

← Adınızı soyadınızı giriniz

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



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

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**MEME KANSERLİ HASTALARDA ABCG2 GEN
POLİMORFİZMLERİ VE SERUM DÜZEYİNİN
İNCELENMESİ**

YEMLİHA YILDIZ

**DANIŞMAN
PROF. DR. H. ARZU ERGEN**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü MOLEKÜLER TIP Anabilim Dalı DOKTORA Programında YEMLİHA YILDIZ tarafından hazırlanan MEME KANSERLİ HASTALARDA ABCG2 GEN POLİMORFİZMLERİ VE SERUM DÜZEYİNİN İNCELENMESİ başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

10 / 03 / 2015

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

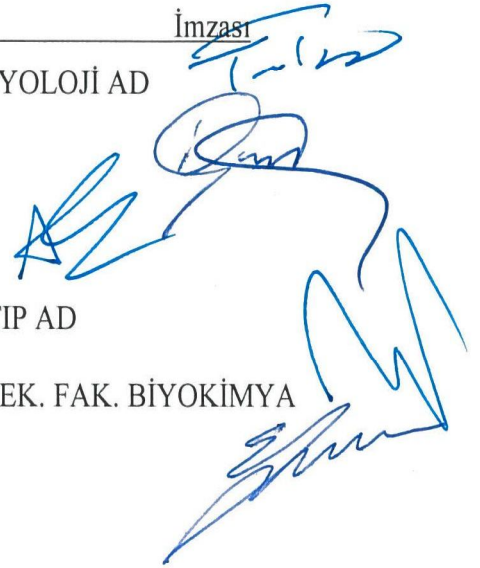
1.PROF.DR.TURGAY İSBİR, YEDİTEPE UNV. TIP FAK. TIBBİ BİYOLOJİ AD

2.PROF.DR.İLHAN YAYLIM, İ.Ü. DETAE MOLEKÜLER TIP AD

3.PROF.DR.H.ARZU ERGEN, İ.Ü. DETAE MOLEKÜLER TIP AD

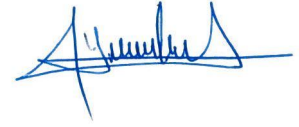
4.PROF.DR.BEDİA ÇAKMAKOĞLU, İ.Ü. DETAE MOLEKÜLER TIP AD

5.DOÇ.DR.EBRU EMEKLİ ALTURFAN, MARMARA ÜNV. DIŞ HEK. FAK. BİYOKİMYA AD



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

YEMLİHA YILDIZ

ITHAF

Tezimi sevgili babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Moleküler Tıp Anabilim Dalı kurucusu, emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Turgay İsbir'e

DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım'a,

Doktora eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, tezim süresince yardım ve desteklerini benden esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. H. Arzu Ergen'e,

Tezim için gerekli hasta örneklerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi doçenti Doç. Dr. Soykan Arıkan'a,

Yine tezim süresince yardımlarını benden esirgemeyen İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi doçenti Doç. Dr. Gülbu Işırtmagil'e

Tez çalışmam süresince yardımlarından ve desteklerinden ötürü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda görevli değerli hocalarıma,

Tez çalışmamın laboratuvar çalışmaları ve tezle ilgili diğer çalışmalarda gösterdikleri destekten dolayı başta Msc. Saime Turan ve Msc. Fatih Seyhan olmak üzere tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı çalışanlarına ve arkadaşlarıma,

Hiçbir zaman desteğini ve sevgisini benden esirgemeyen sevgili eşim Seyhan Yıldız ve değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:13448

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. MEME KANSERİ	2
2.1.1. Görölme Sıklığı.....	2
2.1.2. Meme Kanseri Sınıflaması	3
2.1.2.1. İnvaziv Meme Kanseri	4
2.1.2.2. İnvaziv Olmayan (İn situ Karsinom) Meme Kanseri.....	5
2.1.3. Meme Kanserinde Prognostik Etmenler	5
2.1.3.1. Histolojik Derecelendirme.....	5
2.1.4. Meme Kanserinde Güncel TNM Evrelemesi	6
2.1.5. Meme Kanserinde Risk Faktörleri	10
2.1.5.1. Cinsiyet.....	10
2.1.5.2. Yaş.....	10
2.1.5.3. Coğrafik Varyasyon	10
2.1.5.4. Menarş ve Menapoz Yaşı	10
2.1.5.5. İlk Gebelik Yaşı	11
2.1.5.6. Aile Hikayesi	11
2.1.5.7. Önceki Benign Meme Lezyonları	11
2.1.5.8. Radyasyon	12
2.1.5.9. Diyet	12

2.1.5.10. Kilo	12
2.1.5.11. Alkol Kullanımı	13
2.1.5.12. Sigara.....	13
2.1.6. Meme Kanseri Moleküler Biyolojisi ve Genetiği.....	13
2.1.6.1.Meme Kanseri ve Onkogenler	14
2.1.6.2. Meme Kanseri ve Tümör Baskılayıcı Genler	15
2.2. ABC (ATP-Binding Cassette, ATP-Bağlı Kaset) TRANSPORTER GEN AİLESİ	16
2.3. ABCG TRANSPORTER GEN AİLESİ	20
2.4. ABCG2 (BCRP, BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN, MEME KANSERİ DİRENÇ PROTEİNİ) GENİ.....	21
2.4.1. ABCG2 Gen Polimorfizmleri.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI	26
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	26
3.3. KULLANILAN GEREÇLER	27
3.4. ÇÖZELTİLER.....	27
3.4.1. AGAROS ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER	27
3.4.1.1. 0,5 M Disodyumetilendiamintetraasetat (EDTA) (pH 8.0).....	27
3.4.1.2. 1 M Tris Tamponu (Stok).....	27
3.4.1.3. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X)	27
3.4.1.4. Etidyum Bromür (10 mg/ml)	28
3.4.1.5. Yükleme Tamponu (Loading Buffer : 6X).....	28
3.4.1.6. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE).....	28
3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER	28
3.5.1. Periferik Kandan Serum Ayrılması.....	28
3.5.2. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	28
3.5.2.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kit İçeriği ve Hazırlık Aşaması.....	28
3.5.2.2. Kan Örneklerinden Lizat Hazırlanması.....	29
3.5.2.3. DNA'ya Bağlanma	29
3.5.2.4. DNA Yıkama Aşaması	29
3.5.2.5. DNA Elüsyon Aşaması.....	29
3.5.2.6. Elde Edilen DNA'nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini.....	30

