2021p). rs1567204889.
Erişim:[https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=16:23602946-23603953;v=rs1567204889;vdb=variation;vf=495449843]. Erişim tarihi:[17.04.21].
- ENSEMBL (2021q). rs1597061743.
Erişim:[https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=16:23602969-23603969;v=rs1597061743;vdb=variation;vf=505960791]. Erişim tarihi:[17.04.21].
- ENSEMBL (2021r). rs1597085237.
Erişim:[https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=16:23625845-23626845;tl=4fgn620xLmsm2bP6-7612216;v=rs1597085237;vdb=variation;vf=506137429]. Erişim tarihi:[17.04.21].
- ENSEMBL (2021s). rs752928633.
Erişim:[https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=16:23625844-23626844;v=rs752928633;vdb=variation;vf=245436496]. Erişim tarihi:[17.04.21].
- ENSEMBL (2021t). rs770692850.
Erişim:[https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=16:23602970-23603970;v=rs770692850;vdb=variation;vf=266390554]. Erişim tarihi:[17.04.21].
- ERER H, KIRAN MM (1993). Konya'da 1985-1992 yılları arasında köpeklerde görülen tümörler. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **9** (2): 87–89.
- ERER H, KIRAN MM (2005a). *Veteriner Onkoloji*. (3. baskı). Damla Ofset A.Ş., Konya. 1 s.
- ERER H, KIRAN MM (2005b). *Veteriner Onkoloji*. (3. baskı). Damla Ofset A.Ş., Konya. 5–9 ss.
- ERER H, KIRAN MM (2005c). *Veteriner Onkoloji*. (3. baskı). Damla Ofset A.Ş., Konya. 148 ss.
- ERKKO H, XIA B, NIKKILÄ J, SCHLEUTKER J, SYRJÄKOSKI K, MANNERMAA A, KALLIONIEMI A, PYLKÄS K, KARPPINEN SM, RAPAKKO K, MIRON A, SHENG Q, LI G, MATTILA H, BELL DW, HABER DA, GRIP M, REIMAN M, JUKKOLA-VUORINEN A, MUSTONEN A, KERE J, AALTONEN LA, KOSMA VM, KATAJA V, SOINI Y, DRAPKIN RI, LIVINGSTON DM, WINQVIST R (2007). A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. *Nature*, **446** (7133): 316–319. <https://doi.org/10.1038/nature05609>.
- ERKKO H, DOWTY JG, NIKKILÄ J, SYRJÄKOSKI K, MANNERMAA A, PYLKÄS K, SOUTHEY MC,

- HOLLI K, KALLIONIEMI A, JUKKOLA-VUORINEN A, KATAJA V, KOSMA VM, XIA B, LIVINGSTON DM, WINQVIST R, HOPPER JL (2008). Penetrance analysis of the PALB2 c.1592delT founder mutation. *Clinical Cancer Research*, **14** (14): 4667–4671. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0210>.
- ERTÜRK E, TANZER F, BULUCU M (1971). Patolojik Anatomi Kürsüsü'nde 1964-70 Yılları Arasında incelenen Köpek ve Kedi Tümörleri. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, **18**: 383–386.
- ETTLIN J, CLEMENTI E, AMINI P, MALBON A, MARKKANEN E (2017). Analysis of gene expression signatures in cancer-associated stroma from canine mammary tumours reveals molecular homology to human breast carcinomas. *International Journal of Molecular Sciences*, **18** (5): 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms18051101>.
- EUROPEAN VARIATION ARCHIVE (2021). PRJEB24066. Erişim: [<https://www.ebi.ac.uk/eva/?eva-study=PRJEB24066>]. Erişim tarihi: [01.12.21].
- EVANS DG, VAN VEEN EM, BYERS HJ, EVANS SJ, BURGHEL GJ, WOODWARD ER, HARKNESS EF, ECCLES DM, GREVILLE-HAYGATE SL, ELLINGFORD JM, BOWERS NL, PEREIRA M, WALLACE AJ, HOWELL SJ, HOWELL A, LALLOO F, NEWMAN WG, SMITH MJ (2021). High likelihood of actionable pathogenic variant detection in breast cancer genes in women with very early onset breast cancer. *Journal of Medical Genetics*, **783**: 1–7. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2020-107347>.
- FANALE D, INCORVAIA L, FILORIZZO C, BONO M, FIORINO A, CALÒ V, BRANDO C, CORSINI LR, BARRACO N, BADALAMENTI G, RUSSO A, BAZAN V (2020). Detection of germline mutations in a cohort of 139 patients with bilateral breast cancer by multi-gene panel testing: Impact of pathogenic variants in other genes beyond brca1/2. *Cancers*, **12** (9): 1–16. <https://doi.org/10.3390/cancers12092415>.
- FANG R, ZHU Y, HU L, KHADKA VS, AI J, ZOU H, JU D, JIANG B, DENG Y, HU X (2019). Plasma MicroRNA Pair Panels as Novel Biomarkers for Detection of Early Stage Breast Cancer. *Frontiers in Physiology*, **9**: 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01879>.
- FÉDÉRATION CYNOLOGIQUE INTERNATIONALE (2021). Fédération Cynologique Internationale. Erişim: [<http://www.fci.be/en/nomenclature/>]. Erişim tarihi: [15.07.21].
- FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY F (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, **136** (5): E359-86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>.
- FERNÁNDEZ-CALERO T, CABRERA-CABRERA F, EHRlich R, MARÍN M (2016). Silent polymorphisms: Can the tRNA population explain changes in protein properties? *Life*, **6** (1): 1–17. <https://doi.org/10.3390/life6010009>.
- FERRARI N, MOHAMMED ZMA, NIXON C, MASON SM, MALLON E, MCMILLAN DC, MORRIS JS, CAMERON ER, EDWARDS J, BLYTH K (2014). Expression of RUNX1 Correlates with Poor Patient Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. *PLoS ONE*, **9** (6): e100759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100759>.

- FERREIRA E, GOBBI H, SARAIVA BS, CASSALI GD (2010). Columnar cell lesions of the canine mammary gland: Pathological features and immunophenotypic analysis. *BMC Cancer*, **10**: 61. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-61>.
- FISH EJ, IRIZARRY KJ, DEINNOCENTES P, ELLIS CJ, PRASAD N, MOSS AG, CURT BIRD R (2018). Malignant canine mammary epithelial cells shed exosomes containing differentially expressed microRNA that regulate oncogenic networks. *BMC Cancer*, **18** (1): 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4750-6>.
- FOSTIRA F, KOSTANTOPOULOU I, APOSTOLOU P, PAPAMENTZELOPOULOU MS, PAPADIMITRIOU C, FALIAKOU E, CHRISTODOULOU C, BOUKOVINAS I, RAZIS E, TRYFONOPOULOS D, BARBOUNIS V, VAGENA A, VLACHOS IS, KALFAKAKOU D, FOUNTZILAS G, YANNOUKAKOS D (2020). One in three highly selected Greek patients with breast cancer carries a loss-of-function variant in a cancer susceptibility gene. *Journal of Medical Genetics*, **57** (1): 53–61. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2019-106189>.
- FOULKES WD, GHADIRIAN P, AKBARI MR, HAMEL N, GIROUX S, SABBAGHIAN N, DARNEL A, ROYER R, POLL A, FAFARD E, ROBIDOUX A, MARTIN G, BISMAR TA, TISCHKOWITZ M, ROUSSEAU F, NAROD SA (2007). Identification of a novel truncating PALB2 mutation and analysis of its contribution to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Breast Cancer Research*, **9** (6): 1–9. <https://doi.org/10.1186/bcr1828>.
- FRANK DW, KIRTON KT, MURCHISON TE, QUINLAN WJ, COLEMAN ME, GILBERTSON TJ, FEENSTRA ES, KIMBALL FA (1979). Mammary tumors and serum hormones in the bitch treated with medroxyprogesterone acetate or progesterone for four years. *Fertility and Sterility*, **31** (3): 340–346. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)43886-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)43886-0).
- FREITAG CE, MEI P, WEI L, PARWANI AV, LI Z (2021). ESR1 genetic alterations and their association with clinicopathologic characteristics in advanced breast cancer: a single academic institution experience. *Human Pathology*, **107**: 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2020.10.007>.
- FREY JD, SALIBIAN AA, SCHNABEL FR, CHOI M, KARP NS (2017). Non-BRCA1/2 Breast Cancer Susceptibility Genes: A New Frontier with Clinical Consequences for Plastic Surgeons. *Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open*, **5** (11): 1–7. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000001564>.
- FRITZ AJ, HONG D, BOYD J, KOST J, FINSTAAD KH, FITZGERALD MP, HANNA S, ABUARQOUB AH, MALIK M, BUSHWELLER J, TYE C, GHULE P, GORDON J, FRIETZE S, ZAIDI SK, LIAN JB, STEIN JL, STEIN GS (2020). RUNX1 and RUNX2 transcription factors function in opposing roles to regulate breast cancer stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, **235** (10): 7261–7272. <https://doi.org/10.1002/jcp.29625>.
- GALIS F, VAN DER SLUIJS I, VAN DOOREN TJM, METZ JAJ, NUSSBAUMER M (2007). Do large dogs die young? *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, **308** (2): 119–126. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21116>.
- GAMLEM H, NORDSTOGA K, GLATTRE E (2008). Canine neoplasia-introductory paper. *APMIS. Supplementum*, **(125)**: 5–18. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2008.125m2.x>.

- GAO L, ZHOU F (2021). Comprehensive Analysis of RUNX and TGF- β Mediated Regulation of Immune Cell Infiltration in Breast Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**: 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.730380>.
- GARCÍA MJ, FERNÁNDEZ V, OSORIO A, BARROSO A, LLORT G, LÁZARO C, BLANCO I, CALDÉS T, DE LA HOYA M, RAMÓN Y CAJAL T, ALONSO C, TEJADA MI, SAN ROMÁN C, ROBLES-DÍAZ L, URIOSTE M, BENÍTEZ J (2009). Analysis of FANCB and FANCN/PALB2 Fanconi Anemia genes in BRCA1/2-negative Spanish breast cancer families. *Breast Cancer Research and Treatment*, **113** (3): 545–551. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-9945-0>.
- GEIL RG, LAMAR JK (1977). FDA studies of estrogen, progestogens, and estrogen/progestogen combinations in the dog and monkey. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **3** (1–2): 179–193. <https://doi.org/10.1080/15287397709529557>.
- GEORGE SHL, DONENBERG T, ALEXIS C, DEGENNARO V, DYER H, YIN S, ALI J, BUTLER R, CHIN SN, CURLING DV, LOWE D, LUNN J, TURNQUEST T, WHARFE G, CERBON D, BARRETO-COELHO P, SCHLUMBRECHT MP, AKBARI MR, NAROD SA, HURLEY JE (2021). Gene Sequencing for Pathogenic Variants Among Adults With Breast and Ovarian Cancer in the Caribbean. *JAMA network open*, **4** (3): e210307. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.0307>.
- GERALDES M, GÄRTNER F, SCHMITT F (2000). Immunohistochemical study of hormonal receptors and cell proliferation in normal canine mammary glands and spontaneous mammary tumours. *Veterinary Record*, **146** (14): 403–406. <https://doi.org/10.1136/vr.146.14.403>.
- GERLOFF A, DITTMER A, OERLECKE I, HOLZHAUSEN HJ, DITTMER J (2011). Protein expression of the Ets transcription factor Elf-1 in breast cancer cells is negatively correlated with histological grading, but not with clinical outcome. *Oncology Reports*, **26** (5): 1121–1125. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1409>.
- GHADIRIAN P, ROBIDOUX A, ZHANG P, ROYER R, AKBARI M, ZHANG S, FAFARD E, COSTA M, MARTIN G, POTVIN C, PATOCSKAIE, LAROUCHE N, YOUNAN R, NASSIF E, GIROUX S, NAROD SA, ROUSSEAU F, FOULKES WD (2009). The contribution of founder mutations to early-onset breast cancer in French-Canadian women. *Clinical Genetics*, **76** (5): 421–426. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01277.x>.
- GILES RC, KWAPIEN RP, GEIL RG, CASEY HW (1978). Mammary Nodules in Beagle Dogs Administered Investigational Oral Contraceptive Steroids. *Journal of the National Cancer Institute*, **60** (6): 1351–1364. <https://doi.org/10.1093/jnci/60.6.1351>.
- GIRARD E, EON-MARCAIS S, OLASO R, RENAULT AL, DAMIOLA F, DONDON MG, BARJHOUX L, GOIDIN D, MEYER V, LE GAL D, BEAUVALLET J, MEBIROUK N, LONJOU C, COIGNARD J, MARCOU M, CAVACIUTI E, BAULARD C, BIHOREAU MT, COHEN-HAGUENAUER O, LEROUX D, PENET C, FERT-FERRER S, COLAS C, FREBOURG T, EISINGER F, ADENIS C, FAJAC A, GLADIEFF L, TINAT J, FLOQUET A, CHIESA J, GIRAUD S, MORTEMOSQUE I, SOUBRIER F, ZUDEBERT-BELLANGER S, LIMACHER JM, LASSET C, LEJEUNE-DUMOULIN S, DREYFUS H, BIGNON YJ, LONGY M, PUJOL P, VENAT-BOUVET L, BONADONA V, BERTHET P, LUPORSI E, MAUGARD CM, NOGUÈS C, DELNATTE C, FRICKER JP, GESTA P, FAIVRE L, LORTHOLARY A,

- BUECHER B, CARON O, GAUTHIER-VILLARS M, COUPIER I, SERVANT N, BOLAND A, MAZOYER S, DELEUZE JF, STOPPA-LYONNET D, ANDRIEU N, LESUEUR F (2019). Familial breast cancer and DNA repair genes: Insights into known and novel susceptibility genes from the GENESIS study, and implications for multigene panel testing. *International Journal of Cancer*, **144** (8): 1962–1974. <https://doi.org/10.1002/ijc.31921>.
- GOEBEL K, MERNER ND (2017). A monograph proposing the use of canine mammary tumours as a model for the study of hereditary breast cancer susceptibility genes in humans. *Veterinary Medicine and Science*, **3** (2): 51–62. <https://doi.org/10.1002/vms3.61>.
- GOIDESCU IG, CARACOSTEA G, ENIU DT, STAMATIAN FV (2018). Prevalence of deleterious mutations among patients with breast cancer referred for multigene panel testing in a Romanian population. *Medicine and Pharmacy Reports*, **91** (2): 157–165. <https://doi.org/10.15386/cjmed-894>.
- GOLDHAR AS, DUAN R, GINSBURG E, VONDERHAAR BK (2011). Progesterone induces expression of the prolactin receptor gene through cooperative action of Sp1 and C/EBP. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **335** (2): 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.01.004>.
- GOLDSCHMIDT MH, PEÑA L, RASOTTO R, ZAPPULLI V (2011). Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary Pathology*, **48** (1): 117–131. <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>.
- GOMES R, SPINOLA P DA S, BRANT AC, MATTA BP, NASCIMENTO CM, DE AQUINO PAES SM, BONVICINO CR, DOS SANTOS ACE, MOREIRA MAM (2021). Prevalence of germline variants in consensus moderate-to-high-risk predisposition genes to hereditary breast and ovarian cancer in BRCA1/2-negative Brazilian patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, **185** (3): 851–861. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05985-9>.
- GOODE EL, SZABO C, PROKUNINA-OLSSON L, VIERKANT RA, FREDERICKSEN ZS, COLLINS FS, WHITE KL, SCHMIDT M, FRIDLEY BL, COUCH FJ (2009). No association between a candidate TCF7L2 variant and risk of breast or ovarian cancer. *BMC Cancer*, **9** (1): 312. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-312>.
- GREENACRE CB (2004). Spontaneous tumors of small mammals. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, **7** (3): 627–651. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2004.04.009>.
- GRODECKÁ L, BURATTI E, FREIBERGER T (2017). Mutations of pre-mRNA splicing regulatory elements: Are predictions moving forward to clinical diagnostics? *International Journal of Molecular Sciences*, **18** (8): 1668. <https://doi.org/10.3390/ijms18081668>.
- GRONER Y, ITO Y, LIU P, NEIL JC, SPECK NA, VAN WIJNEN A (2017). RUNX Proteins in Development and Cancer. Cilt 962. Springer Singapore, Singapore. 358–360 ss. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-3233-2>
- GROSSE N, VAN LOON B, ROHRER BLEY C (2014). DNA damage response and DNA repair - dog as a model? *BMC Cancer*, **14** (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-203>.
- GRÜNTZIG K, GRAF R, HÄSSIG M, WELLE M, MEIER D, LOTT G, ERNI D, SCHENKER NS, GUSCETTI

- F, BOO G, AXHAUSEN K, FABRIKANT S, FOLKERS G, POSPISCHIL A (2015). The Swiss canine cancer registry: A retrospective study on the occurrence of tumours in dogs in Switzerland from 1955 to 2008. *Journal of Comparative Pathology*, **152** (2–3): 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.02.005>.
- GUÉNARD F, PEDNEAULT CSL, OUELLETTE G, LABRIE Y, SIMARD J, DUROCHER F (2010). Evaluation of the contribution of the three breast cancer susceptibility genes CHEK2, STK11, and PALB2 in non-BRCA1/2 French Canadian families with high risk of breast cancer. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, **14** (4): 515–526. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2010.0027>.
- GUERTIN MJ, ZHANG X, COONROD SA, HAGER GL (2014). Transient Estrogen Receptor Binding and p300 Redistribution Support a Squelching Mechanism for Estradiol-Repressed Genes. *Molecular Endocrinology*, **28** (9): 1522–1533. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1130>.
- GUIDUGLI L, CARREIRA A, CAPUTO S, EHLEN A, GALLI A, MONTEIRO ANA, NEUHAUSEN SL, HANSEN TVO, COUCH FJ, VREESWIJK MPG (2014). Functional assays for analysis of VUS in BRCA2. *Human mutation*, **18** (9): 1199–1216. <https://doi.org/10.1002/humu.22478>.Functional.
- GUIL-LUNA S, STENVANG J, BRNNER N, DE ANDRS FJ, ROLLN E, DOMINGO V, SNCHEZ-CSPEDER R, MILLN Y, DE LAS MULAS JM (2014). Progesterone receptor isoform A may regulate the effects of neoadjuvant aglepristone in canine mammary carcinomas. *BMC Veterinary Research*, **10** (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0296-2>.
- GUO S, SONENSHEIN GE (2004). Forkhead Box Transcription Factor FOXO3a Regulates Estrogen Receptor Alpha Expression and Is Repressed by the Her-2/neu/Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, **24** (19): 8681–8690. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.19.8681-8690.2004>.
- GÜLÇUBUK A, GÜREL A (2003). 1995-2000 Yillari Arasinda İstanbul'da Saptanan Köpek Tümörleri. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **29** (1): 83–91.
- HABASHY HO, RAKHA EA, ALESKANDARANY M, AHMED MA, GREEN AR, ELLIS IO, POWE DG (2011). FOXO3a nuclear localisation is associated with good prognosis in luminal-like breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **129** (1): 11–21. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1161-z>.
- HAMILTON JM (1974). Comparative Aspects of Mammary Tumors. *Advances in Cancer Research*, **1974**: 1-45 [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60051-2](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60051-2).
- HAN MR, ZHENG W, CAI Q, GAO YT, ZHENG Y, BOLLA MK, MICHAILIDOU K, DENNIS J, WANG Q, DUNNING AM, BRENNAN P, CHEN ST, CHOI JY, HARTMAN M, ITO H, LOPHATANANON A, MATSUO K, MIAO H, MUIR K, SANGRAJRANG S, SHEN CY, TEO SH, TSENG CC, WU AH, YIP CH, KANG D, XIANG YB, EASTON DF, SHU XO, LONG J (2017). Evaluating genetic variants associated with breast cancer risk in high and moderate-penetrance genes in Asians. *Carcinogenesis*, **38** (5): 511–518. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx010>.
- HANSEN RK, FUQUA S (1999). Breast Cancer. Cilt 1. Humana Press, Totowa, NJ. 20 ss. <https://doi.org/10.1007/978-1-59259-456-6>
- HARMAN RM, CURTIS TM, ARGYLE DJ, COONROD SA, VAN DE WALLE GR (2016). A Comparative

Study on the In Vitro Effects of the DNA Methyltransferase Inhibitor 5-Azacytidine (5-AzaC) in Breast/Mammary Cancer of Different Mammalian Species. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **21** (1–2): 51–66. <https://doi.org/10.1007/s10911-016-9350-y>.