3.5.3. ABCG2 Geninin N-terminal 2. Ekzon Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction -PCR) Yöntemi İle Çoğaltılması	30
3.5.4. ABCG2 Geninin NBD 5.Ekzon Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi İle Çoğaltılması	31
3.5.5. PCR’da Kullanılan Kimyasal Maddeler ve PCR’ın Hazırlanışı:	31
3.5.5.1. PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) Karışımının Hazırlanışı : ...	31
3.5.5.2. PCR Şartları	33
3.5.6. Agaroz Jel Elektroforezinin Uygulanması	34
3.5.6.1. %2’lik Agaroz Jel Hazırlanması:	34
3.5.6.2. PCR Ürünlerinin %2’lik Jel’e Yüklenmesi:	34
3.5.6.3. PCR Ürünlerinin Kontrolü.....	35
3.5.7. ABCG2 Geni 2 İnci Ekzon Bölgesinin PCR Ürünlerinde Bsr I Enzim Kesimi35	
3.5.7.1. Bsr I Enzim Kesiminde Kullanılan Enzimler ve Kimyasal Maddeler:	35
3.5.7.2. Bsr I Enzim Kesimi	35
3.5.7.3. Bsr I Enzim Kesim Ürünlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü	36
3.5.7.4. Bsr I Enzim Kesimi Değerlendirilmesi	36
3.5.8. ABCG2 Geni 5. Ekzon Bölgesinin PCR ÜrünlerindeTaa I Enzim Kesimi	37
3.5.8.1. Taa I Enzim Kesiminde Kullanılan Enzimler ve Kimyasal Maddeler:.....	37
3.5.8.2. Taa I Enzim Kesimi.....	37
3.5.8.3. Taa I Enzim Kesim Ürünlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü.....	38
3.5.8.4. Taa I Enzim Kesimi Değerlendirilmesi.....	38
3.5.9. ABCG2 Serum Düzeyleri Tayini.....	39
3.5.10. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONRASINDA ELDE EDİLEN BULGULAR	41
5. TARTIŞMA	48
KAYNAKLAR	53
FORMLAR	67
ETİK KURUL KARARI	68
ÖZGEÇMİŞ	70

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1.Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen meme kanserinin histolojik sınıflandırılması (6)	4
Tablo 2-2. Histolojik derecelemede kullanılan modife edilmiş Bloom-Richardson sistemi(10,11).....	6
Tablo 2-3. Meme kanserinde TNM sınıflaması (12).....	7
Tablo 2-4.Meme kanserinde TNM sınıflamasına göre evrelerin gruplandırılması (2003)	9
Tablo 2-5.Bilinen Bazı İnsan ABC transporterları, fonksiyonları ve ilişkili olabilecek hastalıklar (74)	19
Tablo 2-6.İnsan ABCG2 transporter ailesi (62,74).....	21
Tablo 2-7.ABCG2 substrat ve inhibitörleri (104).....	23
Tablo 3-1.ABCG2 G34A PCR reaksiyonu karışımının hazırlanması.....	32
Tablo 3-2.ABCG2 C421A PCR karışımının hazırlanması.....	32
Tablo 3-3.ABCG2 geni ekzon 2'nin G34A bölgesi PCR reaksiyonu termal profil şartları	33
Tablo 3-4.ABCG2 geni ekzon 2'nin C421A bölgesi PCR reaksiyonu için termal profil şartları	34
Tablo 3-5.Bsr I enzim kesiminde kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları.....	36
Tablo 3-6.Taa I enzim kesiminde kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları	38
Tablo 4-1.Hasta grubuna ait klinikparametreler	41
Tablo 4-2.Çalışma gruplarında ABCG2 G34A polimorfizmi genotip ve allel dağılımları	42
Tablo 4-3.Çalışma gruplarında ABCG2 C421A polimorfizmi genotip ve allel dağılımları.....	43
Tablo 4-4.Çalışma gruplarında ABCG2 G34A ve C421A polimorfizmlerine ait haplotip frekansları	44
Tablo 4-5.Çalışmagruplarında serum ABCG2düzeyleri	45
Tablo 4-6.Çalışma gruplarında G34A ve C421A polimorfizmleri genotip ve allel dağılımlarına göre serum ABCG2 düzeyleri	46

Tablo 4-7.Çalışma grubunda kapsüler invazyon varlığında G34A polimorfizmi genotip dağılımları.....	47
--	----

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1.İnsan ABC transporter proteinlerinin yapısı A.ABCB Modeli Tam Transporter, B. ABCG Modeli Yarı Transporter(71).....	17
Şekil 2-2.ABCG yarı-transporter proteinlerinin membran topolojisi (80).....	20
Şekil 2-3.İnsan BCRP geni genomik organizasyon ve BCRP proteini primer yapısının diagramı (91).....	22
Şekil 2-4.BCRP proteinin şematik yapısı, SNP, splicing varyantlar ve aminoasitdeğişikliklerinin pozisyonları (115).	25
Şekil 3-1.Bsr I enzim kesimi sonrası oluşabilecek DNA parçalarının %3'lük agaroz jelde çıkabilecek bant şeklinin şematik görüntüsü.....	37
Şekil 3-2. Taa I enzim kesimi sonrası oluşabilecek DNA parçalarının %3'lük agaroz jelde çıkabilecek bant şeklinin şematik görüntüsü.....	39
Şekil 4-1. Bsr I enzim kesimi sonucunda ABCG2 G34A varyantlarının %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: Intronbio 50 bp marker.....	42
Şekil 4-2. Taa I enzim kesimi sonucunda ABCG2 C421A varyantlarının %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: Intronbio 50 bp marker.....	43
Şekil 4-3.LD grafiği	44

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- BCRP: Meme kanseri direnç proteini
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
DCIS: Duktal karsinoma in situ
LCIS: Lobuler karsinoma in situ
ABC: ATP bağlı kaset transporter
NBD: Nükleotid bağlayıcı domen
TMD: Transmembran domen
PGP: P-glikoprotein
HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
LXR: karaciğer X reseptör
RXR: retinoid X reseptör
MXR: mitoxantrone
PhIP: 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine
SNP: Tek nükleotid polimorfizmi
OD: Optik densite
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
DLBCL: Diffüz büyük B-hücreli lenfoma
NSCLC: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
ER: Östrojen reseptörü
PR: progesteron reseptörü

ÖZET

Yıldız Y. (2015). Meme Kanseri Hastalarında ABCG2 Gen Polimorfizmleri ve Serum Düzeyinin İncelenmesi.

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp AD. Doktora Tezi. İstanbul

BCRP olarak da bilinen ABCG2, plazma membranında lokalize olan bir yarım ATP- bağlı kaset transporterdir. Enerji bağımlı bir akış pompası ve transporter olarak, toksik bileşikler ve antikanser ilaçların da olduğu, geniş aralıktaki yapısal olarak birbirinden farklı substratların intraselüler kompartmandan, ekstraselüler kompartmana transportunu gerçekleştirir. Bundan dolayı BCRP, ksenobiyotikler ve onların metabolitlerinden koruyucu rol oynar ve antikanser ilaçların intraselüler konsantrasyonunu etkiler. ABCG2 geninde tanımlanan genel germline polimorfizmler kodlanan proteinin ekspresyonunu, hücresel lokalizasyonunu ve/veya substrat tanıma durumunu etkileyebilmektedir. Çalışmamızda, meme kanserli vakalarda ve sağlıklı kontrollerde, ABCG2 protein seviyesinin ve bu gende yer alan polimorfizmlerinden G34A (Val12Met) ve C421A (Gln141Lys) polimorfizmleri incelenerek, genotip ve allel frekanslarının saptanması amaçlanmıştır. PCR, RFLP ve jel elektroforez teknikleri kullanılarak 128 meme kanseri ve 106 sağlıklı kontrolde bu polimorfizmler belirlenmiştir, bunun yanında ABCG2 serum seviyesi kantitatif enzim immunoassay (ELISA) ile ölçülmüştür. Hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında bu polimorfizmler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır, ayrıca hasta ve sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir ($p>0,05$). Ancak kapsüler invazyon görülen hastaların tamamının G34A GG genotipine sahip oldukları gözlemlenmiştir ($p:0,026$) ve östrojen reseptör pozitif hastalarda GG genotipine sahip olma sıklığının anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır ($p:0,027$).

Çalışmamız, ülkemizde meme kanserli hastalarda bu iki polimorfizmle ilgili ilk verileri sunmuş olup, bu verilerin daha sonra yapılacak olan çalışmalara öncülük edeceğine inanıyoruz.

Anahtar Kelimeler: ABCG2, İlaç Direnci, Transporter, Polimorfizm, Meme Kanseri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 13448

ABSTRACT

Yıldız Y. (2015). Investigation of ABCG2 Gene Polymorphisms and Serum Level In Breast Cancer Patients. İstanbul University, Institute of Health Science, Molecular Medicine. İstanbul.

ABCG2, also known as BCRP, is a half ATP-binding cassette (ABC) transporter that localizes to plasma membranes. It functions as energy-dependent efflux pump and transports a wide array of structurally divergent substrates, including toxic compounds and anticancer drugs, from the intracellular to the extracellular compartment. Therefore, BCRP plays a protective role against xenobiotics and their metabolites and can affect the intracellular concentration of anticancer drugs. Common germline polymorphisms in the ABCG2 gene have been described that can affect expression, cellular localization and/or substrate recognition of the encoded protein. The present study aimed to investigate the susceptibility and prognostic implications of the ABCG2 G34A (Val12Met) and C421A (Gln141Lys) polymorphisms and ABCG2 serum level in the breast cancer. We used PCR, RFLP and gel electrophoresis techniques to detect these polymorphisms in 128 breast cancer patients and 106 healthy controls, besides that serum level of ABCG2 was measured by quantitative sandwich enzyme immunoassay (ELISA). No statistically significant differences were found in these two polymorphisms between patient and control groups. In addition there is no association between serum ABCG2 levels were detected in patients and healthy controls ($p>0,05$). However, a significant association was found between the ABCG2 G34A GG genotype and capsular invasion ($p=0.026$) and having GG genotype was considerably higher in estrogen receptor positive breast cancer patients compared to having GA+AA genotype ($p=0.027$).

Our study reveals the first data about these two polymorphisms on breast cancer patients in our country and we believe that this study will play a pioneering role for the next studies.