HAUKE J, HORVATH J, GROSS E, GEHRIG A, HONISCH E, HACKMANN K, SCHMIDT G, ARNOLD N, FAUST U, SUTTER C, HENTSCHEL J, WANG-GOHRKE S, SMOGAVEC M, WEBER BHF, WEBER-LASSALLE N, WEBER-LASSALLE K, BORDE J, ERNST C, ALTMÜLLER J, VOLK AE, THIELE H, HÜBBEL V, NÜRNBERG P, KEUPP K, VERSMOLD B, POHL E, KUBISCH C, GRILL S, PAUL V, HEROLD N, LICHEY N, RHIEM K, DITSCH N, RUCKERT C, WAPPENSCHMIDT B, AUER B, RUMP A, NIEDERACHER D, HAAF T, RAMSER J, DWORNICZAK B, ENGEL C, MEINDL A, SCHMUTZLER RK, HAHNEN E (2018). Gene panel testing of 5589 BRCA1/2-negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Cancer Medicine*, **7** (4): 1349–1358. <https://doi.org/10.1002/cam4.1376>.

HAYASHI SI, YAMAGUCHI Y (2008). Estrogen signaling in cancer microenvironment and prediction of response to hormonal therapy. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **109** (3–5): 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.03.013>.

HE H, WANG D, YAO H, WEI Z, LAI Y, HU J, LIU X, WANG Y, ZHOU H, WANG N, LUO X-G, ZHANG T-C (2015). Transcriptional factors p300 and MRTF-A synergistically enhance the expression of migration-related genes in MCF-7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **467** (4): 813–820. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.060>.

HEEKE AL, XIU J, ELLIOTT A, KORN WM, LYNCE F, POHLMANN PR, ISAACS C, SWAIN SM, VIDAL G, SCHWARTZBERG LS, TAN AR (2020). Actionable co-alterations in breast tumors with pathogenic mutations in the homologous recombination DNA damage repair pathway. *Breast Cancer Research and Treatment*, **184** (2): 265–275. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05849-2>.

HEIKKINEN T, KÄRKKÄINEN H, AALTONEN K, MILNE RL, HEIKKILÄ P, AITTOMÄKI K, BLOMQVIST C, NEVANLINNA H (2009). The breast cancer susceptibility mutation PALB2 1592delT is associated with an aggressive tumor phenotype. *Clinical Cancer Research*, **15** (9): 3214–3222. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3128>.

HELLEBRAND H, SUTTER C, HONISCH E, GROSS E, WAPPENSCHMIDT B, SCHEM C, DEISSLER H, DITSCH N, GRESS V, KIECHLE M, BARTRAM CR, SCHMUTZLER RK, NIEDERACHER D, ARNOLD N, MEINDL A (2011). Germline mutations in the PALB2 gene are population specific and occur with low frequencies in familial breast cancer. *Human Mutation*, **32** (6): 2176–2188. <https://doi.org/10.1002/humu.21478>.

HENNECKE S, BECK J, BORNEMANN-KOLATZKI K, NEUMANN S, ESCOBAR HM, NOLTE I, HAMMER SC, HEWICKER-TRAUTWEIN M, JUNGINGER J, KAUP FJ, BRENIG B, SCHÜTZ E (2015). Prevalence of the prefoldin subunit 5 gene deletion in canine mammary tumors. *PLoS ONE*, **10** (7): 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131280>.

HER J, BUNTING SF (2018). How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, **293** (27): 10502–10511. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000371>.

- HILZ P, HEINRIHSONE R, PÄTZOLD LA, QI Q, TROFIMOVICS G, GAILITE L, IRMEJS A, GARDOVSKIS J, MIKLASEVICS E, DANEBERGA Z (2019). Allelic variants of breast cancer susceptibility genes PALB2 and RECQL in the Latvian population. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, **17** (1): 2–5. <https://doi.org/10.1186/s13053-019-0116-6>.
- HODGSON A, TURASHVILI G (2020). Pathology of Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*, **10**: 1–11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.531790>.
- HONG D, FRITZ AJ, FINSTAD KH, FITZGERALD MP, WEINHEIMER A, VIENS AL, RAMSEY J, STEIN JL, LIAN JB, STEIN GS (2018). Suppression of Breast Cancer Stem Cells and Tumor Growth by the RUNX1 Transcription Factor. *Molecular Cancer Research*, **16** (12): 1952–1964. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0135>.
- HONG D, MESSIER TL, TYE CE, DOBSON JR, FRITZ AJ, SIKORA KR, BROWNE G, STEIN JL, LIAN JB, STEIN GS (2017). Runx1 stabilizes the mammary epithelial cell phenotype and prevents epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget*, **8** (11): 17610–17627. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15381>.
- HOSEY AM, GORSKI JJ, MURRAY MM, QUINN JE, CHUNG WY, STEWART GE, JAMES CR, FARRAGHER SM, MULLIGAN JM, SCOTT AN, DERVAN PA, JOHNSTON PG, COUCH FJ, DALY PA, KAY E, MCCANN A, MULLAN PB, HARKIN DP (2007). Molecular basis for estrogen receptor α deficiency in BRCA1-linked breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **99** (22): 1683–1694. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm207>.
- HSU WL, HUANG YH, CHANG TJ, WONG ML, CHANG SC (2010). Single nucleotide variation in exon 11 of canine BRCA2 in healthy and cancerous mammary tissue. *Veterinary Journal*, **184** (3): 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.022>.
- HU C, POLLEY EC, YADAV S, LILYQUIST J, SHIMELIS H, NA J, HART SN, GOLDFAR DE, SHAH S, PESARAN T, DOLINSKY JS, LADUCA H, COUCH FJ (2020). The Contribution of Germline Predisposition Gene Mutations to Clinical Subtypes of Invasive Breast Cancer From a Clinical Genetic Testing Cohort. *Journal of the National Cancer Institute*, **112** (12): 1231–1241. <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa023>.
- HU H, MIAO YR, JIA LH, YU QY, ZHANG Q, GUO AY (2019). AnimalTFDB 3.0: A comprehensive resource for annotation and prediction of animal transcription factors. *Nucleic Acids Research*, **47** (D1): D33–D38. <https://doi.org/10.1093/nar/gky822>.
- HU X, XIANG D, XIE Y, TAO L, ZHANG Y, JIN Y, PINELLO L, WAN Y, YUAN GC, LI Z (2019). LSD1 suppresses invasion, migration and metastasis of luminal breast cancer cells via activation of GATA3 and repression of TRIM37 expression. *Oncogene*, **38** (44): 7017–7034. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0923-2>.
- HU Y, SUN H, DRAKE J, KITTRELL F, ABBA MC, DENG L, GADDIS S, SAHIN A, BAGGERLY K, MEDINA D, ALDAZ CM (2004). From Mice to Humans: Identification of Commonly Deregulated Genes in Mammary Cancer via Comparative SAGE Studies. *Cancer Research*, **64** (21): 7748–7755. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1827>.

- HU ZY, LIU L, XIE N, LU J, LIU Z, TANG Y, WANG Y, YANG J, OUYANG Q (2020). Germline PALB2 Mutations in Cancers and Its Distinction From Somatic PALB2 Mutations in Breast Cancers. *Frontiers in Genetics*, **11**: 1–8. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00829>.
- HUSSAIN S, SAXENA S, SHRIVASTAVA S, MOHANTY AK, KUMAR S, SINGH RJ, KUMAR A, WANI SA, GANDHAM RK, KUMAR N, SHARMA AK, TIWARI AK, SINGH RK (2018). Gene expression profiling of spontaneously occurring canine mammary tumours: Insight into gene networks and pathways linked to cancer pathogenesis. *PLoS ONE*, **13** (12): 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208656>.
- INOUE A, OMOTO Y, YAMAGUCHI Y, KIYAMA R, HAYASHI SI (2004). Transcription factor EGR3 is involved in the estrogen-signaling pathway in breast cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, **32** (3): 649–661. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0320649>.
- JAILLARDON L, ABADIE J, GODARD T, CAMPONE M, LOUSSOUARN D, SILIART B, NGUYEN F (2015). The dog as a naturally-occurring model for insulin-like growth factor type 1 receptor-overexpressing breast cancer: An observational cohort study. *BMC Cancer*, **15** (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1670-6>.
- JANES KA (2011). RUNX1 and its understudied role in breast cancer. *Cell Cycle*, **10** (20): 3461–3465. <https://doi.org/10.4161/cc.10.20.18029>.
- JARA L, MORALES S, DE MAYO T, GONZALEZ-HORMAZABAL P, CARRASCO V, GODOY R (2017). Mutations in BRCA1, BRCA2 and other breast and ovarian cancer susceptibility genes in Central and South American populations. *Biological Research*, **50**: 35. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0139-2>.
- JEONG SJ, LEE KH, NAM AR, CHO JY (2019). Genome-wide methylation profiling in canine mammary tumor reveals miRNA candidates associated with human breast cancer. *Cancers*, **11** (10): 1466. <https://doi.org/10.3390/cancers11101466>.
- JEONG YJ, OH HK, CHOI HR (2019). Methylation of the RELA Gene is Associated with Expression of NF- κ B1 in Response to TNF- α in Breast Cancer. *Molecules*, **24** (15): 2834. <https://doi.org/10.3390/molecules24152834>.
- JIAN W, SHAO K, QIN Q, WANG X, SONG S, WANG X (2017). Clinical and genetic characterization of hereditary breast cancer in a Chinese population. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, **15** (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13053-017-0079-4>.
- JIANG T, WANG Y, ZHOU F, GAO G, REN S, ZHOU C (2016). Prognostic value of high EZH2 expression in patients with different types of cancer: a systematic review with meta-analysis. *Oncotarget*, **7** (4): 4584–4597. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6612>.
- JIANG Y, WANG D, REN H, SHI Y, GAO Y (2018). Oncogenic HBXIP enhances ZEB1 through Sp1 to accelerate breast cancer growth. *Thoracic Cancer*, **9** (12): 1664–1670. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12878>.
- JIANG Y, ZOU L, LU W-Q, ZHANG Y, SHEN A-G (2013). Foxo3a Expression Is a Prognostic Marker in Breast Cancer. *PLoS ONE*, **8** (8): e70746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070746>.

- JIN W, CHEN Y, DI GH, MIRON P, HOU YF, GAO H, SHAO ZM (2008). Estrogen receptor (ER) β or p53 attenuates ER α -mediated transcriptional activation on the BRCA2 promoter. *Journal of Biological Chemistry*, **283** (44): 29671–29680. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802785200>.
- KABIR FML, ALVAREZ CE, BIRD RC (2016). Canine mammary carcinomas: A comparative analysis of altered gene expression. *Veterinary Sciences*, **3**: 1. <https://doi.org/10.3390/vetsci3010001>.
- KANAE Y, ENDOH D, YOKOTA H, TANIYAMA H, HAYASHI M (2006). Expression of the PTEN tumor suppressor gene in malignant mammary gland tumors of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **67** (1): 127–133. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.1.127>.
- KANEYASU T, MORI S, YAMAUCHI H, OHSUMI S, OHNO S, AOKI D, BABA S, KAWANO J, MIKI Y, MATSUMOTO N, NAGASAKI M, YOSHIDA R, AKASHI-TANAKA S, IWASE T, KITAGAWA D, MASUDA K, HIRASAWA A, ARAI M, TAKEI J, IDE Y, GOTOH O, YAGUCHI N, NISHI M, KANEKO K, MATSUYAMA Y, OKAWA M, SUZUKI M, NEZU A, YOKOYAMA S, AMINO S, INUZUKA M, NODA T, NAKAMURA S (2020). Prevalence of disease-causing genes in Japanese patients with BRCA1/2-wildtype hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *npj Breast Cancer*, **6** (1): 3–8. <https://doi.org/10.1038/s41523-020-0163-1>.
- KANZAKI H, CHATTERJEE A, HOSSEIN H, ZHANG X, CHUNG S, DENG N, RAMANUJAN VK, CUI X, GREENE MI, MURALI R (2021). Disabling the Nuclear Translocation of RelA/NF- κ B by a Small Molecule Inhibits Triple-Negative Breast Cancer Growth. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, **13**: 419–430. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S310231>.
- KARSLI-CEPPIOGLU S, DAGDEMIR A, JUDES G, LEBERT A, PENAULT-LLORCA F, BIGNON YJ, BERNARD-GALLON D (2017). The epigenetic landscape of promoter genome-wide analysis in breast cancer. *Scientific Reports*, **7** (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06790-z>.
- KASZAK I, RUSZCZAK A, KANAF A, KACPRZAK K, KRÓL M, JURKA P (2018). Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **60** (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0417-1>.
- KELLEY LA, MEZULIS S, YATES CM, WASS MN, STERNBERG MJ (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, **10** (6): 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015-053>.
- KELSEY JL, MOORE AS, GLICKMAN LT (1998). Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs. *Epidemiologic Reviews*, **20** (2): 204–217. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a017981>.
- KENNEDY KC, QUROLLO BA, ROSE BJ, THAMM DH (2011). Epidermal growth factor enhances the malignant phenotype in canine mammary carcinoma cell lines. *Veterinary and Comparative Oncology*, **9** (3): 196–206. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2010.00248.x>.
- KHAN S, ABDELRAHIM M, SAMUDIO I, SAFE S (2003). Estrogen receptor/Sp1 complexes are required for induction of cad gene expression by 17 β -estradiol in breast cancer cells. *Endocrinology*, **144** (6): 2325–2335. <https://doi.org/10.1210/en.2002-0149>.

- KHANNA C, LINDBLAD-TOH K, VAIL D, LONDON C, BERGMAN P, BARBER L, BREEN M, KITCHELL B, MCNEIL E, MODIANO JF, NIEMI S, COMSTOCK KE, OSTRANDER E, WESTMORELAND S, WITHROW S (2006). The dog as a cancer model. *Nature Biotechnology*, **24** (9): 1065–1066.
- KIM DW, GAZOURIAN L, QUADRI SA, RAPHAËLLE, SHERR DH, SONENSHEIN GE (2000). The RelA NF- κ B subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene*, **19** (48): 5498–5506. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203945>.
- KIM G-C, KWON H-K, LEE C-G, VERMA R, RUDRA D, KIM T, KANG K, NAM JH, KIM Y, IM S-H (2018). Upregulation of Ets1 expression by NFATc2 and NFKB1/RELA promotes breast cancer cell invasiveness. *Oncogenesis*, **7** (11): 91. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0101-3>.
- KIM JH, CHOI DH, CHO DY, AHN SH, SON BH, HAFETY BG (2010). PALB2 mutations 1592delT and 229delT are not present in Korean breast cancer patients negative for BRCA1 and BRCA2 mutations. *Breast Cancer Research and Treatment*, **122** (1): 303–306. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0806-2>.
- KIM K, BARHOUMI R, BURGHARDT R, SAFE S (2005). Analysis of estrogen receptor α -Sp1 interactions in breast cancer cells by fluorescence resonance energy transfer. *Molecular Endocrinology*, **19** (4): 843–854. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0326>.
- KIMCHI-SARFATY C, OH JM, KIM IW, SAUNA ZE, CALCAGNO AM, AMBUDKAR SV, GOTTESMAN MM (2007). A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, **315** (5811): 525–528. <https://doi.org/10.1126/science.1135308>.
- KLOPFLEISCH R, KLOSE P, WEISE C, BONDZIO A, MULTHAUP G, EINSPANIER R, GRUBER AD (2010a). Proteome of metastatic canine mammary carcinomas: Similarities to and differences from human breast cancer. *Journal of Proteome Research*, **9** (12): 6380–6391. <https://doi.org/10.1021/pr100671c>.
- KLOPFLEISCH R, LENZE D, HUMMEL M, GRUBER AD (2010b). Metastatic canine mammary carcinomas can be identified by a gene expression profile that partly overlaps with human breast cancer profiles. *BMC Cancer*, **10**: 618. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-618>.
- KLOPFLEISCH R, VON EULER H, SARLI G, PINHO SS, GÄRTNER F, GRUBER AD (2011). Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: News from an old disease. *Veterinary Pathology*, **48** (1): 98–116. <https://doi.org/10.1177/0300985810390826>.
- KLUG W, CUMMINGS MR, SPENCER CA, PALLADINO MA, KILLIAN DJ (2019). Concepts of Genetics. (12. baski). Pearson, New York, NY. 400–404 ss.
- KNAPPSKOG S, BJØRNSLETT M, MYKLEBUST LM, HUIJTS PEA, VREESWIJK MP, EDVARSEN H, GUO Y, ZHANG X, YANG M, YLISAUKKO-OJA SK, ALHOPURO P, AROLA J, TOLLENAAR RAEM, VAN ASPEREN CJ, SEYNAEVE C, STAALESEN V, CHRISANTHAR R, LØKKEVIK E, SALVESEN HB, EVANS DG, NEWMAN WG, LIN D, AALTONEN LA, BØRRESEN-DALE AL, TELL GS, STOLTENBERG C, ROMUNDSTAD P, HVEEM K, LILLEHAUG JR, VATTEN L, DEVILEE P, DØRUM A, LØNNING PE (2011). The MDM2 Promoter SNP285C/309G Haplotype Diminishes Sp1 Transcription Factor Binding and Reduces Risk for Breast and Ovarian Cancer in Caucasians. *Cancer Cell*, **19** (2): 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.019>.