Key Words: ABCG2, drug resistance, Transporter, Polymorphism, Breast Cancer

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No:13448

1. GİRİŞ VE AMAÇ

ABCG2 olarak bilinen Meme Kanseri Direnç Proteini (Breast Cancer Resistance Protein, BCRP), bir ATP bağlama domeni ve bir transmembran domenden oluşan ATP transporterıdır. Enerji bağımlı bir akış pompası ve transporter olarak, toksik bileşikler ve antikanser ilaçların da olduğu, geniş aralıktaki yapısal olarak birbirinden farklı substratların intraselüler kompartmandan, ekstraselüler kompartmana transportunu gerçekleştirir. Bundan dolayı BCRP, ksenobiyotikler ve onların metabolitlerinden koruyucu rol oynar ve antikanser ilaçların intraselüler konsantrasyonunu etkiler. Normal dokulardaki BCRP dağılımının araştırıldığında, en yüksek oranda BCRP'nin plasentada, daha düşük olarak kolon ve ince bağırsak epitelinde, karaciğer kanalikör membranında, memenin kanal ve lobüllerinde ve normal dokuların ven ile kapiler endotelinde olduğu ortaya çıkarılmıştır. BCRP homodimer olarak fonksiyon görür ve SN-38, topotecan, ile MXR gibi antikanser ilaçlara direnç tavrı gösterir. ABCG2 geninde doğal olarak oluşmuş seksenin üzerinde dizi varyasyonu rapor edilmiştir. Çeşitli etnik gruplarda doğal olarak oluşan BCRP SN'leri tanımlanmıştır. Birçok etnik popülasyonda yüksek oranda görülen BCRP G34A (Val12Met) ve C421A (Gln141Lys) polimorfizmlerinin BCRP proteininin ekspresyonu ve aktivitesi ile alakalı olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda, Türk toplumundaki meme kanserli vakalarda ve sağlıklı kontrollerde, BCRP protein seviyesinin ve bu gende yer alan önemli gen polimorfizmlerinden G34A (Val12Met) ve C421A (Gln141Lys) polimorfizmleri incelenerek, genotip ve allel frekanslarının saptanması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MEME KANSERİ

Meme, lobüller (süt bezleri) ve duktuslar (süt kanalları) olmak üzere iki bölgeden oluşur. Lobüller ve duktuslar arasında bulunan boşluğu destek ve yağ dokusu doldurmaktadır. Memede süt salgılayan bölüm olan lobüller, duktuslar ile memenin ortasında bulunan areola denilen koyu renkli bölgede meme başına açılırlar (1).

Meme kanseri, bu bölümlerden herhangi birini oluşturan hücrelerin kontrolsüz ve anormal çoğalması ve vücudun çeşitli yerlerine giderek çoğalmaya devam etmeleriyle oluşur.

Klinik, morfolojik ve moleküler çok farklı bileşeni olmasıyla kompleks bir hastalık olan meme kanserinin oluşumunda ve ilerlemesinde, çevresel ve genetik etmenlerin önemli rolü vardır.

Hormonların ve çevresel etkenlerin genetik yapı ile etkileşiminin bir sonucu olan meme kanseri riskinin çeşit kimyasallar, dışarıdan östrojen alımı, östrojen metabolize eden genler, geç menopoza, erken menarş, ilk doğumun ileri yaşlarda gerçekleşmesi, ailede meme kanseri hikayesi, artmış vücut-kitle indeksi, menopoza sonrası obezite, tümör baskılayıcı genler ile DNA tamir genlerindeki çeşitli mutasyonlar, iyonlaştırıcı ışınlam, alkol ve sigara kullanımı ile arttığı belirtilmiştir (2,3).

2.1.1. Görülme Sıklığı

Meme kanseri görülme sıklığı ve mortalitesi coğrafi bölgeye, kültüre, ırka, etnik kökene ve sosyo-ekonomik duruma göre değişiklik göstermektedir.

Dünya çapında meme kanseri; tüm cinsiyetlerde, akciğer kanserinden sonra ikinci en yaygın kanser türüdür. Dünyada kadınlar arasında ise, en sık görülen malign tümör olup her yıl yaklaşık olarak 1,6 milyon yeni meme kanseri tanısı konulmaktadır (4).

En yüksek vaka oranı sırasıyla yılda 100.000 kadında 111,6 ile Belçika; 104,4 ile Fransa; 92,9 ABD ile görülürken en düşük oran ise 9,4 ile Moğolistan, 22,7 ile Çin’de tespit edilmiştir (4).

Ülkemizde ise henüz düzenli bir meme kanseri kayıt programı olmadığından, kesin sıklığının belirlenmesi daha güç olmaktadır. Ancak son verilere göre ülkemizde görülme sıklığı 100.000 kadında 39,1 dir. Ülkemizde meme kanseri insidansının, popülasyondaki yaşlanma ve batılı yaşam biçimi nedeniyle son yirmi yılda iki katından fazla arttığı belirtilmiştir (4,5).

2.1.2. Meme Kanseri Sınıflaması

Meme kanseri morfolojik özellikleri çok farklı olabilen heterojen bir hastalıktır. Histolojik olarak, meme kanserleri in situ ve invaziv kanserler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. İnvaziv kanserler, lenf ve kan damarlarına yayılarak bölgesel lenf düğümlerine ve uzak organlara metastaz yapabilme özelliğine sahiptir. Histopatolojik sınıflamada, tümör hücrelerinin sitolojik özellikleri yanı sıra oluşturdukları yapısal özellikleri de göz önüne alınmaktadır. Duktal karsinoma ve lobüler karsinoma meme kanserlerinin çok büyük bölümünü oluşturmakla birlikte, Dünya Sağlık Örgütü Meme Tümörleri Histopatolojik Sınıflaması’nın son versiyonunda yirminin üzerinde meme karsinomu histopatolojik tipi tanımlamaktadır.

Günümüzde meme kanseri için kullanılan sınıflama Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen sınıflamadır (Tablo 2-1) (6).