- KOZAKOV D, GROVE LE, HALL DR, BOHNUUD T, MOTTARELLA SE, LUO L, XIA B, BEGLOV D, VAJDA S (2015). The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins. *Nature Protocols*, **10** (5): 733–755. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.043>.
- KOZOMARA A, BIRGAOANU M, GRIFFITHS-JONES S (2019). MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, **47** (D1): D155–D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>.
- KÖKÜSLÜ C, AKKAYAN C (1972). Ankara’da 1968-1972 Yılları Arasında İncelenen Kedi ve Köpeklerin Primer Meme Tümörleri. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, **19** (4): 502–516.
- KREJCI L, ALTMANNOVA V, SPIREK M, ZHAO X (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Research*, **40** (13): 5795–5818. <https://doi.org/10.1093/nar/gks270>.
- KULKARNI M, TAN TZ, SYED SULAIMAN NB, LAMAR JM, BANSAL P, CUI J, QIAO Y, ITO Y (2018). RUNX1 and RUNX3 protect against YAP-mediated EMT, stem-ness and shorter survival outcomes in breast cancer. *Oncotarget*, **9** (18): 14175–14192. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24419>.
- KUMAR P, HENIKOFF S, NG PC (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, **4** (7): 1073–1082. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>.
- KUMARAGURUPARAN R, PRATHIBA D, NAGINI S (2006a). Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Research in Veterinary Science*, **81** (2): 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.08.002>.
- KUMARAGURUPARAN R, KARUNAGARAN D, BALACHANDRAN C, MANOHAR BM, NAGINI S (2006b). Of humans and canines: A comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. *Clinica Chimica Acta*, **365** (1–2): 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.08.018>.
- KURIAN AW, WARD KC, HOWLADER N, DEAPEN D, HAMILTON AS, MARIOTTO A, MILLER D, PENBERTHY LS, KATZ SJ (2019). Genetic testing and results in a population-based cohort of breast cancer patients and ovarian cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, **37** (15): 1305–1315. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01854>.
- KUUSISTO KM, BEBEL A, VIHINEN M, SCHLEUTKER J, SALLINEN SL (2011). Screening for BRCA1, BRCA2, CHEK2, PALB2, BRIP1, RAD50, and CDH1 mutations in high-risk Finnish BRCA1/2-founder mutation-negative breast and/or ovarian cancer individuals. *Breast Cancer Research*, **13** (1): R20. <https://doi.org/10.1186/bcr2832>.
- KWAPIEN RP, GILES RC, GEIL RG, CASEY HW (1977). Basaloid adenomas of the mammary gland in beagle dogs administered investigational contraceptive steroids. *Journal of the National Cancer Institute*, **59** (3): 933–939. <https://doi.org/10.1093/jnci/59.3.933>.
- KWAPIEN RP, GILES RC, GEIL RG, CASEY HW (1980). Malignant mammary tumors in beagle dogs dosed with investigational oral contraceptive steroids. *Journal of the National Cancer Institute*, **65** (1): 137–144. <https://doi.org/10.1093/jnci/65.1.137>.

- KWONG A, CHEN JW, SHIN VY (2016). A new paradigm of genetic testing for hereditary breast/ovarian cancers. *Hong Kong Medical Journal*, **22** (2): 171–177. <https://doi.org/10.12809/hkmj154634>.
- KWONG A, SHIN VY, CHEN J, CHEUK IWY, HO CYS, AU CH, CHAN KKL, NGAN HYS, CHAN TL, FORD JM, MA ESK (2020). Germline Mutation in 1338 BRCA-Negative Chinese Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer Patients: Clinical Testing with a Multigene Test Panel. *Journal of Molecular Diagnostics*, **22** (4): 544–554. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.01.013>.
- LAN D, JIN X, LI M, HE L (2021). The expression and clinical significance of signal transducer and activator of transcription 3, tumor necrosis factor α induced protein 8-like 2, and runt-related transcription factor 1 in breast cancer patients. *Gland Surgery*, **10** (3): 1125–1134. <https://doi.org/10.21037/gs-21-108>.
- LAN F, YUE X, HAN L, SHI Z, YANG Y, PU P, YAO Z, KANG C (2011). Genome-wide identification of TCF7L2/TCF4 target miRNAs reveals a role for miR-21 in Wnt-driven epithelial cancer. *International Journal of Oncology*, **40** (2): 519–526. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1215>.
- LANDER ES, LINTON LM, BIRREN B, NUSBAUM C, ZODY MC, BALDWIN J, DEVON K, DEWAR K, DOYLE M, FITZHUGH W, FUNKE R, GAGE D, HARRIS K, HEAFORD A, HOWLAND J, KANN L, LEHOCZKY J, LEVINE R, MCEWAN P, MCKERNAN K, MELDRIM J, MESIROV JP, MIRANDA C, MORRIS W, NAYLOR J, RAYMOND C, ROSETTI M, SANTOS R, SHERIDAN A, SOUGNEZ C, STANGE-THOMANN N, STOJANOVIC N, SUBRAMANIAN A, WYMAN D, ROGERS J, SULSTON J, AINSCOUGH R, BECK S, BENTLEY D, BURTON J, CLEE C, CARTER N, COULSON A, DEADMAN R, DELOUKAS P, DUNHAM A, DUNHAM I, DURBIN R, FRENCH L, GRAFHAM D, GREGORY S, HUBBARD T, HUMPHRAY S, HUNT A, JONES M, LLOYD C, MCMURRAY A, MATTHEWS L, MERCER S, MILNE S, MULLIKIN JC, MUNGALL A, PLUMB R, ROSS M, SHOWNKEEN R, SIMS S, WATERSTON RH, WILSON RK, HILLIER LW, MCPHERSON JD, MARRA MA, MARDIS ER, FULTON LA, CHINWALLA AT, PEPIN KH, GISH WR, CHISSOE SL, WENDL MC, DELEHAUNTY KD, MINER TL, DELEHAUNTY A, KRAMER JB, COOK LL, FULTON RS, JOHNSON DL, MINX PJ, CLIFTON SW, HAWKINS T, BRANSCOMB E, PREDKI P, RICHARDSON P, WENNING S, SLEZAK T, DOGGETT N, CHENG JF, OLSEN A, LUCAS S, ELKIN C, UBERBACHER E, FRAZIER M, GIBBS RA, MUZNY DM, SCHERER SE, BOUCK JB, SODERGREN EJ, WORLEY KC, RIVES CM, GORRELL JH, METZKER ML, NAYLOR SL, KUCHERLAPATI RS, NELSON DL, WEINSTOCK GM, SAKAKI Y, FUJIYAMA A, HATTORI M, YADA T, TOYODA A, ITOH T, KAWAGOE C, WATANABE H, TOTOKI Y, TAYLOR T, WEISSENBAACH J, HEILIG R, SAURIN W, ARTIGUENAVE F, BROTTIER P, BRULS T, PELLETIER E, ROBERT C, WINCKER P, ROSENTHAL A, PLATZER M, NYAKATURA G, TAUDIEN S, RUMP A, SMITH DR, DOUCETTE-STAMM L, RUBENFIELD M, WEINSTOCK K, HONG ML, DUBOIS J, YANG H, YU J, WANG J, HUANG G, GU J, HOOD L, ROWEN L, MADAN A, QIN S, DAVIS RW, FEDERSPIEL NA, ABOLA AP, PROCTOR MJ, ROE BA, CHEN F, PAN H, RAMSER J, LEHRACH H, REINHARDT R, MCCOMBIE WR, DE LA BASTIDE M, DEDHIA N, BLÖCKER H, HORNISCHER K, NORDSIEK G, AGARWALA R, ARAVIND L, BAILEY JA, BATEMAN A, BATZOGLOU S, BIRNEY E, BORK P, BROWN DG, BURGE CB, CERUTTI L, CHEN HC, CHURCH D, CLAMP M, COPLEY RR, DOERKS T, EDDY SR, EICHLER EE, FUREY TS, GALAGAN J, GILBERT JGR, HARMON C, HAYASHIZAKI Y, HAUSSLER D, HERMJAKOB H, HOKAMP K, JANG W, JOHNSON LS, JONES TA, KASIF S, KASPRYZK A, KENNEDY S, KENT WJ, KITTS P, KOONIN EV, KORF I, KULP D, LANCET D, LOWE

- TM, MCLYSAGHT A, MIKKELSEN T, MORAN JV, MULDER N, POLLARA VJ, PONTING CP, SCHULER G, SCHULTZ J, SLATER G, SMIT AFA, STUPKA E, SZUSTAKOWKI J, THIERRY-MIEG D, THIERRY-MIEG J, WAGNER L, WALLIS J, WHEELER R, WILLIAMS A, WOLF YI, WOLFE KH, YANG SP, YEH RF, COLLINS F, GUYER MS, PETERSON J, FELSENFELD A, WETTERSTRAND KA, MYERS RM, SCHMUTZ J, DICKSON M, GRIMWOOD J, COX DR, OLSON MV, KAUL R, RAYMOND C, SHIMIZU N, KAWASAKI K, MINOSHIMA S, EVANS GA, ATHANASIOU M, SCHULTZ R, PATRINOS A, MORGAN MJ (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409** (6822): 860–921. <https://doi.org/10.1038/35057062>.
- LANG G-T, SHI J-X, HUANG L, CAO A-Y, ZHANG C-H, SONG C-G, ZHUANG Z-G, HU X, HUANG W, SHAO Z-M (2020). Multiple cancer susceptible genes sequencing in BRCA-negative breast cancer with high hereditary risk. *Annals of Translational Medicine*, **8** (21): 1417–1436. <https://doi.org/10.21037/atm-20-2999>.
- LANTINGA-VAN LEEUWEN IS, VAN GARDEREN E, RUTTEMAN GR, MOL JA (2000). Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: Co-localization with growth hormone in the mammary gland. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **75** (4–5): 219–228. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(00\)00173-4](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00173-4).
- LATTIMORE V, PARSONS MT, SPURDLE AB, PEARSON J, LEHNERT K, SULLIVAN J, LINTOTT C, BAWDEN S, MORRIN H, ROBINSON B, WALKER L (2021). Under-ascertainment of breast cancer susceptibility gene carriers in a cohort of New Zealand female breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, **185** (3): 583–590. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05986-8>.
- LEE CH, KWEON OK (2002). Mutations of p53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *Journal of veterinary science*, **3** (4): 321–325. <https://doi.org/10.4142/jvs.2002.3.4.321>.
- LEE CH, KIM WH, LIM JH, KANG MS, KIM DY, KWEON OK (2004). Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of veterinary science*, **5** (1): 63–69. <https://doi.org/10.4142/jvs.2004.5.1.63>.
- LEE JEA, LI N, ROWLEY SM, CHEASLEY D, ZETHOVEN M, MCINERNY S, GORRINGE KL, JAMES PA, CAMPBELL IG (2018). Molecular analysis of PALB2-associated breast cancers. *Journal of Pathology*, **245** (1): 53–60. <https://doi.org/10.1002/path.5055>.
- LEE KH, HWANG HJ, NOH HJ, SHIN TJ, CHO JY (2019). Somatic mutation of PIK3ca (H1047R) is a common driver mutation hotspot in canine mammary tumors as well as human breast cancers. *Cancers*, **11** (12):2006. <https://doi.org/10.3390/cancers11122006>.
- LEE ST, LI Z, WU Z, AAU M, GUAN P, KARUTURI RKM, LIOU YC, YU Q (2011). Context-Specific Regulation of NF- κ B Target Gene Expression by EZH2 in Breast Cancers. *Molecular Cell*, **43** (5): 798–810. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.011>.
- LEFEBVRE C, BACHELOT T, FILLERON T, PEDRERO M, CAMPONE M, SORIA JC, MASSARD C, LÉVY C, ARNEDOS M, LACROIX-TRIKI M, GARRABEY J, BOURSIN Y, DELOGER M, FU Y, COMMO F, SCOTT V, LACROIX L, DIECI MV, KAMAL M, DIÉRAS V, GONÇALVES A, FERRERRO JM,

- ROMIEU G, VANLEMMENS L, MOURET REYNIER MA, THÉRY JC, LE DU F, GUIU S, DALENC F, CLAPISSEON G, BONNEFOI H, JIMENEZ M, LE TOURNEAU C, ANDRÉ F (2016). Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis. *PLoS Medicine*, **13** (12): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002201>.
- LEREBOURS F, VACHER S, ANDRIEU C, ESPIE M, MARTY M, LIDEREAU R, BIECHE I (2008). NF-kappa B genes have a major role in Inflammatory Breast Cancer. *BMC Cancer*, **8** (1): 41. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-41>.
- LESPAGNARD L, KISS R, DANGUY A, LEGROS N, LENGLET G, DEVLEESCHOUWER N, PARIDAENS R (1987). In vitro studies of canine mammary tumors: Influence of 17-beta-estradiol and progesterone on cell kinetics parameters. *Oncology*, **44** (5): 292–301. <https://doi.org/10.1159/000226498>.
- LI A, GEYER FC, BLECUA P, LEE JY, SELENICA P, BROWN DN, PAREJA F, LEE SSK, KUMAR R, RIVERA B, BI R, PISCUOGLIO S, WEN HY, LOZADA JR, GULARTE-MÉRIDA R, CAVALLONE L, AGHMESHEH M, AMOR D, ANDREWS L, ANTILL Y, BALLEINE R, BEESLEY J, BLACKBURN A, BOGWITZ M, BROWN M, BURGESS M, BURKE J, BUTOW P, CALDON L, CAMPBELL I, CHRISTIAN A, CLARKE C, COHEN P, CROOK A, CUI J, CUMMINGS M, DAWSON SJ, DE FAZIO A, DELATYCKI M, DOBROVIC A, DUDDING T, DUIJF P, EDKINS E, EDWARDS S, FARSHID G, FELLOWS A, FIELD M, FLANAGAN J, FONG P, FORBES J, FORREST L, FOX S, FRENCH J, FRIEDLANDER M, ORTEGA DG, GATTAS M, GILES G, GILL G, GLEESON M, GREENING S, HAAN E, HARRIS M, HAYWARD N, HICKIE I, HOPPER J, HUNT C, JAMES P, JENKINS M, KEFFORD R, KENTWELL M, KIRK J, KOLLIAS J, LAKHANI S, LINDEMAN G, LIPTON L, LOBB L, LOK S, MACREA F, MANN G, MARSH D, MCLACHLAN SA, MEISER B, MILNE R, NIGHTINGALE S, O'CONNELL S, PACHTER N, PATTERSON B, PHILLIPS K, SALEH M, SALISBURY E, SAUNDERS C, SAUNUS J, SCOTT C, SCOTT R, SEXTON A, SHELLING A, SIMPSON P, SPIGELMAN A, SPURDLE M, STONE J, TAYLOR J, THORNE H, TRAINER A, TRENCH G, TUCKER K, VISVADER J, WALKER L, WALLIS M, WILLIAMS R, WINSHIP I, WU K, YOUNG MA, REZOUZ Z, NGUYEN-DUMONT T, PETERLONGO P, TONDINI C, TERKELSEN T, RØNLUND K, BOONEN SE, MANNERMA A, WINQVIST R, JANATOVA M, RAJADURAI P, XIA B, NORTON L, ROBSON ME, NG PS, LOOI LM, SOUTHEY MC, WEIGELT B, SOO-HWANG T, TISCHKOWITZ M, FOULKES WD, REIS-FILHO JS (2019). Homologous recombination DNA repair defects in PALB2-associated breast cancers. *npj Breast Cancer*, **5** (1): 23. <https://doi.org/10.1038/s41523-019-0115-9>.
- LI D, WANG T, YU Z, ZHANG Y, WU X, ZHENG N, ZHANG W, WU L (2021). MiR-519d-5p modulates the sensitivity of breast cancer to chemotherapy by forming a negative feedback loop with RELA. *Annals of Translational Medicine*, **9** (14): 1171. <https://doi.org/10.21037/atm-21-3241>.
- LI J, LI M, CHEN P, BA Q (2018). High expression of PALB2 predicts poor prognosis in patients with advanced breast cancer. *FEBS Open Bio*, **8** (1): 56–63. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12356>.
- LI J, MEEKS H, FENG BJ, HEALEY S, THORNE H, MAKUNIN I, ELLIS J, CAMPBELL I, SOUTHEY M, MITCHELL G, CLOUSTON D, KIRK J, GOLDFAR D, CHENEVIX-TRENCH G (2016). Targeted massively parallel sequencing of a panel of putative breast cancer susceptibility genes in a large cohort of multiple-case breast and ovarian cancer families. *Journal of Medical Genetics*, **53** (1): 34–42.

<https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103452>.

- LI L, GAO P, LI Y, SHEN Y, XIE J, SUN D, XUE A, ZHAO Z, XU Z, ZHANG M, LI B, JIANG J (2014). JMJD2A-dependent silencing of Sp1 in advanced breast cancer promotes metastasis by downregulation of DIRAS3. *Breast Cancer Research and Treatment*, **147** (3): 487–500. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3083-7>.
- LI Q, LI J, YU C, CHANG S, XIE L, WANG S (2021). Synonymous mutations that regulate translation speed might play a non-negligible role in liver cancer development. *BMC Cancer*, **21** (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08131-w>.
- LI WX, HE K, TANG L, DAI SX, LI GH, LV WW, GUO YC, AN SQ, WU GY, LIU D, HUANG JF (2017). Comprehensive tissue-specific gene set enrichment analysis and transcription factor analysis of breast cancer by integrating 14 gene expression datasets. *Oncotarget*, **8** (4): 6775–6786. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14286>.
- LIEBERMAN HB, HOPKINS KM (2010). Cell Cycle Control Edited by Methods to Induce Cell Cycle Checkpoints. Cilt 241. Humana Press, Totowa. 269–282 ss.
- LIM HY, IM KS, KIM NH, KIM HW, SHIN JI, SUR JH (2015). Obesity, expression of adipocytokines, and macrophage infiltration in canine mammary tumors. *Veterinary Journal*, **203** (3): 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.005>.
- LIM HY, IM KS, KIM NH, KIM HW, SHIN JI, YHEE JY, SUR JH (2015). Effects of Obesity and Obesity-Related Molecules on Canine Mammary Gland Tumors. *Veterinary Pathology*, **52** (6): 1045–1051. <https://doi.org/10.1177/0300985815579994>.
- LIU J, LIU Z, ZHOU Y, ZENG M, PAN S, LIU H, LIU Q, ZHU H (2021). Identification of a Novel Transcription Factor Prognostic Index for Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, **11**: 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.666505>.
- LIU Y, MAYO MW, NAGJI AS, SMITH PW, RAMSEY CS, LI D, JONES DR (2012). Phosphorylation of RelA/p65 promotes DNMT-1 recruitment to chromatin and represses transcription of the tumor metastasis suppressor gene BRMS1. *Oncogene*, **31** (9): 1143–1154. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.308>.
- LIU Y, CHEN T, GUO M, LI Y, ZHANG Q, TAN G, YU L, TAN Y (2021). FOXA2-Interacting FOXP2 Prevents Epithelial-Mesenchymal Transition of Breast Cancer Cells by Stimulating E-Cadherin and PHF2 Transcription. *Frontiers in Oncology*, **11**: 1–15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.605025>.
- LOLAS HAMAMEH S, RENBAUM P, KAMAL L, DWEIK D, SALAHAT M, JARAYSA T, ABU RAYYAN A, CASADEI S, MANDELL JB, GULSUNER S, LEE MK, WALSH T, KING M-C, LEVY-LAHAD E, KANAAN M (2017). Genomic analysis of inherited breast cancer among Palestinian women: Genetic heterogeneity and a founder mutation in TP53. *International Journal of Cancer*, **141** (4): 750–756. <https://doi.org/10.1002/ijc.30771>.
- LU H-M, LI S, BLACK MH, LEE S, HOINESS R, WU S, MU W, HUETHER R, CHEN J, SRIDHAR S, TIAN Y, MCFARLAND R, DOLINSKY J, TIPPIN DAVIS B, MEXAL S, DUNLOP C, ELLIOTT A (2019).

- Association of Breast and Ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing. *JAMA Oncology*, **5** (1): 51. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2956>.
- LU S, ARCHER MC (2010). Sp1 coordinately regulates de novo lipogenesis and proliferation in cancer cells. *International Journal of Cancer*, **126** (2): 416–425. <https://doi.org/10.1002/ijc.24761>.
- LU X, REDON CE, TANG W, PARVATHANENI S, BOKHARI B, DEBNATH S, LI XL, MUYS BR, SONG Y, PONGOR LS, SHEIKH O, GREEN AR, MADHUSUDAN S, LAL A, AMBS S, KHAN J, ALADJEM MI, SHARMA S (2021). Genome-Wide Analysis Unveils DNA Helicase RECQ1 as a Regulator of Estrogen Response Pathway in Breast Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, **41** (4): 1–21. <https://doi.org/10.1128/mcb.00515-20>.
- LU XP, HU GN, DU JQ, LI HQ (2015). TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. *Genetics and Molecular Research*, **14** (1): 2860–2867. <https://doi.org/10.4238/2015.March.31.16>.
- MA J, CAI H, WU T, SOBHIAN B, HUO Y, ALCIVAR A, MEHTA M, CHEUNG KL, GANESAN S, KONG A-NT, ZHANG DD, XIA B (2012). PALB2 Interacts with KEAP1 To Promote NRF2 Nuclear Accumulation and Function. *Molecular and Cellular Biology*, **32** (8): 1506–1517. <https://doi.org/10.1128/mcb.06271-11>.
- MACEWEN EG, PATNAIK AK, HARVEY HJ, PANKO WB (1982). Estrogen receptors in canine mammary tumors. *Cancer Research*, **42** (6): 2255–2259.
- MACVEAN DW, MONLUX AW, ANDERSON PS, SILBERG SL, ROSZEL JF (1978). Frequency of Canine and Feline Tumors in a Defined Population. *Veterinary Pathology*, **15** (6): 700–715. <https://doi.org/10.1177/030098587801500602>.
- MAGNANI L, LUPIEN M (2014). Chromatin and epigenetic determinants of estrogen receptor alpha (ESR1) signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **382** (1): 633–641. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.026>.
- MANAHAN ER, KUERER HM, SEBASTIAN M, HUGHES KS, BOUGHEY JC, EUHUS DM, BOOLBOL SK, TAYLOR WA (2019). Consensus Guidelines on Genetic Testing for Hereditary Breast Cancer from the American Society of Breast Surgeons. *Annals of Surgical Oncology*, **26** (10): 3025–3031. <https://doi.org/10.1245/s10434-019-07549-8>.
- MAOR S, PAPA MZ, YARDEN RI, FRIEDMAN E, LERENTHAL Y, LEE SW, MAYER D, WERNER H (2007). Insulin-like growth factor-I controls BRCA1 gene expression through activation of transcription factor Sp1. *Hormone and Metabolic Research*, **39** (3): 179–185. <https://doi.org/10.1055/s-2007-970415>.
- MAOR SB, ABRAMOVITCH S, ERDOS MR, BRODY LC, WERNER H (2000). BRCA1 suppresses insulin-like growth factor-I receptor promoter activity: Potential interaction between BRCA1 and Sp1. *Molecular Genetics and Metabolism*, **69** (2): 130–136. <https://doi.org/10.1006/mgme.1999.2958>.
- MAOR S, MAYER D, YARDEN RI, LEE AV, SARFSTEIN R, WERNER H, PAPA MZ (2006). Estrogen receptor regulates insulin-like growth factor-I receptor gene expression in breast tumor cells: Involvement of transcription factor Sp1. *Journal of Endocrinology*, **191** (3): 605–612. <https://doi.org/10.1677/joe.1.07016>.

- MAOR S, YOSEPOVICH A, PAPA MZ, YARDEN RI, MAYER D, FRIEDMAN E, WERNER H (2007). Elevated insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) levels in primary breast tumors associated with BRCA1 mutations. *Cancer Letters*, **257** (2): 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.07.019>.
- MARINI F, RAWAL CC, LIBERI G, PELLICCIOLI A (2019). Regulation of DNA Double Strand Breaks Processing: Focus on Barriers. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **6**: 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00055>.
- MAUÉS T, EL-JAICK KB, COSTA FB, ARAUJO GEF, SOARES MVG, MOREIRA AS, FERREIRA MLG, FERREIRA AMR (2018). Common germline haplotypes and genotypes identified in BRCA2 exon 11 of dogs with mammary tumours and histopathological analyses. *Veterinary and Comparative Oncology*, **16** (3): 379–384. <https://doi.org/10.1111/vco.12389>.
- MAVROGIANNIS AV, KOKKINOPOULOU I, KONTOS CK, SIDERIS DC (2018). Effect of Vinca Alkaloids on the Expression Levels of microRNAs Targeting Apoptosis-related Genes in Breast Cancer Cell Lines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **19** (13): 1076–1086. <https://doi.org/10.2174/1389201019666181112103204>.
- MAXWELL KN, WENZ BM, KULKARNI A, WUBBENHORST B, D'ANDREA K, WEATHERS B, GOODMAN N, VIJAI J, LILYQUIST J, HART SN, SLAVIN TP, SCHRADER KA, RAVICHANDRAN V, THOMAS T, HU C, ROBSON ME, PETERLONGO P, BONANNI B, FORD JM, GARBER JE, NEUHAUSEN SL, SHAH PD, BRADBURY AR, DEMICHELE AM, OFFIT K, WEITZEL JN, COUCH FJ, DOMCHEK SM, NATHANSON KL (2020). Mutation Rates in Cancer Susceptibility Genes in Patients With Breast Cancer With Multiple Primary Cancers. *JCO Precision Oncology*, (4): 916–925. <https://doi.org/10.1200/PO.19.00301>.
- MAYR B, REIFINGER M, ALTON K (1999). Novel Canine Tumour Suppressor Gene p53 Mutations in Cases of Skin and Mammary Neoplasms. *Veterinary Research Communications*, **23** (5): 285–291. <https://doi.org/10.1023/A:1006314903272>.
- MAZCKO C, THOMAS R (2015). The Establishment of the Pfizer-Canine Comparative Oncology and Genomics Consortium Biospecimen Repository. *Veterinary Sciences*, **2** (3): 127–130. <https://doi.org/10.3390/vetsci2030127>.
- MCINERNEY NM, MILLER N, ROWAN A, COLLERAN G, BARCLAY E, CURRAN C, KERIN MJ, TOMLINSON IP, SAWYER E (2010). Evaluation of variants in the CHEK2, BRIP1 and PALB2 genes in an Irish breast cancer cohort. *Breast Cancer Research and Treatment*, **121** (1): 203–210. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0540-9>.
- MCLAREN W, GIL L, HUNT SE, RIAT HS, RITCHIE GRS, THORMANN A, FLICEK P, CUNNINGHAM F (2016). The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology*, **17** (1): 122. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>.
- MERLO DF, ROSSI L, PELLEGRINO C, CEPPI M, CARDELLINO U, CAPURRO C, RATTO A, SAMBUCCO PL, SESTITO V, TANARA G, BOCCHINI V (2008). Cancer incidence in pet dogs: Findings of the animal tumor registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **22** (4): 976–984.

<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0133.x>.

MESTER J, REDEUILH G (2012). Proliferation of Breast Cancer Cells: Regulation, Mediators, Targets for Therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **8** (8): 872–885. <https://doi.org/10.2174/187152008786847747>.

MICHEL E, ROHRER BLEY C, KOWALEWSKI MP, FELDMANN SK, REICHLER IM (2014). Prolactin - to be reconsidered in canine mammary tumourigenesis? *Veterinary and Comparative Oncology*, **12** (2): 93–105. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2012.00337.x>.

MIKI Y, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D, FUTREAL PA, HARSHMAN K, TAVTIGIAN S, LIU Q, COCHRAN C, BENNETT LM, DING W, BELL R, ROSENTHAL J, HUSSEY C, TRAN T, MCCLURE M, FRYE C, HATTIER T, PHELPS R, HAUGEN-STRANO A, KATCHER H, YAKUMO K, GHOLAMI Z, SHAFFER D, STONE S, BAYER S, WRAY C, BOGDEN R, DAYANANTH P, WARD J, TONIN P, NAROD S, BRISTOW PK, NORRIS FH, HELVERING L, MORRISON P, ROSTECK P, LAI M, BARRETT JC, LEWIS C, NEUHAUSEN S, CANNON-ALBRIGHT L, GOLDFAR D, WISEMAN R, KAMB A, SKOLNICK MH (1994). Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer. *Science*, **266** (5182): 66-71. DOI: 10.1126/science.7545954.

MIN W, LIU X, LU Y, GONG Z, WANG M, LIN S, KANG H, JIN T, WANG X, MA X, LIU K, DAI C, ZHENG Y, LI S, MA Q, DAI Z (2016). Association of transcription factor 7-like 2 gene polymorphisms with breast cancer risk in northwest Chinese women. *Oncotarget*, **7** (47): 77175–77182. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12591>.

MISDORP W (1988). Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Veterinary Quarterly*, **10** (1): 26–33. <https://doi.org/10.1080/01652176.1988.9694142>.

MISDORP W (1996). Veterinary cancer epidemiology. *Veterinary Quarterly*, **18** (1): 32–36. <https://doi.org/10.1080/01652176.1996.9694610>.

MOHAMMED SI, MELONI GB, PINNA PARPAGLIA ML, MARRAS V, BURRAI GP, MELONI F, PIRINO S, ANTUOFERMO E (2011). Mammography and ultrasound imaging of preinvasive and invasive canine spontaneous mammary cancer and their similarities to human breast cancer. *Cancer Prevention Research*, **4** (11): 1790–1798. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0084>.

MOHR A, RIPOLI FL, HAMMER SC, WILLENBROCK S, HEWICKER-TRAUTWEIN M, KIEBOWICZ Z, ESCOBAR HM, NOLTE I (2016). Hormone receptor expression analyses in neoplastic and non-neoplastic canine mammary tissue by a bead based multiplex branched DNA assay: A gene expression study in fresh frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded samples. *PLoS ONE*, **11** (9): 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163311>.

MOL JA, VAN GARDEREN E, RUTTEMAN GR, RIJNBEEK A (1996). New Insights in the Molecular Mechanism of Progestin-induced Proliferation of Mammary Epithelium: Induction of the Local Biosynthesis of Growth Hormone (GH) in the Mammary Gland of Dogs, Cats and Humans. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **57** (1–2): 67–71. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(95\)00251-0](https://doi.org/10.1016/0960-0760(95)00251-0).

MOMOZAWA Y, IWASAKI Y, PARSONS MT, KAMATANI Y, TAKAHASHI A, TAMURA C, KATAGIRI

- T, YOSHIDA T, NAKAMURA S, SUGANO K, MIKI Y, HIRATA M, MATSUDA K, SPURDLE AB, KUBO M (2018). Germline pathogenic variants of 11 breast cancer genes in 7,051 Japanese patients and 11,241 controls. *Nature Communications*, **9** (1): 4–6. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06581-8>.
- MORADIAN MM, BABIKYAN DT, MARKARIAN S, PETROSYAN JG, AVANESIAN N, ARUTUNYAN T, SARKISIAN TF (2021). Germline mutational spectrum in Armenian breast cancer patients suspected of hereditary breast and ovarian cancer. *Human Genome Variation*, **8** (1): 9. <https://doi.org/10.1038/s41439-021-00140-2>.
- MOULTON JE, TAYLOR DON, DORN CR, ANDERSEN AC (1970). Canine Mammary Tumors. *Path vet.*, **7**: 289–320.
- MUNSON L, MORESCO A (2007). Comparative pathology of mammary gland cancers in domestic and wild animals. *Breast Disease*, **28**: 7–21. <https://doi.org/10.3233/BD-2007-28102>.
- MURAKAMI Y, TATEYAMA S, RUNGSIPIPAT A, UCHIDA K, YAMAGUCHI R (2000). Amplification of the Cyclin A Gene in Canine and Feline Mammary Tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*, **62** (7): 783–787. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.783>.
- MURPHY CG, MOYNAHAN ME (2010). BRCA Gene Structure and Function in Tumor Suppression. *The Cancer Journal*, **16** (1): 39–47. <https://doi.org/10.1097/ppo.0b013e3181cf0204>.
- MUTO T, WAKUI S, TAKAHASHI H, MAEKAWA S, MASAOKA T, USHIGOME S, FURUSATO M (2000). P53 Gene Mutations Occurring in Spontaneous Benign and Malignant Mammary Tumors of the Dog. *Veterinary Pathology*, **37** (3): 248–253. <https://doi.org/10.1354/vp.37-3-248>.
- NAIDU R, YIP CH, TAIB NAM (2012). Genetic variations in transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene: association of TCF7L2 rs12255372(G/T) or rs7903146(C/T) with breast cancer risk and clinico-pathological parameters. *Medical Oncology*, **29** (2): 411–417. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-9837-8>.
- NAM AR, LEE KH, HWANG HJ, SCHABORT JJ, AN JH, WON SH, CHO JY (2020). Alternative methylation of intron motifs is associated with cancer-related gene expression in both canine mammary tumor and human breast cancer. *Clinical Epigenetics*, **12** (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00888-4>.
- NAYYEF IA (2020). Relationship between silent mutations and quantitative trait loci genes in cattle: A review. *Plant Archives*, **20**: 854–857.
- NCBI (2021a). NM_024675.4. Erişim: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_024675.4?report=genbank]. Erişim Tarihi: [01.12.21].
- NCBI (2021b). PALB2 partner and localizer of BRCA2 [Canis lupus familiaris (dog)]. Erişim:[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/608527>]. Erişim tarihi:[12.03.21].
- NCBI (2021c). PALB2 partner and localizer of BRCA2 [Homo sapiens (human)]. Erişim: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_024675.4]. Erişim Tarihi: [12.03.21].
- NCBI (2021d). XM_011545948.2. Erişim: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_011545948]. Erişim Tarihi: [01.12.21].