Tablo 2-1.Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen meme kanserinin histolojik sınıflandırılması (6)

1. İn situ karsinom - İn situ duktal karsinom - İn situ lobüler karsinom
2. İnvaziv karsinom - İnvaziv duktal karsinom - İnvaziv lobüler karsinom - Tubuler karsinom - İnvaziv kribriform karsinom - Medüller karsinom - Müsinöz karsinom - İnvaziv papiller karsinom - İnvaziv mikropapiller karsinom - Apokrin karsinom - Sekretuar (juvenil) karsinom - Adenoid kistik karsinom - Metaplastik karsinom - Nöroendokrin karsinom - İnflamatuar karsinom

2.1.2.1. İnvaziv Meme Kanseri

Lobüllerin ya da kanalların içindeki anormal hücreler bazal membranı aşarak çevre meme dokusunda yayıldığında ortaya çıkmaktadır. Bu süreç kanserin lenf düğümlerine, daha ileri evrelerde ise karaciğer, akciğer ve kemik gibi alanlara yayılmasını olanaklı kılmaktadır. İnvaziv meme kanserleri morfolojik olarak birbirinden farklı fenotipik özellikler gösterebilir. Bunların bazılarının klinik ve prognostik açıdan karakteristik özellikleri bulunur.

2.1.2.2. İnvaziv Olmayan (İn situ Karsinom) Meme Kanseri

“İn situ”, “özgün yerinde” anlamına gelmektedir. Bu tip meme kanserinde kanser hücreleri özgün lokasyonların kaldığı, çevre dokulara ya da daha uzak bölgelere metastaz yapmadıkları için “in situ” ifadesi kullanılmıştır. Başlıca iki tip in situ karsinom bulunmaktadır. Anormal hücreler löbül içerisinde çoğaldıklarında löbüler karsinom in situ olarak isimlendirilmektedir. Buna karşın anormal hücreler süt kanallarının içinde çoğaldıklarında duktal in situ karsinom olarak tanımlanmaktadır. İn situ karsinom kanserin erken bir dönemi olup yayılmamaktadır, lakin daha tehlikeli olan invaziv forma dönüşebilmektedir.

2.1.3. Meme Kanseri Prognostik Etmenler

Meme kanseri için bilinen en önemli prognostik değişkenler, tümör çapı, histolojik tip, histolojik grad ve lenf nodlarının durumudur. Bunlarla birlikte, steroid hormon reseptörleri (östrojen ve progesteron reseptörü), onkogenler, tümör baskılayıcı genler, anjiogenez ve proteazlar da meme kanseri prognozunda belirleyicidirler (7).

2.1.3.1. Histolojik Derecelendirme

Günümüzde artık invaziv karsinomların morfolojik tipine bakılmaksızın derecelenmesi önerilmektedir ve modife edilmiş Bloom-Richardson sistemi en çok kullanılan dereceleme sistemidir. Bu dereceleme sistemine göre tümör hücrelerinin; çekirdeğinin özellikleri, oluşturdukları tübüler yapıların oranı ve mitoz sayısı ayrı ayrı hesaplanarak elde edilen toplam skora göre derece (Grad) belirlenmektedir (Tablo 2-2). 10 yıllık sağkalım oranı; Grad I tümörler için %85, Grad II tümörler için %60, Grad III tümörler için %15’dir (8,9).

Tablo 2-2. Histolojik derecelemede kullanılan modife edilmiş Bloom-Richardson sistemi(10,11)

	Skor (puan)
Tubuler tümör oluşumu	
Tümörlerin büyük kısmında (>75)	1
Orta derecede (%10-75)	2
Minimal veya hiç yok (<10)	3
Nukleus özellikleri	
Küçük, uniform (hepsi aynı biçimde) hücreler	1
Orta derecede boyut ve şekil farkı, nukleolus varlığı	2
Belirgin boyut ve şekil farkı, sıklıkla çok sayıda nukleolus	3
Mitoz sayısı (x25, alan çapı 0.59 mm-10 alan)	
0-9	1
10-19	2
>20	3

Toplam skor; 3-5: Grad I, 6-7: Grad II, 8-9: Grad III

2.1.4. Meme Kanseriinde Güncel TNM Evrelemesi

Kanserin yayılımı ve ciddiyeti hakkında bilgi edinilmesini sağlayan sistemler tümör evreleme sistemleridir. TNM Evreleme Sistemi'nde tümör sınıflandırılması için kullanılan kriterler; tümör boyutu (tümör-T), aksiller lenf nodlarının tutulumu (nodal-N) ve uzak bölgelere yayılımdır (metastaz-M) (tablo 2-3; tablo 2-4) (12).

Tablo 2-3. Meme kanserinde TNM sınıflaması (12)

Birincil tümör TX: Değerlendirilemeyen birincil tümör T0: Birincil tümöre ait bulgu yok Tis: İn situ karsinom Tis (DCIS): Duktal karsinoma in situ Tis (LCIS): Lobuler karsinoma in situ Tis (Paget): Meme başının kitlesiz Paget hastalığı T1: En büyük çapı ≤ 2 cm tümör T1mic: En büyük çapı $\leq 0,1$ cm mikroinvaziv tümör T1a: Tümör çapı $> 0,1$ cm, ancak $\leq 0,5$ cm T1b: Tümör çapı $> 0,5$ cm, ancak ≤ 1 cm T1c: Tümör çapı > 1 cm, ancak ≤ 2 cm T2: Tümör çapı > 2 cm ancak, ≤ 5 cm T3: Tümör çapı > 5 cm T4: Göğüs duvarına veya cilde doğrudan yayılımı olan herhangi büyüklükte olan tümör T4a: Pektoral kasa ulaşmamış göğüs duvarı yayılımı T4b: Meme cildinde ödem (peau d'orange da dahil), ülserasyon, aynı memede satellit deri nodülleri T4c: T4a ve T4b birlikte T4d: Enflamatuvar karsinom
Klinik sınıflama NX: Daha önce çıkarıldığı için değerlendirilemeyen nodal tutulum N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok N1: Hareketli, aynı tarafta (ipsilateral) bölgesel lenf nodu metastazı N2: Komşu dokulara yapışık aynı tarafta aksiller lenf nodu metastazı veya aksiller metastaz olmaksızın klinik veya radyolojik olarak görülebilen aynı tarafta (ipsilateral) İM (internal mammaryal) nodal metastaz N2a: Komşu dokulara yapışık, aynı tarafta aksiller lenf nodu metastazı N2b: Aksiller metastaz olmaksızın klinik veya radyolojik olarak görülebilen aynı tarafta İM nodal metastaz N3: Aynı tarafta infraklaviküler lenf nodu metastazı veya klinik+radyolojik olarak görülebilen aynı tarafta İM lenf nodu metastazı+aksiller lenf nodu metastazı veya supraklaviküler lenf nodu metastazı N3a: Aynı tarafta infraklaviküler lenf nodu metastazı+aksiller lenf nodu metastazı N3b: Klinik+radyolojik olarak görülebilen aynı tarafta İM lenf nodu metastazı+aksiller lenf nodu metastazı N3c: Supraklaviküler lenf nodu metastazı