- NELSON LW, CARLTON WW, WEIKEL JHJ (1972). Mammary Neoplasms and Progestogens. *JAMA*, **219** (12): 1601–1606.
- NEPOMUCENO TC, DE GREGORIIS G, DE OLIVEIRA FMB, SUAREZ-KURTZ G, MONTEIRO AN, CARVALHO MA (2017). The role of PALB2 in the DNA damage response and cancer predisposition. *International Journal of Molecular Sciences*, **18** (9): 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms18091886>.
- NEPOMUCENO TC, CARVALHO MA, RODRIGUE A, SIMARD J, MASSON JY, MONTEIRO ANA (2021). PALB2 Variants: Protein Domains and Cancer Susceptibility. *Trends in Cancer*, **7** (3): 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.10.002>.
- NERURKAR VR, SESHADRI R, MULHERKAR R, ISHWAD CS, LALITHA VS, NAIK SN (1987). Receptors for epidermal growth factor and estradiol in canine mammary tumors. *International Journal of Cancer*, **40** (2): 230–232. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910400218>.
- NGAN CH, HALL DR, ZERBE B, GROVE LE, KOZAKOV D, VAJDA S (2012). FtSite: High accuracy detection of ligand binding sites on unbound protein structures. *Bioinformatics*, **28** (2): 286–287. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr651>.
- NGUYEN F, PEÑA L, IBISCH C, LOUSSOUARN D, GAMA A, RIEDER N, BELOUSOV A, CAMPONE M, ABADIE J (2018). Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 1: Natural history and prognostic factors. *Breast Cancer Research and Treatment*, **167** (3): 635–648. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4548-2>.
- NOOREN IMA, THORNTON JM (2003). NEW EMBO MEMBER'S REVIEW: Diversity of protein-protein interactions. *The EMBO Journal*, **22** (14): 3486–3492. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg359>.
- NOVOSAD CA (2003). Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, **18** (2): 107–109. <https://doi.org/10.1053/svms.2003.36625>.
- NURMI A, MURANEN TA, PELTTARI LM, KIISKI JI, HEIKKINEN T, LEHTO S, KALLIONIEMI A, SCHLEUTKER J, BÜTZOW R, BLOMQVIST C, AITOMÄKI K, NEVANLINNA H (2019). Recurrent moderate-risk mutations in Finnish breast and ovarian cancer patients. *International Journal of Cancer*, **145** (10): 2692–2700. <https://doi.org/10.1002/ijc.32309>.
- O'BRIEN DJ, KANEENE JB, GETIS A, LLOYD JW, SWANSON GM, LEADER RW (2000). Spatial and temporal comparison of selected cancers in dogs and humans, Michigan, USA, 1964–1994. *Preventive Veterinary Medicine*, **47** (3): 187–204. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(00\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(00)00168-9).
- O'KANE GM, CONNOR AA, GALLINGER S (2017). Characterization, Detection, and Treatment Approaches for Homologous Recombination Deficiency in Cancer. *Trends in Molecular Medicine*, **23** (12): 1121–1137. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.10.007>.
- OBERMEIER K, SACHSENWEGER J, FRIEDL TWP, POSPIECH H, WINQVIST R, WIESMULLER L (2016). Heterozygous PALB2 c.1592delT mutation channels DNA double-strand break repair into error-prone pathways in breast cancer patients. *Oncogene*, **35** (29): 3796–3806. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.448>.

- OCHIAI K, YOSHIKAWA Y, OONUMA T, TOMIOKA Y, HASHIZUME K, MORIMATSU M (2011). Interactions between canine RAD51 and full length or truncated BRCA2 BRC repeats. *Veterinary Journal*, **190** (2): 293–295. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.11.001>.
- OCHIAI K, ISHIGURO-OONUMA T, YOSHIKAWA Y, UDAGAWA C, KATO Y, WATANABE M, BONKOBARA M, MORIMATSU M, OMI T (2015). Polymorphisms of canine BRCA2 BRC repeats affecting interaction with RAD51. *Biomedical Research (Japan)*, **36** (2): 155–158. <https://doi.org/10.2220/biomedres.36.155>.
- OCHIAI K, MORIMATSU M, TOMIZAWA N, SYUTO B (2001). Cloning and Sequencing Full Length of Canine Brca2 and Rad51 cDNA. *Journal of Veterinary Medical Science*, **63** (10): 1103–1108. <https://doi.org/10.1292/jvms.63.1103>.
- OLIVER AW, SWIFT S, LORD CJ, ASHWORTH A, PEARL LH (2009). Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Reports*, **10** (9): 990–996. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.126>.
- OLIVER J, QUEZADA URBAN R, FRANCO CORTÉS CA, DÍAZ VELÁSQUEZ CE, MONTEALEGRE PAEZ AL, PACHECO-OROZCO RA, CASTRO ROJAS C, GARCÍA-ROBLES R, LÓPEZ RIVERA JJ, GAITÁN CHAPARRO S, GÓMEZ AM, SUAREZ OBANDO F, GIRALDO G, MAYA MI, HURTADO-VILLA P, SANCHEZ AI, SERRANO N, ORDUZ GALVIS AI, ARUACHAN S, NUÑEZ CASTILLO J, FRECHA C, RIGGI C, JAUK F, GÓMEZ GARCÍA EM, CARRANZA CL, ZAMORA V, TORRES MEJÍA G, ROMIEU I, CASTAÑEDA CA, CASTILLO M, GITLER R, ANTONIANO A, ROJAS JIMÉNEZ E, ROMERO CRUZ LE, VALLEJO LECUONA F, DELGADO ENCISO I, MARTÍNEZ RIZO AB, FLORES CARRANZA A, BENITES GODINEZ V, MÉNDEZ CATALÁ CF, HERRERA LA, CHIRINO YI, TERRAZAS LI, PERDOMO S, VACA PANIAGUA F (2019). Latin American Study of Hereditary Breast and Ovarian Cancer LACAM: A Genomic Epidemiology Approach. *Frontiers in Oncology*, **9**: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01429>.
- ORCHARD S, AMMARI M, ARANDA B, BREUZA L, BRIGANTI L, BROACKES-CARTER F, CAMPBELL NH, CHAVALI G, CHEN C, DEL-TORO N, DUESBURY M, DUMOUSSEAU M, GALEOTA E, HINZ U, IANNUCELLI M, JAGANNATHAN S, JIMENEZ R, KHADAKE J, LAGREID A, LICATA L, LOVERING RC, MELDAL B, MELIDONI AN, MILAGROS M, PELUSO D, PERFETTO L, PORRAS P, RAGHUNATH A, RICARD-BLUM S, ROECHERT B, STUTZ A, TOGNOLLI M, VAN ROEY K, CESARENI G, HERMJAKOB H (2014). The MIntAct project—IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic Acids Research*, **42** (D1): D358–D363. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1115>.
- OSTRANDER EA, WAYNE RK (2005). The Canine Genome. *Genome Research*, **15**: 1706–1716. <https://doi.org/10.1101/gr.155900>.
- OZMEN O, KUL S, RISVANLI A, OZALP G, SABUNCU A, KUL O (2017a). Single nucleotide variations of the canine RAD51 domains, which directly binds PALB2 and BRCA2. *Japanese Journal of Veterinary Research*, **65** (2): 75–82. <https://doi.org/10.14943/jjvr.65.2.75>.
- OZMEN O, KUL S, RISVANLI A, OZALP G, SABUNCU A, KUL O (2017b). Somatic SNPs of the BRCA2 gene at the fragments encoding RAD51 binding sites of canine mammary tumors. *Veterinary and Comparative*

- Oncology*, **15** (4): 1479–1486. <https://doi.org/10.1111/vco.12293>.
- PAGANI F, RAPONI M, BARALLE FE (2005). Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102** (18): 6368–6372. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502288102>.
- PAGNINI U, FLORIO S, CRISPINO L, PAGNINI G, COLANGELO D, ROCCO D, PACILIO C, PACILIO M, MACALUSO M, GIORDANO A (2002). Direct effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on the growth of canine mammary tumour cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, **85** (3): 470–481. <https://doi.org/10.1002/jcb.10167>.
- PALMER JR, POLLEY EC, HU C, JOHN EM, HAIMAN C, HART SN, GAUDET M, PAL T, ANTON-CULVER H, TRENTAM-DIETZ A, BERNSTEIN L, AMBROSONE CB, BANDERA EV, BERTRAND KA, BETHEA TN, GAO C, GNANAOLIVU RD, HUANG H, LEE KY, LEMARCHAND L, NA J, SANDLER DP, SHAH PD, YADAV S, YANG W, WEITZEL JN, DOMCHEK SM, GOLDFAR DE, NATHANSON KL, KRAFT P, YAO S, COUCH FJ (2020). Contribution of Germline Predisposition Gene Mutations to Breast Cancer Risk in African American Women. *Journal of the National Cancer Institute*, **112** (12): 1213–1221. <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa040>.
- PAMUKÇU M, ERTÜRK E (1962). Ankara’ da köpeklerde görülen tümör çeşitleri. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, **9**: 1–9.
- PAPI L, PUTIGNANO AL, CONGREGATI C, PIACERI I, ZANNA I, SERA F, MORRONE D, GENUARDI M, PALLI D (2010). A PALB2 germline mutation associated with hereditary breast cancer in Italy. *Familial Cancer*, **9** (2): 181–185. <https://doi.org/10.1007/s10689-009-9295-z>.
- PARK J-Y, SINGH TR, NASSAR N, ZHANG F, FREUND M, HANENBERG H, MEETEI AR, ANDREASSEN PR (2014). Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene*, **33** (40): 4803–4812. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.421>.
- PARK JY, ZHANG F, ANDREASSEN PR (2014). PALB2: The hub of a network of tumor suppressors involved in DNA damage responses. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, **1846** (1): 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.06.003>.
- PARKER HG, KIM LV, SUTTER NB, CARLSON S, LORENTZET TD, MALEK TB, JOHNSON GS, DEFRAHCE HB, OSTRANDER EA, KRUGLYAK L (2004). Genetic Structure of the Purebred Domestic Dog. *Science*, **304** (5674): 1160–1164. <https://doi.org/10.1126/science.1097406>.
- PARKER HG, OSTRANDER EA (2005). Canine Genomics and Genetics: Running with the Pack. *PLoS Genetics*, **1** (5): e58. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010058>.
- PASTOR N, CABALLÉ NC, SANTELLA M, EZQUERRA LJ, TARAZONA R, DURAN E (2018). Epidemiological study of canine mammary tumors: age, breed, size and malignancy. *Austral journal of veterinary sciences*, **50**: 143-147. <https://doi.org/10.4067/S0719-81322018000300143>.
- PASTRANA L, JAUREGI P (2017). Basic Biochemistry. İçinde: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63668-3.00002-0>

- PATRONEK GJ, WATERS DJ, GLICKMAN LT (1997). Comparative Longevity of Pet Dogs and Humans: Implications for Gerontology Research. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, **52A** (3): B171–B178. <https://doi.org/10.1093/gerona/52A.3.B171>.
- PAUL MR, PAN T, PANT DK, SHIH NNC, CHEN Y, HARVEY KL, SOLOMON A, LIEBERMAN D, MORRISSETTE JJD, SOUCIER-ERNST D, GOODMAN NG, STAVROPOULOS SW, MAXWELL KN, CLARK C, BELKA GK, FELDMAN M, DEMICHELE A, CHODOSH LA (2020). Genomic landscape of metastatic breast cancer identifies preferentially dysregulated pathways and targets. *Journal of Clinical Investigation*, **140** (8): 4252–4265. <https://doi.org/10.1172/JCI129941>.
- PAUTY J, RODRIGUE A, COUTURIER A, BUISSON R, MASSON J-Y (2014). Exploring the roles of PALB2 at the crossroads of DNA repair and cancer. *Biochemical Journal*, **460** (3): 331–342. <https://doi.org/10.1042/BJ20140208>.
- PAUTY J, COUTURIER AM, RODRIGUE A, CARON MC, COULOMBE Y, DELLAIRE G, MASSON JY (2017). Cancer-causing mutations in the tumor suppressor PALB2 reveal a novel cancer mechanism using a hidden nuclear export signal in the WD40 repeat motif. *Nucleic Acids Research*, **45** (5): 2644–2657. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx011>.
- PEJAVER V, URRESTI J, LUGO-MARTINEZ J, PAGEL KA, LIN GN, NAM H-J, MORT M, COOPER DN, SEBAT J, IAKOUCHEVA LM, MOONEY SD, RADIVOJAC P (2020). Inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants with MutPred2. *Nature Communications*, **11** (1): 5918. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19669-x>.
- PEREIRA-VEIGA T, MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ M, ABUIN C, PIÑEIR R, CEBEY V, CUEVA J, PALACIOS P, BLANCO C, MUINELO-ROMAY L, ABALO A, COSTA C, LÓPEZ-LÓPEZ R (2019). CTCs expression profiling for advanced breast cancer monitoring. *Cancers*, **11** (12): 1–15. <https://doi.org/10.3390/cancers11121941>.
- PÉREZ ALENZA D, RUTTEMAN GR, PEÑA L, BEYNEN AC, CUESTA P (1998). Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. *Journal of veterinary internal medicine*, **12** (3): 132–139. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9595373>.
- PEREZ ALENZA MD, PENA L, DEL CASTILLO N, NIETO AI (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*, **41** (7): 287–291. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2000.tb03203.x>.
- PERILLO B, TRAMONTANO A, PEZONE A, MIGLIACCIO A (2020). LSD1: more than demethylation of histone lysine residues. *Experimental & Molecular Medicine*, **52** (12): 1936–1947. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00542-2>.
- PERIYASAMY S, AMMANAMANCHI S, TILLEKERATNE MPM, BRATTAIN MG (2000). Repression of transforming growth factor- β receptor type I promoter expression by Sp1 deficiency. *Oncogene*, **19** (40): 4660–4667. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203822>.
- PETERLONGO P, CATUCCI I, PASQUINI G, VERDERIO P, PEISSEL B, BARILE M, VARESCO L, RIBONI M, FORTUZZI S, MANOUKIAN S, RADICE P (2011). PALB2 germline mutations in familial breast

- cancer cases with personal and family history of pancreatic cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **126** (3): 825–828. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1305-1>.
- PETRIDIS C, ARORA I, SHAH V, MOSS CL, MERA A, CLIFFORD A, GILLET C, PINDER SE, TOMLINSON I, ROYLANCE R, SIMPSON MA, SAWYER EJ (2019a). Frequency of pathogenic germline variants in CDH1, BRCA2, CHEK2, PALB2, BRCA1, and TP53 in sporadic lobular breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **28** (7): 1162–1168. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-18-1102>.
- PETRIDIS C, ARORA I, SHAH V, MEGALIOS A, MOSS C, MERA A, CLIFFORD A, GILLET C, PINDER SE, TOMLINSON I, ROYLANCE R, SIMPSON MA, SAWYER EJ (2019b). Frequency of pathogenic germline variants in BRCA1, BRCA2, PALB2, CHEK2 and TP53 in ductal carcinoma in situ diagnosed in women under the age of 50 years. *Breast Cancer Research*, **21** (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1143-y>.
- PETZ LN, NARDULLI AM (2000). Sp1 binding sites and an estrogen response element half-site are involved in regulation of the human progesterone receptor A promoter. *Molecular Endocrinology*, **14** (7): 972–985. <https://doi.org/10.1210/mend.14.7.0493>.
- PETZ LN, ZIEGLER YS, SCHULTZ JR, KIM H, KEMPER JK, NARDULLI AM (2004). Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **88** (2): 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2003.11.008>.
- PHILIBERT JC, SNYDER PW, GLICKMAN N, GLICKMAN LT, KNAPP DW, WATERS DJ (2003). Influence of Host Factors on Survival in Dogs with Malignant Mammary Gland Tumors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **17**: 102-106. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2003\)017<0102:IOHFOS>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2003)017<0102:IOHFOS>2.3.CO;2).
- PIVA R, GAMBARI R (2002). Transcription factor decoy (TFD) in breast cancer research and treatment. *Technology in Cancer Research and Treatment*, **1**: 405–416. <https://doi.org/10.1177/153303460200100512>.
- PRAKASH R, ZHANG Y, FENG W, JASIN M (2015). Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2, and Associated Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **7** (4): a016600. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016600>.
- QIN C, SINGH P, SAFE S (1999). Transcriptional activation of insulin-like growth factor-binding protein-4 by 17 β -estradiol in MCF-7 cells: Role of estrogen receptor-sp1 complexes. *Endocrinology*, **140** (6): 2501–2508. <https://doi.org/10.1210/endo.140.6.6751>.
- QIU H, LIN D (2016). Roles of DNA mutation in the coding region and DNA methylation in the 5' flanking region of BRCA1 in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*, **78** (6): 943–949. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0557>.
- QIU HB, SUN WD, YANG X, JIANG QY, CHEN S, LIN DG (2015). Promoter mutation and reduced expression of BRCA1 in canine mammary tumors. *Research in Veterinary Science*, **103**: 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.10.003>.

- QUEIROGA FL, PÉREZ-ALENZA MD, GIL AG, SILVAN G, PEÑA L, ILLERA JC (2014). Clinical and prognostic implications of serum and tissue prolactin levels in canine mammary tumours. *Veterinary Record*, **175** (16): 403. <https://doi.org/10.1136/vr.102263>.
- QUEIROGA FL, PÉREZ-ALENZA MD, SILVAN G, PEÑA L, LOPES C, ILLERA JC (2005). Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **94** (1-3): 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.12.014>.
- QUEIROGA FL, PÉREZ-ALENZA D, SILVAN G, PEÑA L, ILLERA JC (2009). Positive correlation of steroid hormones and EGF in canine mammary cancer. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **115** (1–2): 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.01.018>.
- QUEIROGA FL, PÉREZ-ALENZA D, SILVAN G, PEÑA L, LOPES CS, ILLERA JC (2010). Serum and intratumoural GH and IGF-I concentrations: Prognostic factors in the outcome of canine mammary cancer. *Research in Veterinary Science*, **89** (3): 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.03.016>.
- QUEIROGA FL, PÉREZ-ALENZA MD, SILVAN G, PEÑA L, LOPES CS, ILLERA JC (2008). Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17 β -estradiol) in canine mammary tumours. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **110** (1–2): 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.02.005>.
- QUEIROGA FL, RAPOSO T, CARVALHO MI, PRADA J, PIRES I (2011). Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: Most recent findings. *In Vivo*, **25** (3): 455–465.
- RAHMAN N, SEAL S, THOMPSON D, KELLY P, RENWICK A, ELLIOTT A, REID S, SPANOVA K, BARFOOT R, CHAGTAI T, JAYATILAKE H, MCGUFFOG L, HANKS S, EVANS DG, ECCLES D, EASTON DF, STRATTON MR (2007). PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature Genetics*, **39** (2): 165–167. <https://doi.org/10.1038/ng1959>.
- RAMESH R, THEOPHILUS ANAND KUMAR C, BALACHANDRAN C, THANGAPANDIYAN M, SHAFIUZAMA M (2019). Incidence of Canine Mammary Tumours in Chennai. *Indian Veterinary Journal*, **96** (4): 49–52. URL: <https://krishikosh.egranth.ac.in/display/bitstream?handle=1/5810103464>.
- RANTAKARI P, NIKKILÄ J, JOKELA H, OLA R, PYLKÄS K, LAGERBOHM H, SAINIO K, POUTANEN M, WINQVIST R (2010). Inactivation of Palb2 gene leads to mesoderm differentiation defect and early embryonic lethality in mice. *Human Molecular Genetics*, **19** (15): 3021–3029. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq207>.
- RAPONI M, KRALOVICOVA J, COPSON E, DIVINA P, ECCLES D, JOHNSON P, BARALLE D, VORECHOVSKY I (2011). Prediction of single-nucleotide substitutions that result in exon skipping: Identification of a splicing silencer in BRCA1 exon 6. *Human Mutation*, **32** (4): 436–444. <https://doi.org/10.1002/humu.21458>.
- RAPOSO-FERREIRA TMM, BUENO RC, TERRA EM, AVANTE ML, TINUCCI-COSTA M, CARVALHO M, CASSALI GD, LINDE SD, ROGATTO SR, LAUFER-AMORIM R (2016). Downregulation of ATM Gene and Protein Expression in Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*, **53** (6): 1154–1159. <https://doi.org/10.1177/0300985816643367>.

- RASOTTO R, GOLDSCHMIDT MH, CASTAGNARO M, CARNIER P, CALIARI D, ZAPPULLI V (2014). The dog as a natural animal model for study of the mammary myoepithelial basal cell lineage and its role in mammary carcinogenesis. *Journal of Comparative Pathology*, **151** (2–3): 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.04.013>.
- RAUSCHER R, IGNATOVA Z (2018). Timing during translation matters: Synonymous mutations in human pathologies influence protein folding and function. *Biochemical Society Transactions*, **46** (4): 937–944. <https://doi.org/10.1042/BST20170422>.
- RAYNAUD JP, COTARD M, ANDRÉ F, MIALOT JP, ROLLAND PH, MARTIN PM (1981). Spontaneous canine mammary tumors: A model for human endocrine therapy? *Journal of Steroid Biochemistry*, **15** (C): 201–207. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(81\)90276-4](https://doi.org/10.1016/0022-4731(81)90276-4).
- RECOUVREUX MS, GRASSO EN, ECHEVERRIA PC, ROCHA-VIEGAS L, CASTILLA LH, SCHERE-LEVY C, TOCCI JM, KORDON EC, RUBINSTEIN N (2016). RUNX1 and FOXP3 interplay regulates expression of breast cancer related genes. *Oncotarget*, **7** (6): 6552–6565. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6771>.
- RESSEL L, FINOTELLO R, INNOCENTI VM, VANNOZZI I, POLI A (2012). Preliminary report on the expression of leptin and leptin receptor (ObR) in normal, hyperplastic and neoplastic canine mammary tissues. *Research in Veterinary Science*, **93** (1): 343–349. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.07.020>.
- RICCA A, BIROCCIO A, TRISCIUOGGIO D, CIPPITELLI M, ZUPI G, DEL BUFALO D (2001). relA over-expression reduces tumorigenicity and activates apoptosis in human cancer cells. *British Journal of Cancer*, **85** (12): 1914–1921. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.2174>.
- RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, BICK D, DAS S, GASTIER-FOSTER J, GRODY WW, HEGDE M, LYON E, SPECTOR E, VOELKERDING K, REHM HL (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, **17** (5): 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
- RINNERTHALER G, HACKL H, GAMPENRIEDER S, HAMACHER F, HUFNAGL C, HAUSER-KRONBERGER C, ZEHENTMAYR F, FASTNER G, SEDLMAYER F, MLINERITSCH B, GREIL R (2016). miR-16-5p Is a Stably-Expressed Housekeeping MicroRNA in Breast Cancer Tissues from Primary Tumors and from Metastatic Sites. *International Journal of Molecular Sciences*, **17** (2): 156. <https://doi.org/10.3390/ijms17020156>.
- RIPOLI FL, HAMMER SC, MOHR A, WILLENBROCK S, HEWICKER-TRAUTWEIN M, BRENIG B, ESCOBAR HM, NOLTE I (2016). Multiplex gene expression profiling of 16 target genes in neoplastic and non-neoplastic canine mammary tissues using branched-DNA assay. *International Journal of Molecular Sciences*, **17** (9): 1589. <https://doi.org/10.3390/ijms17091589>.
- RISMANCHI S, YADEGAR O, MUHAMMEDNEJAD S, AMANPOUR S, TAGHIZADEH-JAHED M, MUHAMMEDNEJAD A (2014). Expression of vimentin filaments in canine malignant mammary gland tumors: A simulation of clinicopathological features of human breast cancer. *Biomedical Reports*, **2** (5): 725–728. <https://doi.org/10.3892/br.2014.312>.

- RIVERA P, MELIN M, BIAGI T, FALL T, HÄGGSTRÖM J, LINDBLAD-TOH K, VON EULER H (2009). Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Research*, **69** (22): 8770–8774. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1725>.
- RIVERA P, VON EULER H (2011). Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Veterinary Pathology*, **48** (1): 132–146. <https://doi.org/10.1177/0300985810387939>.
- ROCHE DB, BUENAVISTA MT, MCGUFFIN LJ (2013). The FunFOLD2 server for the prediction of protein–ligand interactions. *Nucleic Acids Research*, **41** (W1): W303–W307. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt498>.
- RONOWICZ A, JANASZAK-JASIECKA A, SKOKOWSKI J, MADANECKI P, BARTOSZEWSKI R, BAŁUT M, SEROCZYŃSKA B, KOCHAN K, BOGDAN A, BUTKUS M, PEKSA R, RATAJSKA M, KUŹNIAK A, WASAG B, GUCWA M, KRZYZANOWSKI M, JAŚKIEWICZ J, JANKOWSKI Z, FORSBERG L, OCHOCKA JR, LIMON J, CROWLEY MR, BUCKLEY PG, MESSIAEN L, DUMANSKI JP, PIOTROWSKI A (2015). Concurrent DNA Copy-Number Alterations and Mutations in Genes Related to Maintenance of Genome Stability in Uninvolved Mammary Glandular Tissue from Breast Cancer Patients. *Human Mutation*, **36** (11): 1088–1099. <https://doi.org/10.1002/humu.22845>.
- ROSENTHAL ET, EVANS B, KIDD J, BROWN K, GORRINGE H, VAN ORMAN M, MANLEY S (2017). Increased Identification of Candidates for High-Risk Breast Cancer Screening Through Expanded Genetic Testing. *Journal of the American College of Radiology*, **14** (4): 561–568. <https://doi.org/10.1016/j.jacr.2016.10.003>.
- ROWE JJ, CHEAH AL, CALHOUN BC (2017). Lipomatous tumors of the breast: A contemporary review. *Seminars in Diagnostic Pathology*, **34** (5): 453–461. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2017.05.008>.
- ROY R, CHUN J, POWELL SN (2012). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature Reviews Cancer*, **12** (1): 68–78. <https://doi.org/10.1038/nrc3181>.
- ROZAS J, FERRER-MATA A, SÁNCHEZ-DELBARRIO JC, GUIRAO-RICO S, LIBRADO P, RAMOS-ONSINS S, SÁNCHEZ-GRACIA A (2019). *DnaSP*. 2019. Universitat de Barcelona, Barcelona. Erişim: [<http://www.ub.edu/dnasp/>].
- RUMMEL SK, LOVEJOY L, SHRIVER CD, ELLSWORTH RE (2017). Contribution of germline mutations in cancer predisposition genes to tumor etiology in young women diagnosed with invasive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **164** (3): 593–601. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4291-8>.
- RUNGSIPAT A, TATEYAMA S, YAMAGUCHI R, UCHIDA K, MURAKAMI Y, MIYOSHI N, HAYASHI T (1999). Amplification of the c-yes Oncogene in Canine Mammary Tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*, **61** (2): 185–189. <https://doi.org/10.1292/jvms.61.185>.
- RUTTEMAN GR (1990). Hormones and mammary tumour disease in the female dog: An update. *In Vivo*, **4** (1): 33–40.
- RUTTEMAN GR, WILLEKES-KOOLSCHIJN N, BEVERS MM, VAN DER GUGTEN AA, MISDORP W (1986). Prolactin binding in benign and malignant mammary tissue of female dogs. *Anticancer Research*, **6** (4): 829–835.

- RUTTEMAN GR, MISDORP W (1993). Hormonal background of canine and feline mammary tumours. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, **47**: 483–487.
- RYU JE, PARK HK, CHOI HJ, LEE HB, LEE HJ, LEE H, YU ES, SON WC (2018). Expression of the glutamine metabolism-related proteins glutaminase 1 and glutamate dehydrogenase in canine mammary tumours. *Veterinary and Comparative Oncology*, **16** (2): 239–245. <https://doi.org/10.1111/vco.12369>.
- SALAS Y, MÁRQUEZ A, DIAZ D, ROMERO L (2015). Epidemiological study of mammary tumors in female dogs diagnosed during the period 2002-2012: A growing animal health problem. *PLoS ONE*, **10** (5): e0127381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127381>.
- SALUJA PG, HAMILTON JM, GRONOW M (1973). Prolactin and breast cancer. İçinde: Proceedings of the British Association for Cancer Research 14th Annual General Meeting. 82 s.
- SALUJA PG, HAMILTON JM, GRONOW M, MISDORP W (1974). Pituitary prolactin levels in canine mammary cancer. *European Journal of Cancer*, **10**: 63–66. [https://doi.org/10.1016/0014-2964\(74\)90039-5](https://doi.org/10.1016/0014-2964(74)90039-5).
- SANCAR A, LINDSEY-BOLTZ LA, ÜNSAL-KAÇMAZ K, LINN S (2004). Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, **73** (1): 39–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>.
- SANOQUERA-MIRALLES L, VALENZUELA-PALOMO A, BUENO-MARTÍNEZ E, LLOVET P, DíEZ-GÓMEZ B, CALOCA MJ, PÉREZ-SEGURA P, FRAILE-BETHENCOURT E, COLMENA M, CARVALHO S, ALLEN J, EASTON DF, DEVILEE P, VREESWIJK MPG, DE LA HOYA M, VELASCO EA (2020). Comprehensive functional characterization and clinical interpretation of 20 splice-site variants of the rad51c gene. *Cancers*, **12** (12): 1–21. <https://doi.org/10.3390/cancers12123771>.
- SARGAN DR (2012). Genetics of Cancer in Dogs. İçinde: OSTRANDER E, RUVINSKY A (ed.) *The Genetics of the Dog*. (2nd baskı). CABI, London.
- SCARPITTA R, ZANNA I, ARETINI P, GAMBINO G, SCATENA C, MEI B, GHILLI M, ROSSETTI E, RONCELLA M, CONGREGATI C, BONCI F, NACCARATO AG, PALLI D, CALIGO MA (2019). Germline investigation in male breast cancer of DNA repair genes by next-generation sequencing. *Breast Cancer Research and Treatment*, **178** (3): 557–564. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05429-z>.
- SCHABORT JJ, NAM AR, LEE KH, KIM SW, LEE JE, CHO JY (2020). Ank2 hypermethylation in canine mammary tumors and human breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **21** (22): 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms21228697>.
- SCHAFER KA, KELLY G, SCHRADER R, GRIFFITH WC, MUGGENBURG BA, TIERNEY LA, LECHNER JF, JANOVITZ EB, HAHN FF (1998). A canine model of familial mammary gland neoplasia. *Veterinary Pathology*, **35** (3): 168-177. <https://doi.org/10.1177/030098589803500302>.
- SCHNEIDER R (1970). Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer*, **26** (2): 419–426.
- SCHNEIDER R, DORN CR, TAYLOR DON (1969). Factors influencing canine mammary cancer development

- and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute*, **43** (6): 1249–1261.
- SCHROEDER C, FAUST U, STURM M, HACKMANN K, GRUNDMANN K, HARMUTH F, BOSSE K, KEHRER M, BENKERT T, KLINK B, MACKENROTH L, BETCHEVA-KRAJCIR E, WIMBERGER P, KAST K, HEILIG M, NGUYEN HP, RIESS O, SCHRÖCK E, BAUER P, RUMP A (2015). HBOC multi-gene panel testing: comparison of two sequencing centers. *Breast Cancer Research and Treatment*, **152** (1): 129–136. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3429-9>.
- SCHULTZ JR, PETZ LN, NARDULLI AM (2003). Estrogen receptor α and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **201** (1–2): 165–175. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00415-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00415-X).
- SCOTT CM, JOO JHE, O'CALLAGHAN N, BUCHANAN DD, CLENDENNING M, GILES GG, HOPPER JL, WONG EM, SOUTHEY MC (2016). Methylation of breast cancer predisposition genes in early-onset breast cancer: Australian breast cancer family registry. *PLoS ONE*, **11** (11): 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165436>.
- SCOTT GK, DANIEL JC, XIONG X, MAKI RA, KABAT D, BENZ CC (1994). Binding of an ETS-related protein within the DNase I hypersensitive site of the HER2/neu promoter in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, **269** (31): 19848–19858. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32098-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32098-7).
- SCULLY R, PANDAY A, ELANGO R, WILLIS NA (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **20** (11): 698–714. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>.
- SEGALOFF A (1975). Steroids and carcinogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry*, **6** (3–4): 171–175. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(75\)90127-2](https://doi.org/10.1016/0022-4731(75)90127-2).
- SELMAN PJ, MOL JA, RUTTEMAN GR, VAN GARDEREN E (1994). Progesterin-Induced Growth Hormone Excess in the Dog Originates in the Mammary Gland. *Endocrinology*, **134** (1): 287–292.
- SELZER PM, MARHÖFEN RJ, KOCH O (2019). Uygulamalı Biyoinformatik. (2. baskı). PALME YAYINEVİ, ANKARA. 7–11 ss.
- SETHI S (2014). miRNAs and Target Genes in Breast Cancer Metastasis. (1. baskı). Springer International Publishing, Cham. 1–5 ss. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-08162-5>.
- SHAHI RB, DE BRAKELEER S, CALJON B, PAUWELS I, BONDUELLE M, JORIS S, FONTAINE C, VANHOEIJ M, VAN DOOREN S, TEUGELS E, DE GRÈVE J (2019). Identification of candidate cancer predisposing variants by performing whole-exome sequencing on index patients from BRCA1 and BRCA2-negative breast cancer families. *BMC Cancer*, **19** (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5494-7>.
- SHI H, LI Y, FENG G, LI L, FANG R, WANG Z, QU J, DING P, ZHANG X, YE L (2016). The oncoprotein HBXIP up-regulates FGF4 through activating transcriptional factor Sp1 to promote the migration of breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **471** (1): 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.174>.

- SHIMELIS H, LADUCA H, HU C, HART SN, NA J, THOMAS A, AKINHANMI M, MOORE RM, BRAUCH H, COX A, ECCLES DM, EWART-TOLAND A, FASCHING PA, FOSTIRA F, GARBER J, GODWIN AK, KONSTANTOPOULOU I, NEVANLINNA H, SHARMA P, YANNOUKAKOS D, YAO S, FENG BJ, DAVIS BT, LILYQUIST J, PESARAN T, GOLDBERG DE, POLLEY EC, DOLINSKY JS, COUCH FJ (2018). Triple-negative breast cancer risk genes identified by multigene hereditary cancer panel testing. *Journal of the National Cancer Institute*, **110** (8): 855–862. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy106>.
- SIAUD N, BARBERA MA, EGASHIRA A, LAM I, CHRIST N, SCHLACHER K, XIA B, JASIN M (2011). Plasticity of BRCA2 Function in Homologous Recombination: Genetic Interactions of the PALB2 and DNA Binding Domains. *PLoS Genetics*, **7** (12): e1002409. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002409>.
- SIEW JN, SU X, THOMSEN JS (2009). Surface plasmon resonance study of cooperative interactions of estrogen receptor α and transcriptional factor Sp1 with composite DNA elements. *Analytical Chemistry*, **81** (9): 3344–3349. <https://doi.org/10.1021/ac802543x>.
- SILVA FC, LISBOA BCG, FIGUEIREDO MCP, TORREZAN GT, SANTOS ÉMM, KREPISCHI AC, ROSSI BM, ACHATZ MI, CARRARO DM (2014). Hereditary breast and ovarian cancer: Assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. *BMC Medical Genetics*, **15** (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-15-55>.
- SILVESTRI V, RIZZOLO P, ZANNA I, FALCHETTI M, MASALA G, BIANCHI S, PAPI L, GIANNINI G, PALLI D, OTTINI L (2010). PALB2 mutations in male breast cancer: a population-based study in Central Italy. *Breast Cancer Research and Treatment*, **122** (1): 299–301. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0797-z>.
- SIMHADRI S, PETERSON S, PATEL DS, HUO Y, CAI H, BOWMAN-COLIN C, MILLER S, LUDWIG T, GANESAN S, BHAUMIK M, BUNTING SF, JASIN M, XIA B (2014). Male fertility defect associated with disrupted BRCA1-PALB2 interaction in mice. *Journal of Biological Chemistry*, **289** (35): 24617–24629. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.566141>.
- SIMON JA, LANGE CA (2008). Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **647** (1–2): 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.07.010>.
- SISCI D, MIDDEA E, MORELLI C, LANZINO M, AQUILA S, RIZZA P, CATALANO S, CASABURI I, MAGGIOLINI M, ANDÒ S (2010). 17 β -estradiol enhances $\alpha 5$ integrin subunit gene expression through ER α -Sp1 interaction and reduces cell motility and invasion of ER α -positive breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, **124** (1): 63–77. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0713-6>.
- SISCI D, MARIS P, CESARIO MG, ANSELMO W, CORONITI R, TROMBINO GE, ROMEO F, FERRARO A, LANZINO M, AQUILA S, MAGGIOLINI M, MAURO L, MORELLI C, ANDÒ S (2013). The estrogen receptor α is the key regulator of the bifunctional role of FoxO3a transcription factor in breast cancer motility and invasiveness. *Cell Cycle*, **12** (21): 3405–3420. <https://doi.org/10.4161/cc.26421>.
- SLAVIN TP, NIELL-SWILLER M, SOLOMON I, NEHORAY B, RYBAK C, BLAZER KR, WEITZEL JN (2015). Clinical application of multigene panels: Challenges of next-generation counseling and cancer risk

management. *Frontiers in Oncology*, **5**: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00208>.