Patolojik sınıflama**pNX:** Değerlendirilemeyen bölgesel lenf nodları**pN0:** Bölgesel lenf nodu metastazı yok**pN0(i-):** Bölgesel lenf nodu metastazı yok, immunohistokimyasal (İHK) (-)**pN0(i+):** Bölgesel lenf nodu metastazı yok, İHK (+), ancak tümör infiltrasyon alanı $\leq 0,2\text{mm}$ **pN0(mol-):** Bölgesel lenf nodu metastazı yok, RT-PCR (-)**pN0(mol+):** Bölgesel lenf nodu metastazı yok, RT-PCR (+)**pN1:** 1-3 aksiller lenf nodu tutulumu ve/veya klinik veya radyolojik olarak görüntülenemeyen, ancak sentinel biyopside saptanan İM lenf nodunda mikrometastaz**pN1mic:** Mikrometastaz tümör infiltrasyon alanı $>0,2\text{ mm} \leq 2,0\text{ mm}$ **pN1a:** 1-3 adet aksiller lenf nodu tutulumu**pN1b:** Klinik veya radyolojik olarak görüntülenemeyen, ancak sentinel biyopside saptanan İM lenf nodunda mikrometastaz**pN1c:** 1-3 aksiller lenf nodu tutulumu ve klinik veya radyolojik olarak görüntülenemeyen, ancak sentinel biyopside saptanan İM lenf nodunda mikrometastaz**pN2:** 4-9 aksiller lenf nodu metastazı veya aksiller tutulum olmaksızın İM lenf nodlarında klinik+radyolojik olarak görüntülenebilen tutulum**pN2a:** 4-9 aksiller lenf nodunda metastazı en küçük tümör infiltrasyon alanı $>2,0\text{ mm}$ **pN2b:** Aksiller tutulum olmaksızın İM lenf nodlarında klinik + radyolojik (lenfosintigrafi dışı) olarak belirgin olan tutulum**pN3:** 10 veya daha fazla aksiller lenf nodu metastazı veya infraklaviküler lenf nodu metastazı veya klinik + radyolojik (lenfosintigrafi dışı) olarak belirgin İM lenf nodu metastazı + en az 1 aksiller lenf nodu metastazı veya sentinel biyopsi ile tanısı konan mikroskopik İM lenf nodu metastazı + 3'ten fazla aksiller lenf nodu metastazı**pN3a:** 10 veya daha fazla aksiller lenf nodu metastazı, en küçük tümör infiltrasyon alanı $>2\text{ mm}$ veya infraklaviküler lenf nodu metastazı**pN3b:** Klinik + radyolojik (lenfosintigrafi dışı) olarak belirgin İM lenf nodu metastazı + en az 1 aksiller lenf nodu metastazı veya sentinel biyopsi ile tanısı konan mikroskopik İM lenf nodu metastazı + 3'ten fazla aksiller lenf nodu metastazı**pN3c:** Supraklaviküler lenf nodu metastazı**Uzak metastaz****MX:** Değerlendirilemeyen uzak metastaz**M0:** Uzak metastaz yok**M1:** Uzak metastaz var

Tablo 2-4. Meme kanserinde TNM sınıflamasına göre evrelerin gruplandırılması (2003)

Evre	T	N	M
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
	T1mic	N0	M0
Evre IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Evre IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Evre IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Evre IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Evre IIIC	T1-4	N3	M0
Evre IV	T1-4	N0-3	M1

2.1.5. Meme Kanserinde Risk Faktörleri

2.1.5.1. Cinsiyet

Kadın cinsiyetine sahip olmak meme kanseri gelişiminde temel risk faktörünü oluşturur. Erkek bireylerde de meme kanseri görülür fakat bu oran kadınlarda erkeklere göre yüz kat daha fazladır. Erkeklerde meme kanseri görülme sıklığı tüm meme kanseri vakalarının yüzde 1'inden daha azdır (13).

2.1.5.2. Yaş

Yaşın ilerlemesiyle birlikte meme kanseri riskinin yükseldiği ve menapoz dönemine kadar her 10 yılda ikiye katlandığı, daha sonra ise risk insadansındaki artışın azaldığı bildirilmiştir. İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık 8'de 1'inin 45 yaşının altındaki kadınlarda görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca meme kanseri, akciğer kanseri ile karşılaştırıldığında genç yaşta görülme sıklığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (14).