SLAVIN TP, MAXWELL KN, LILYQUIST J, VIJAI J, NEUHAUSEN SL, HART SN, RAVICHANDRAN V, THOMAS T, MARIA A, VILLANO D, SCHRADER KA, MOORE R, HU C, WUBBENHORST B, WENZ BM, D'ANDREA K, ROBSON ME, PETERLONGO P, BONANNI B, FORD JM, GARBER JE, DOMCHEK SM, SZABO C, OFFIT K, NATHANSON KL, WEITZEL JN, COUCH FJ (2017). The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. *npj Breast Cancer*, **3**: 22. <https://doi.org/10.1038/s41523-017-0024-8>.

SLEECKX N, DE ROOSTER H, VELDHUIS KROEZE EJB, VAN GINNEKEN C, VAN BRANTEGEM L (2011). Canine mammary tumours, an Overview. *Reproduction in Domestic Animals*, **46** (6): 1112–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x>.

SLEECKX N, VAN BRANTEGEM L, VAN DEN EYNDEN G, FRANSEN E, CASTELEYN C, VAN CRUCHTEN S, VELDHUIS KROEZE E, VAN GINNEKEN C (2014). Angiogenesis in canine mammary tumours: A morphometric and prognostic study. *Journal of Comparative Pathology*, **150** (2–3): 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.09.005>.

SLUITER M, MEW S, VAN RENSBURG EJ (2009). PALB2 sequence variants in young South African breast cancer patients. *Familial Cancer*, **8** (4): 347–353. <https://doi.org/10.1007/s10689-009-9241-0>.

SONG Y, ZENG S, ZHENG G, CHEN D, LI P, YANG M, LUO K, YIN J, GU Y, ZHANG Z, JIA X, QIU N, HE Z, LI H, LIU H (2021). FOXO3a-driven miRNA signatures suppresses VEGF-A/NRP1 signaling and breast cancer metastasis. *Oncogene*, **40** (4): 777–790. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01562-y>.

SONNENSCHN E, GLICKMAN LT, GOLDSCHMIDT MH, MCKEE LJ (1991). Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: A case-control study. *American Journal of Epidemiology*, **133** (7): 694–703. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115944>.

SONTAS BH, OZYOGURTCU H, GUREL A, EKICI H (2009). Evaluation of clinical and pathological characteristics of 155 canines with mammary tumours: A retrospective study. *Archivos de Medicina Veterinaria*, **41**: 53–59. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2009000100007>.

SORENMO K (2003). Canine mammary gland tumors. *Vet Clin Small Anim*, **33** (3): 573–596.

SORENMO KU, SHOFR FS, GOLDSCHMIDT MH (2000). Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of veterinary internal medicine*, **14** (3): 266–270. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb01165.x>.

SORENMO KU, KRISTIANSEN VM, COFONE MA, SHOFR FS, BREEN AM, LANGELAND M, MONGIL CM, GRONDAHL AM, TEIGE J, GOLDSCHMIDT MH (2009). Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and Comparative Oncology*, **7** (3): 162–172. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2009.00184.x>.

SORENMO KU, DURHAM AC, RADAELLI E, KRISTIANSEN V, PEÑA L, GOLDSCHMIDT MH, STEFANOVSKI D (2019). The estrogen effect; Clinical and histopathological evidence of dichotomous influences in dogs with spontaneous mammary carcinomas. *PLoS ONE*, **14** (10): 1–24.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224504>.

- SOUTHEY MC, TEO ZL, DOWTY JG, ODEFREY FA, PARK DJ, TISCHKOWITZ M, SABBAGHIAN N, APICELLA C, BYRNES GB, WINSHIP I, BAGLIETTO L, GILES GG, GOLDFAR DE, FOULKES WD, HOPPER JL (2010). A PALB2 mutation associated with high risk of breast cancer. *Breast Cancer Research*, **12** (6): R109. <https://doi.org/10.1186/bcr2796>.
- SPOERRI M, GUSCETTI F, HARTNACK S, BOOS A, OEI C, BALOGH O, NOWACZYK RM, MICHEL E, REICHLER IM, KOWALEWSKI MP (2015). Endocrine control of canine mammary neoplasms: Serum reproductive hormone levels and tissue expression of steroid hormone, prolactin and growth hormone receptors. *BMC Veterinary Research*, **11** (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0546-y>.
- STICHT C, DE LA TORRE C, PARVEEN A, GRETZ N (2018). Mirwalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS ONE*, **13** (10): 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206239>.
- STIRNIMANN CU, PETSALAKI E, RUSSEL RB, MÜLLER CW (2010). WD40 proteins propel cellular networks. *Trends in Biochemical Sciences*, **35** (10): 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.003>.
- STOLNICU S, MOLDOVAN C, PODOLEANU C, GEORGESCU R (2015). Mesenchymal tumors and tumor-like lesions of the breast: A contemporary approach review. *Annales de Pathologie*, **35** (1): 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.annpat.2014.10.001>.
- STONER M, WORMKE M, SAVILLE B, SAMUDIO I, QIN C, ABDELRAHIM M, SAFE S (2004). Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor α and SP proteins. *Oncogene*, **23** (5): 1052–1063. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207201>.
- STOSSI F, MADAK-ERDOĞAN Z, KATZENELLENBOGEN BS (2012). Macrophage-elicited loss of estrogen receptor- α in breast cancer cells via involvement of MAPK and c-Jun at the ESR1 genomic locus. *Oncogene*, **31** (14): 1825–1834. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.370>.
- STRING CONSORTIUM 2020 (2020). STRING. Erişim:[<https://string-db.org/cgi/network?taskId=bxMC8CYHRC2I&sessionId=bVTBYjvm18iP>]. Erişim tarihi:[12.06.21].
- SUN Y, MCCORVIE TJ, YATES LA, ZHANG X (2020). Structural basis of homologous recombination. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **77** (1): 3–18. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03365-1>.
- SURDYKA M, SLASKA B (2017). Defect in ND2, COX2, ATP6 and COX3 mitochondrial genes as a risk factor for canine mammary tumour. *Veterinary and Comparative Oncology*, **15** (3): 1062–1072. <https://doi.org/10.1111/vco.12247>.
- SUSZYNSKA M, KLONOWSKA K, JASINSKA AJ, KOZLOWSKI P (2019). Large-scale meta-analysis of mutations identified in panels of breast/ovarian cancer-related genes - Providing evidence of cancer predisposition genes. *Gynecologic Oncology*, **153** (2): 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.01.027>.
- SUZUKI T, INOUE A, MIKI Y, MORIYA T, AKAHIRA JI, ISHIDA T, HIRAKAWA H, YAMAGUCHI Y,

- HAYASHI SI, SASANO H (2007). Early growth responsive gene 3 in human breast carcinoma: A regulator of estrogen-mediated invasion and a potent prognostic factor. *Endocrine-Related Cancer*, **14** (2): 279–292. <https://doi.org/10.1677/ERC-06-0005>.
- SY SMH, HUEN MSY, CHEN J (2009a). MRG15 is a novel PALB2-interacting factor involved in homologous recombination. *Journal of Biological Chemistry*, **284** (32): 21127–21131. <https://doi.org/10.1074/jbc.C109.023937>.
- SY SMH, HUEN MSY, CHEN J (2009b). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106** (17): 7155–7160. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811159106>.
- SY SMH, HUEN MSY, ZHU Y, CHEN J (2009). PALB2 Regulates Recombinational Repair through Chromatin Association and Oligomerization. *Journal of Biological Chemistry*, **284** (27): 18302–18310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016717>.
- SZKLARCZYK D, GABLE AL, LYON D, JUNGE A, WYDER S, HUERTA-CEPAS J, SIMONOVIC M, DONCHEVA NT, MORRIS JH, BORK P, JENSEN LJ, VON MERING C (2019). STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, **47** (D1): D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>.
- TAN J, YAN Y, WANG X, JIANG Y, XU HE (2014). EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, **35** (2): 161–174. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.161>.
- TANG X, HOU Y, YANG G, WANG X, TANG S, DU YE, YANG L, YU T, ZHANG H, ZHOU M, WEN S, XU L, LIU M (2016). Stromal miR-200s contribute to breast cancer cell invasion through CAF activation and ECM remodeling. *Cell Death and Differentiation*, **23** (1): 132–145. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.78>.
- TAVTIGIAN SV, CHENEVIX-TRENCH G (2014). Growing recognition of the role for rare missense substitutions in breast cancer susceptibility. *Biomarkers in Medicine*, **8** (4): 589–603. <https://doi.org/10.2217/bmm.13.143>.
- TEDALDI G, TEBALDI M, ZAMPIGA V, CANGINI I, PIRINI F, FERRACCI E, DANESI R, ARCANGELI V, RAVEGNANI M, MARTINELLI G, FALCINI F, ULIVI P, CALISTRI D (2020). Male Breast Cancer: Results of the Application of Multigene Panel Testing to an Italian Cohort of Patients. *Diagnostics*, **10** (5): 269. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10050269>.
- TEOH V, TASOULIS M-K, GUI G (2020). Contralateral Prophylactic Mastectomy in Women with Unilateral Breast Cancer Who Are Genetic Carriers, Have a Strong Family History or Are just Young at Presentation. *Cancers*, **12** (1): 140. <https://doi.org/10.3390/cancers12010140>.
- TESLI M, ATHANASIU L, MATTINGSDAL M, KÄHLER AK, GUSTAFSSON O, ANDREASSEN BK, WERGE T, HANSEN T, MORS O, MELLERUP E, KOEFOED P, JÖNSSON EG, AGARTZ I, MELLE I, MORKEN G, DJUROVIC S, ANDREASSEN OA (2010). Association analysis of PALB2 and BRCA2 in bipolar disorder and schizophrenia in a scandinavian case-control sample. *American Journal of Medical Genetics*, **153** (7): 1276–1282. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31098>.

- THE AMERICAN KENNEL CLUB (2021). How to Calculate Dog Years to Human Years. Erişim:[<https://www.akc.org/expert-advice/health/how-to-calculate-dog-years-to-human-years/>]. Erişim tarihi:[15.07.21].
- THE UNIPROT CONSORTIUM (2019). Uniprot. UniProtKB-J9NVL4 (J9NVL4_CANLF). Erişim:[<https://www.uniprot.org/uniprot/J9NVL4>]. Erişim tarihi:[16.12.19].
- THE UNIPROT CONSORTIUM (2021a). UniProt-Align. Erişim:[<https://www.uniprot.org/align/A2021042763E7E78CFC6242B71761763234FF46DC002CFDH>]. Erişim tarihi:[27.04.21].
- THE UNIPROT CONSORTIUM (2021b). UniProt-Align. Erişim:[<https://www.uniprot.org/align/A202104285C475328CEF75220C360D524E9D456CE00F3BE5>]. Erişim tarihi:[28.04.21].
- THE UNIPROT CONSORTIUM (2021c). Uniprot arama sonuçları. Erişim:[<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=PALB2+dog&sort=score>]. Erişim tarihi:[17.03.21].
- THE UNIPROT CONSORTIUM (2021d). UniProtKB-A0A5S9I5Z8. Erişim:[<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A5S9I5Z8>]. Erişim tarihi:[26.04.21].
- THE UNIPROT CONSORTIUM (2021e). UniProtKB-J9NVL4-A0A5S9I5Z8 Alignment. Erişim:[<https://www.uniprot.org/align/A20210426E5A08BB0B2D1C45B0C7BC3B55FD2655600E630P>]. Erişim tarihi:[26.04.21].
- THE UNIPROT CONSORTIUM (2021f). UniProtKB - J9NVL4 (J9NVL4_CANLF). Erişim:[https://www.uniprot.org/uniprot/J9NVL4#family_and_domains]. Erişim tarihi:[28.04.21].
- THE UNIPROT CONSORTIUM (2021g). UniProtKB - Q86YC2 (PALB2_HUMAN). Erişim:[<https://www.uniprot.org/uniprot/Q86YC2>]. Erişim tarihi:[28.04.21].
- THOMSON DW, BRACKEN CP, GOODALL GJ (2011). Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Research*, **39** (16): 6845–6853. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr330>.
- THURÓCZY J, REISVAAG GJK, PERGE E, TIBOLD A, SZILÁGYI J, BALOGH L (2007). Immunohistochemical Detection of Progesterone and Cellular Proliferation in Canine Mammary Tumours. *Journal of Comparative Pathology*, **137** (2–3): 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2007.05.005>.
- TISCHKOWITZ M, XIA B, SABBAGHIAN N, REIS-FILHO JS, HAMEL N, LI G, VAN BEERS EH, LI L, KHALIL T, QUENNEVILLE LA, OMEROGLU A, POLL A, LEPAGE P, WONG N, NEDERLOF PM, ASHWORTH A, TONIN PN, NAROD SA, LIVINGSTON DM, FOULKES WD (2007). Analysis of PALB2/FANCD1-associated breast cancer families. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104** (16): 6788–6793. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701724104>.
- TONINI T, D'ANDRILLI G, FUCITO A, GASPA L, BAGELLA L (2008). Importance of Ezh2 polycomb protein in tumorigenesis process interfering with the pathway of growth suppressive key elements. *Journal of Cellular Physiology*, **214** (2): 295–300. <https://doi.org/10.1002/jcp.21241>.

- TRENNER A, SARTORI AA (2019). Harnessing DNA Double-Strand Break Repair for Cancer Treatment. *Frontiers in Oncology*, **9**: 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01388>.
- TU WJ, MCCUAIG RD, TAN AHY, HARDY K, SEDDIKI N, ALI S, DAHLSTROM JE, BEAN EG, DUNN J, FORWOOD J, TSIMBALYUK S, SMITH K, YIP D, MALIK L, PRASANNA T, MILBURN P, RAO S (2020). Targeting Nuclear LSD1 to Reprogram Cancer Cells and Reinvigorate Exhausted T Cells via a Novel LSD1-EOMES Switch. *Frontiers in Immunology*, **11**: 1–23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01228>.
- TUNG N, BATTELLI C, ALLEN B, KALDATE R, BHATNAGAR S, BOWLES K, TIMMS K, GARBER JE, HEROLD C, ELLISEN L, KREJDOVSKY J, DELEONARDIS K, SEDGWICK K, SOLTIS K, ROA B, WENSTRUP RJ, HARTMAN AR (2015). Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. *Cancer*, **121** (1): 25–33. <https://doi.org/10.1002/cncr.29010>.
- TUNG N, LIN NU, KIDD J, ALLEN BA, SINGH N, WENSTRUP RJ, HARTMAN AR, WINER EP, GARBER JE (2016). Frequency of germline mutations in 25 cancer susceptibility genes in a sequential series of patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **34** (13): 1460–1468. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.65.0747>.
- TÜRKASLAN MT, BERAH T, ŞENÜVER A, YEŞİLDERE T (1983). 1977-1981 Yılları Arasında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesine Getirilen Dişi Köpeklerde Rastlanılan Meme Tümörü Olguları Üzerine Çalışmalar. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **9** (2): 11–20.
- UEMURA M, OCHIAI K, MORIMATSU M, MICHISHITA M, ONOZAWA E, AZAKAMI D, UNO Y, YOSHIKAWA Y, SASAKI T, WATANABE M, OMI T (2019). The canine RAD51 mutation leads to the attenuation of interaction with PALB2. *Veterinary and Comparative Oncology*, **2019**: 1–9. <https://doi.org/10.1111/vco.12542>.
- URBINA-JARA LK, ROJAS-MARTINEZ A, MARTINEZ-LEDESMA E, AGUILAR D, VILLARREAL-GARZA C, ORTIZ-LOPEZ R (2019). Landscape of germline mutations in dna repair genes for breast cancer in latin america: Opportunities for parp-like inhibitors and immunotherapy. *Genes*, **10** (10): 8–10. <https://doi.org/10.3390/genes10100786>.
- 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, LA MONICA N, DE RINALDIS E (2009). Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics*, **10**: 135. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-135>.
- VAN BRAGT MPA, HU X, XIE Y, LI Z (2014). RUNX1, a transcription factor mutated in breast cancer, controls the fate of ER-positive mammary luminal cells. *eLife*, **3**: 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.03881>.
- VAN GARDEREN E, DE WIT M, VOORHOUT WF, RUTTEMAN GR, MOL JA, NEDERBRAGT H, MISDORP W (1997). Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors: Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. *American Journal of Pathology*, **150** (3): 1037–1047.
- VAN GARDEREN E, VAN DER POEL HJA, SWENNENHUIS JF, WISSINK EHJ, RUTTEMAN GR,

- HELLMÉN E, MOL JA, SCHALKEN JA (1999). Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumors. *Endocrinology*, **140** (12): 5907–5914. <https://doi.org/10.1210/endo.140.12.7189>.
- VAN LAERE SJ, VAN DER AUWERA I, VAN DEN EYNDEN GG, ELST HJ, WEYLER J, HARRIS AL, VAN DAM P, VAN MARCK EA, VERMEULEN PB, DIRIX LY (2006). Nuclear Factor- κ B Signature of Inflammatory Breast Cancer by cDNA Microarray Validated by Quantitative Real-time Reverse Transcription-PCR, Immunohistochemistry, and Nuclear Factor- κ B DNA-Binding. *Clinical Cancer Research*, **12** (11): 3249–3256. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2800>.
- VAN OS JL, VAN LAAR PH, OLDENKAMP EP, VERSCHOOR JS (1981). Oestrus control and the incidence of mammary nodules in bitches, a clinical study with two progestogens. *Veterinary Quarterly*, **3** (1): 46–56. <https://doi.org/10.1080/01652176.1981.9693795>.
- VAN VEEN EM, EVANS DG, HARKNESS EF, BYERS HJ, ELLINGFORD JM, WOODWARD ER, BOWERS NL, WALLACE AJ, HOWELL SJ, HOWELL A, LALLOO F, NEWMAN WG, SMITH MJ (2021). Extended gene panel testing in lobular breast cancer. *Familial Cancer*, <https://doi.org/10.1007/s10689-021-00241-5>.
- VASCELLARI M, BAIONI E, RU G, CARMINATO A, MUTINELLI F (2009). Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. *BMC Veterinary Research*, **5**: 1–9. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-39>.
- VELDHOEN N, WATTERSON J, BRASH M, MILNER J (1999). Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. *British Journal of Cancer*, **81** (3): 409–415. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690709>.
- VILA C, LEONARD J (2012). Canid Phylogeny and Origin of the Domestic Dog. İçinde: OSTRANDER E, RUVINSKY A (ed.) *The Genetics of the Dog*. (2nd baskı). CABI, London.
- VÍTOR AC, HUERTAS P, LEGUBE G, DE ALMEIDA SF (2020). Studying DNA Double-Strand Break Repair: An Ever-Growing Toolbox. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **7**: 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00024>.
- VONHOLDT BM, POLLINGER JP, LOHMUELLER KE, HAN E, PARKER HG, QUIGNON P, DEGENHARDT JD, BOYKO AR, EARL DA, AUTON A, REYNOLDS A, BRYC K, BRISBIN A, KNOWLES JC, MOSHER DS, SPADY TC, ELKAHLOUN A, GEFFEN E, PILOT M, JEDRZEJEWSKI W, GRECO C, RANDI E, BANNASCH D, WILTON A, SHEARMAN J, MUSIANI M, CARGILL M, JONES PG, QIAN Z, HUANG W, DING ZL, ZHANG YP, BUSTAMANTE CD, OSTRANDER EA, NOVEMBRE J, WAYNE RK (2010). Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature*, **464** (7290): 898–902. <https://doi.org/10.1038/nature08837>.
- WALSH L, GALLAGHER WM, O'CONNOR DP, NÍ CHONGHAILE T (2016). Diagnostic and Therapeutic Implications of Histone Epigenetic Modulators in Breast Cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **16** (5): 541–551. <https://doi.org/10.1586/14737159.2016.1156534>.
- WALSH T, GULSUNER S, LEE MK, TROESTER MA, OLSHAN AF, EARP HS, PEROU CM, KING MC

- (2021). Inherited predisposition to breast cancer in the Carolina Breast Cancer Study. *npj Breast Cancer*, **7** (1): 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41523-020-00214-4>.
- WANG F, JIANG L, LI J, YU X, LI M, WU G, YU Z, ZHOU K, CHU H, ZHAI H (2015). Association between TCF7L2 polymorphisms and breast cancer susceptibility: A meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **8** (6): 9355–9361.
- WANG Q, LI J, YANG X, SUN H, GAO S, ZHU H, WU J, JIN W (2013). Nrf2 is associated with the regulation of basal transcription activity of the BRCA1 gene. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **45** (3): 179–187. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt001>.
- WANG X, HU B, SHEN H, ZHOU H, XUE X, CHEN Y, CHEN S, HAN Y, YUAN B, ZHAO H, ZHI Q, KUANG Y (2015). Clinical and prognostic relevance of EZH2 in breast cancer: A meta-analysis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **75**: 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.038>.
- WANG Y, MEN X, GU Y, WANG H, XU Z (2021). Haplotype analysis on correlation between transcription factor 7-like 2 gene polymorphism and breast cancer risk. *BMC Cancer*, **21** (1): 885. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08571-4>.
- WANG Y, YIN W, LIN Y, YIN K, ZHOU L, DU Y, YAN T, LU J (2018). Downregulated circulating microRNAs after surgery: potential noninvasive biomarkers for diagnosis and prognosis of early breast cancer. *Cell Death Discovery*, **4** (1): 87. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0089-7>.
- WANG Z, YANG B (2010). MicroRNA Expression Detection Methods. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. 38–53 ss. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-04928-6>
- WARNER MR (1977). Response of Beagle Mammary Dysplasias to Various Hormone Supplements in Vitro. *Cancer Research*, **37**: 2062–2067.
- WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, STUDER G, TAURIELLO G, GUMIENNY R, HEER FT, DE BEER TAP, REMPFER C, BORDOLI L, LEPORE R, SCHWEDE T (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, **46** (W1): W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
- WATERS DJ, WILDASIN K (2006). Cancer Clues from Pet Dogs. *Scientific American*, 95–101. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(55\)91252-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(55)91252-6).
- WATZINGER F, MAYR B, GAMERITH R, VETTER C (2001). Comparative analysis of ras proto-oncogene mutations in selected mammalian tumors. *Molecular Carcinogenesis*, **30** (4): 190–198. <https://doi.org/10.1002/mc.1027>.
- WEETH LP, FASCETTI AJ, KASS PH, SUTER SE, SANTOS AM, DELANEY SJ (2004). Prevalance of Obese Dogs in a Population of Dogs With Cancer. *JAVMA*, **68** (4): 389–398. <https://doi.org/10.2460/ajvr.68.4.389>.
- WEIKEL JHJ, NELSON LW (1977). Problems in evaluating chronic toxicity of contraceptive steroids in dogs. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **3** (1–2): 167–177. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/15287397709529556>.

- WEN P, XIAO P, XIA J (2016). DbDSM: A manually curated database for deleterious synonymous mutations. *Bioinformatics*, **32** (12): 1914–1916. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw086>.
- WIRTEBERGER M, TCHATCHOU S, HEMMINKI K, SCHMUTZHARD J, SUTTER C, SCHMUTZLER RK, MEINDL A, WAPPENSCHMIDT B, KIECHLE M, ARNOLD N, WEBER BHF, NIEDERACHER D, BARTRAM CR, BURWINKEL B (2006). Associations of genetic variants in the estrogen receptor coactivators PPARGC1A, PPARGC1B and EP300 with familial breast cancer. *Carcinogenesis*, **27** (11): 2201–2208. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl067>.
- WONG ESY, SHEKAR S, MET-DOMESTICI M, CHAN C, SZE M, YAP YS, ROZEN SG, TAN M-H, ANG P, NGEOW J, LEE ASG (2016). Inherited breast cancer predisposition in Asians: multigene panel testing outcomes from Singapore. *npj Genomic Medicine*, **1**: 15003. <https://doi.org/10.1038/npjgenmed.2015.3>.
- WONG MW, NORDFORS C, MOSSMAN D, PECENPETELOVSKA G, AVERY-KIEJDA KA, TALSETH-PALMER B, BOWDEN NA, SCOTT RJ (2011). BRIP1, PALB2, and RAD51C mutation analysis reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **127** (3): 853–859. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1443-0>.
- WOOSTER R, NEUHAUSEN SL, MANGION J, QUIRK Y, FORD D, COLLINS N, NGUYEN K, SEAL S, TRAN T, AVERILL D, FIELDS P, MARSHALL G, NAROD S, LENOIR GM, LYNCH H, FEUNTEUN J, DEVILEE P, CORNELISSE CJ, MENKO FH, DALY PA, ORMISTON W, MCMANUS R, PYE C, LEWIS CM, CANNON-ALBRIGHT LA, PETO J, PONDER BAJ, SKOLNICK MH, EASTON DF, GOLDFAR DE, STRATTON MR (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*, **265** (5181): 2088–2090. <https://doi.org/10.1126/science.8091231>.
- WRIGHT WD, SHAH SS, HEYER WD (2018). Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, **293** (27): 10524–10535. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000372>.
- XIA B, SHENG Q, NAKANISHI K, OHASHI A, WU J, CHRIST N, LIU X, JASIN M, COUCH FJ, LIVINGSTON DM (2006). Control of BRCA2 Cellular and Clinical Functions by a Nuclear Partner, PALB2. *Molecular Cell*, **22** (6): 719–729. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.022>.
- XIA B, DORSMAN JC, AMEZIANE N, DE VRIES Y, ROOIMANS MA, SHENG Q, PALS G, ERRAMI A, GLUCKMAN E, LLERA J, WANG W, LIVINGSTON DM, JOENJE H, DE WINTER JP (2007). Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nature Genetics*, **39** (2): 159–161. <https://doi.org/10.1038/ng1942>.
- XIE W, DUAN R, SAFE S (1999). Estrogen Induces Adenosine Deaminase Gene Expression in MCF-7 Human Breast Cancer Cells: Role of Estrogen Receptor-Sp1 Interactions. *Endocrinology*, **140** (1): 219–227. <https://doi.org/10.1210/en.140.1.219>.
- XIE Y, LI G, CHEN M, GUO X, TANG L, LUO X, WANG S, YI W, DAI L, WANG J (2018). Mutation screening of 10 cancer susceptibility genes in unselected breast cancer patients. *Clinical Genetics*, **93** (1): 41–51. <https://doi.org/10.1111/cge.13063>.
- XU C, MIN J (2011). Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein and Cell*, **2** (3): 202–214.

<https://doi.org/10.1007/s13238-011-1018-1>.

- YANG W, YING SU, CHENJIAN HOU, CHEN L, ZHOU D, KEHAN REN, ZHOU Z, ZHANG R, XIUPING LIU (2019). SETDB1 induces epithelial-mesenchymal transition in breast carcinoma by directly binding with Snail promoter. *Oncology Reports*, **41** (2): 1284–1292. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6871>.
- YAO KAK, CLIFFORD J, LI S, LADUCA H, HULICK P, GUTIERREZ S, BLACK MH (2020). Prevalence of germline pathogenic and likely pathogenic variants in patients with second breast cancers. *JNCI Cancer Spectrum*, **4** (6): 1–9. <https://doi.org/10.1093/JNCICS/PKAA094>.
- YING S (2006). *MicroRNA Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ. 267–275; 295–310; 313–319; 321–332 ss. <https://doi.org/10.1385/1597451231>
- YING S (2008). *Current Perspectives in microRNAs (miRNA)*. (1. baskı). Springer, Los Angeles, CA. 282–298 ss.
- YORDY J, KRAUS C, HAYWARD JJ, WHITE ME, SHANNON LM, CREEVY KE, PROMISLOW DEL, BOYKO AR (2020). Body size, inbreeding, and lifespan in domestic dogs. *Conservation Genetics*, **21** (1): 137–148. <https://doi.org/10.1007/s10592-019-01240-x>.
- YOSHIKAWA Y, MORIMATSU M, OCHIAI K, NAGANO M, YAMANE Y, TOMIZAWA N, SASAKI N, HASHIZUME K (2005). Analysis of genetic variations in the exon 27 region of the canine BRCA2 locus. *Journal of Veterinary Medical Science*, **67** (10): 1013–1017. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.1013>.
- YOSHIKAWA Y, MORIMATSU M, OCHIAI K, NAGANO M, TOMIOKA Y, SASAKI N, HASHIZUME K, IWANAGA T (2008). Novel variations and loss of heterozygosity of BRCA2 identified in a dog with mammary tumors. *AJVR*, **69** (10): 1323–1328.
- YOSHIKAWA Y, OCHIAI K, MORIMATSU M, SUZUKI Y, WADA S, TAODA T, IWAI S, CHIKAZAWA S, ORINO K, WATANABE K (2012). Effects of the Missense Mutations in Canine BRCA2 on BRC Repeat 3 Functions and Comparative Analyses between Canine and Human BRC Repeat 3. *PLoS ONE*, **7** (10): 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045833>.
- YOSHIKAWA Y, MORIMATSU M, OCHIAI K, ISHIGURO-OONUMA T, WADA S, ORINO K, WATANABE K (2015). Reduced canine BRCA2 expression levels in mammary gland tumors. *BMC Veterinary Research*, **11** (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0483-9>.
- YOUSEF M, ALLMER J (2014). *miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis*. Cilt 1107. Humana Press, Totowa, NJ. 233–241 ss. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-748-8>.
- YUE L, LI L, LIU F, HU N, ZHANG W, BAI X, LI Y, ZHANG Y, FU L, ZHANG X, YE L (2013). The oncoprotein HBXIP activates transcriptional coregulatory protein LMO4 via sp1 to promote proliferation of breast cancer cells. *Carcinogenesis*, **34** (4): 927–935. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs399>.
- ZAMANI-AHMADMAHMUDI M, NASSIRI SM, RAHBARGHAZI R (2014). Serological proteome analysis of dogs with breast cancer unveils common serum biomarkers with human counterparts. *Electrophoresis*, **35** (6): 901–910. <https://doi.org/10.1002/elps.201300461>.
- ZANTI M, LOIZIDOU MA, MICHAILEDIOU K, PIRPA P, MACHATTOU C, MARCOU Y, KYRIAKOU F,

- KAKOURI E, TANTELES GA, SPANOU E, SPYROU GM, KYRIACOU K, HADJISAVVAS A (2020). Ngs panel testing of triple-negative breast cancer patients in Cyprus: A study of BRCA-negative cases. *Cancers*, **12** (11): 1–11. <https://doi.org/10.3390/cancers12113140>.
- ZATLOUKAL J, LORENZOVÁ J, TICHÝ F, NEČAS A, KECOVÁ H, KOHOUT P (2005). Breed and age as risk factors for canine mammary tumours. *Acta Veterinaria Brno*, **74**: 103–109. <https://doi.org/10.2754/avb200574010103>.
- ZEIDLER M, KLEER CG (2006). The Polycomb group protein Enhancer of Zeste 2: its links to DNA repair and breast cancer. *Journal of Molecular Histology*, **37** (5–7): 219–223. <https://doi.org/10.1007/s10735-006-9042-9>.
- ZHANG F, FAN Q, REN K, ANDREASSEN PR (2009a). PALB2 Functionally Connects the Breast Cancer Susceptibility Proteins BRCA1 and BRCA2. *Molecular Cancer Research*, **7** (7): 1110–1118. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0123>.
- ZHANG F, MA J, WU J, YE L, CAI H, XIA B, YU X (2009b). PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response. *Current Biology*, **19** (6): 524–529. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.018>.
- ZHANG H, CAI K, WANG J, WANG X, CHENG K, SHI F, JIANG L, ZHANG Y, DOU J (2014). MiR-7, Inhibited Indirectly by LincRNA HOTAIR, Directly Inhibits SETDB1 and Reverses the EMT of Breast Cancer Stem Cells by Downregulating the STAT3 Pathway. *STEM CELLS*, **32** (11): 2858–2868. <https://doi.org/10.1002/stem.1795>.
- ZHANG M, TANG M, FANG Y, CUI H, CHEN S, LI J, XIONG H, LU J, GU D, ZHANG B (2018). Cumulative evidence for relationships between multiple variants in the VTI1A and TCF7L2 genes and cancer incidence. *International Journal of Cancer*, **142** (3): 498–513. <https://doi.org/10.1002/ijc.31074>.
- ZHANG S, WANG Y, WANG Y, PENG J, YUAN C, ZHOU L, XU S, LIN Y, DU Y, YANG F, ZHANG J, DAI H, YIN W, LU J (2020). Serum miR-222-3p as a Double-Edged Sword in Predicting Efficacy and Trastuzumab-Induced Cardiotoxicity for HER2-Positive Breast Cancer Patients Receiving Neoadjuvant Target Therapy. *Frontiers in Oncology*, **10**: 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00631>.
- ZHANG X, HE Q, SUN L, ZHANG Y, QIN S, FAN J, WANG J (2019). Comparing MicroRNA Profilings of Purified HER-2-Negative and HER-2-Positive Cells Validates miR-362-5p/Sema3A as Characteristic Molecular Change in Triple-Negative Breast Cancers. *Disease Markers*, **2019**: 1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/6057280>.
- ZHANG Y, ZHAO Y, LI L, SHEN Y, CAI X, ZHANG X, YE L (2013). The oncoprotein HBXIP upregulates PDGFB via activating transcription factor Sp1 to promote the proliferation of breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **434** (2): 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.02.123>.
- ZHAO W, WIESE C, KWON Y, HROMAS R, SUNG P (2019). The BRCA Tumor Suppressor Network in Chromosome Damage Repair by Homologous Recombination. *Annual Review of Biochemistry*, **88** (1): 221–245. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111058>.

- ZHAO Y, YAO D, LI Y, ZHANG S, TAO Z, ZHANG L, HU X, WANG B, CHEN S (2021). Loss of polarity protein Par3 is mediated by transcription factor Sp1 in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **561**: 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.05.025>.
- ZHENG Y, WALSH T, GULSUNER S, CASADEI S, LEE MK, OGUNDIRAN TO, ADEMOLA A, FALUSI AG, ADEBAMOWO CA, OLUWASOLA AO, ADEOYE A, ODETUNDE A, BABALOLA CP, OJENGBEDE OA, ODEDINA S, ANETOR I, WANG S, HUO D, YOSHIMATSU TF, ZHANG J, FELIX GES, KING MC, OLOPADE OI (2018). Inherited breast cancer in Nigerian women. *Journal of Clinical Oncology*, **36** (28): 2820–2825. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.3977>.
- ZHENG Y, ZENG Y, QIU R, LIU R, HUANG W, HOU Y, WANG S, LENG S, FENG D, YANG Y, WANG Y (2018). The Homeotic Protein SIX3 Suppresses Carcinogenesis and Metastasis through Recruiting the LSD1/NuRD(MTA3) Complex. *Theranostics*, **8** (4): 972–989. <https://doi.org/10.7150/thno.22328>.
- ZHOU J, WANG H, FU F, LI Z, FENG Q, WU W, LIU Y, WANG C CHEN Y (2020). Spectrum of PALB2 germline mutations and characteristics of PALB2-related breast cancer: Screening of 16,501 unselected patients with breast cancer and 5890 controls by next-generation sequencing. *Cancer*, **126** (14): 3202–3208. <https://doi.org/10.1002/cncr.32905>.
- ZOU Y, TSAI WB, CHENG CJ, HSU C, CHUNG YM, LI PC, LIN SH, HU MCT (2008). Forkhead box transcription factor FOXO3a suppresses estrogen-dependent breast cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Breast Cancer Research*, **10** (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/bcr1872>.