2.1.5.3. Coğrafik Varyasyon

Meme kanserinden ölümlerin Japonya hariç sanayileşmiş ülkelerde yoğunlaştığı, özellikle Batı ve Kuzey Avrupa ile ABD'de oranın arttığı görülmektedir. Bununla birlikte, Japonya'dan Havai'ye göçeden göçmenlerle ilgili yapılan bir çalışmada, göçmenlerin meme kanseri oranının bir veya iki generasyon sonra göçettikleri yerlerin oranına yaklaştığı görülmüştür. Bu da çevresel faktörlerin genetik faktörlere göre oldukça önemli olduğunu düşündürmektedir (14).

2.1.5.4. Menarş ve Menapoz Yaşı

Erken menstruasyona başlayan veya geç menapoza giren kadınlarda yüksek bir meme kanseri riski görüldüğü rapor edilmektedir. 55 yaşından sonra doğal bir menapoz geçiren kadınların, 45 yaşından önce menapoz geçiren kadınlara göre neredeyse iki kat meme kanseri gelişim riski taşıdığı bildirilmiştir. Bu yüksek riskin yaşam sürelerinde daha uzun süre östrojen ve progesteron hormonlarına maruz kalmadan dolayı olabileceği bildirilmiştir (15-19).

2.1.5.5. İlk Gebelik Yaşı

İlk doğumun geç yaşta gerçekleşmesi ve hiç çocuk sahibi olamamanın yaşam süresindeki meme kanseri insidansını arttırdığı belirtilmiştir (18, 20, 21). 30 yaşından sonra ilk çocuğa sahip olanlarda meme kanseri riskinin, 20 yaşından önce ilk çocuğa sahip olanlara göre iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, erken yaşta ikinci çocuğa sahip olmanın meme kanseri riskini daha da azalttığı bildirilmektedir (22).

2.1.5.6. Aile Hikayesi

Yapılan çalışmalarda, batı ülkelerinde meme kanserlerinin % 10'undan fazlasının genetik yatkınlıkla ilişkili olduğu belirtilmektedir. Meme kanseri gelişiminde genellikle sınırlı penetransla otozomal dominant olarak kalıtımın söz konusu olduğu, yani her iki cinsiyetle hatta bazı ailelerin kendilerinde kanser gelişimi olmadan da anormal geni aktarabileceği bilinmektedir. Ancak meme kanseri gelişimi ile ilgili olabilecek genlerin sayısı şu anda tam olarak bilinmemektedir. Yüksek riskli ailelerin (yani yakın akrabalarında dört veya daha fazla meme kanseri bulunması) çoğunda, sırasıyla 17 ve 13 nolu kromozomların uzun kollarına yerleşmiş olan BRCA1 ve BRCA2 genlerindeki bozukluklar sıklıkla rapor edilmiş ve üzerinde önemle durulmuştur. BRCA1 ve BRCA2 genlerinin, büyük genler olduğu ve mutasyonların hemen her pozisyonda oluşabildiği bilinmektedir (23, 24). Bunun yanında, p53 genindeki mutasyona bağlı olarak gelişen Li-Fraumeni sendromlu hastalarda da yüksek oranlarda meme kanseri gelişme riski bulunduğu bildirilmiştir (1). Bir kadının birinci dereceden akrabası (anne, kızkardeşi veya kızı) 50 yaşından önce hastalık gelişimi göstermişse, o kadının meme kanseri riskinin iki veya daha fazla kat yükseldiği, eğer daha erken yaşta hastalık gelişimi göstermişse o zaman riskin daha da artabileceği bildirilmiştir (14).

2.1.5.7. Önceki Benign Meme Lezyonları

Şiddetli atipik epitelyal hiperplazili kadınların, memelerinde herhangi bir proliferatif değişiklik olmayan kadınlara göre, dört ile beş kat kadar daha yüksek oranda

meme kanseri gelişim riski taşıdıkları belirtilmiştir, ayrıca ailesinde meme kanseri hikayesi varsa bu riskin daha da artabileceği belirtilmiştir (14).

2.1.5.8. Radyasyon

Meme dokusunun radyasyona maruz kalmasının da kanser riskini arttırdığı epidemiyolojik çalışmalar ile gösterilmiştir. Atom bombası sonrası sağ kalanlarda meme kanserinin fazla görülmesi, tüberküloz nedeniyle sık sık floroskopik muayeneye girenlerde, postpartum mastit (doğum sonrası meme iltihabı oluşumu) nedeniyle ısınlananlarda veya Hodgkin hastalığı veya timus büyümesi nedeni ile mediastinal radyoterapi alanlarda meme kanseri sıklığının normal topluma göre çok artmış olması bu görüşü kuvvetlendirmektedir (25). Radyasyonun neden olduğu kanser iki etmene bağlı olarak gelişir. Bunlardan biri radyasyonun dozu, diğeri ise yaştır. 30 yaşın altında olanlarda ve yüksek doz radyasyona maruz kalanlarda risk artar. Bunun nedeni tam gelişmemiş meme epitelinin radyasyona daha duyarlı olmasıdır (26). İyonize radyasyonun bayan uçuş görevlileri, hemşireler, kimyacılar ve yalıtım işçilerinde meme kanseri riskini arttırdığı bildirilmiştir (27–29).

2.1.5.9. Diyet

Günlük yağ alımı ile meme kanserisi insidansı arasında bir bağlantı olabileceği düşünülse bile, bu bağlantı tutarlı gözükmemektedir. Bununla birlikte insan diyetinde çeşitli doğal karsinogenlerin oksijen radikali oluşturarak DNA hasarına neden olabileceği bilinmektedir (30). Antioksidanların kaynağı olan meyve ve sebzelerin tüketiminin meme kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir (31, 32). Yapılan bazı çalışmalarda et tüketimiyle, meme kanseri riski artışı ilişkilendirilmiştir (33).

2.1.5.10. Kilo

Menapoz sonrası dönemdeki kadınlarda obezitenin meme kanseri riskini iki kat arttırdığı, menopoz öncesi dönemdeki kadınlar arasında ise bu insidansın azaldığı bildirilmiştir (34).

2.1.5.11. Alkol Kullanımı

Meme kanseri insidansı ile alkol tüketimi arasındaki bağlantının tam tutarlı olmadığı ve bu bağlantının alkolden başka diğer diyet faktörlerinden de kaynaklanabileceği öne sürülmektedir (14). Bununla birlikte, bazı çalışmalar alkol tüketimiyle meme kanseri insidansı arasında bir bağlantı olabileceği öne sürmektedir, yapılan bir çalışmada yüksek oranda alkol kullanan kadınlarla alkol alımının meme kanseri riskini %15 arttırabileceği bildirilmiştir (35). Yapılan diğer bir çalışmada, günde 1-5 bardak alkol tüketiminin meme kanseri riskinin artmasıyla doğrusal bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (36). Özellikle erken yaşlarda alkol tüketiminin zararlı olduğu düşünülmektedir (35).

2.1.5.12. Sigara

Yapılan çalışmalarda meme kanseri riski ile sigara yada tütün ürünleri tüketiminin arasında herhangi anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (37,38). Fakat erken yaşta sigaraya başlamanın, tüketim miktarının fazla olması ve pasif içici olmak gibi büyük faktörlerin istatistiksel olarak belirgin etkileri olduğu görülmüştür (38,39).

2.1.6. Meme Kanseri Moleküler Biyolojisi ve Genetiği

Meme kanserinin gelişimi ile ilgili olarak yapılan çalışmalar büyük bir artış göstermesine karşın henüz moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Çevresel karsinojenlere maruz kalma sonrasında kazanılan mutasyonların yanında, germline mutasyonlarla kalıtılan genetik değişiklikler sonucu tümör supresör genlerinin inaktivasyonu ve protoonkogenlerin aktivasyonu ile apoptoz mekanizmasının bozulması ve/veya kontrolsüz hücre proliferasyonunun sonucunda meme kanseri gelişiminin başladığı öne sürülmektedir (40, 41). Bununla birlikte, çeşitli büyüme faktörleri ve bunların ilişkili reseptörlerinde oluşabilecek bozuklukların da kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olarak, insan meme kanserinde oldukça önemli rol oynadığı bilinmektedir (40,41).

Meme kanseri oluşumuyla ilgili genetik değişiklikler arasında bazı genlerin çoğalması, delesyonlar, nokta mutasyonları, kromozomların yeniden düzenlenmeleri ve anöploidi yer almaktadır. Bunların yanında, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmadan gen ifadesinde meydana gelen ve epigenetik olarak adlandırılan kalıtsal değişiklikler de mevcuttur (42). Meme kanserinde en sık görülen epigenetik değişiklikler histon modifikasyonları ve DNA'nın metillenmesidir. Epigenetik değişiklikler onkogenleri veya tümör baskılayıcı genleri etkileyip, tümör oluşumuna neden olabilmektedir.

2.1.6.1.Meme Kanseri ve Onkogenler

Proto-onkogenler, hücre büyümesi ve farklılaşması gibi hücresel olayları düzenleme işlevi olan genlerdir. Onkogenler, proto-onkogenlerin etkinleşmesi sonucu ortaya çıkar ve normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümünü kolaylaştırır (43).

Meme kanserinde genelde *cerbB-2* (*HER2/neu*), *c-myc*, *c-fos* ve *c-jun* gibi onkogenlerin etkinleştiği görülmektedir.

HER2 (*c-erbB2*, *HER2/Neu*, *ERBB2*), kromozom 17q21-22'de yerleşik bir proto-onkogendir. *EGFR* ailesinin bir üyesi olan *HER2*, büyüme için tirozin kinaz etkinliği ile sinyal iletimini sağlayan, 185 kDa'luk bir protein kodlar (44). *HER2*, birincil meme kanserlerinin yaklaşık %30'unda çoğalma gösterir (45,46). *ERBB2*'nin aşırı ifade edilmesi, tüm meme kanserlerinin yaklaşık olarak %18-20'sinde, *DCIS* lezyonlarının ise yaklaşık %32-55'inde görülür ve hücre çoğalmasına neden olur (47). *HER-2* gen amplifikasyonunun görüldüğü meme tümörlü hastaların daha kötü prognoz ve daha kısa süreyle sahip oldukları gösterilmiştir (48).

Meme kanserinde; *c-myc*, *c-fos* ve *c-jun* gibi protoonkogenlerin östrojen ve progesteron uyarısı ile etkinleştikleri gösterilmiştir (49). Bu onkogenlerin uyarılması ile kanser hücrelerinin çoğalması arasında bir bağlantı olduğu düşünülmektedir.

C-myc geni 8.kromozomun uzun kolunun 24. bölgesinde yerleşmiş bir gendir. *c-myc* proteini hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve apoptoz ile ilişkili genlerin yazılımlarını düzenleyen bir fosfoproteindir. *c-myc* geninin aşırı ifade edilmesi veya gen yapısındaki değişikliklerin meme kanseri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (43, 50).

2.1.6.2. Meme Kanseri ve Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler hücre büyümesini düzenleyerek, tümör gelişimini engelleyen genlerdir. Tümör baskılayıcı genler tarafından kodlanan proteinlerdeki işlev kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine, anormal hücre büyümesine ve hatalı apoptoza neden olmaktadır (51).

Meme kanserinde etkili olan başlıca tümör baskılayıcı genlerin p53, ATM, BRCA1, BRCA2, PTEN ve retinoblastoma olduğu gösterilmiştir. p53 genindeki mutasyonların tüm insan kanserlerinin yarısından fazla ve meme kanserlerinin yaklaşık %20-30'unda görüldüğü bildirilmiştir (43, 52).

BRCA1, BRCA2, ATM ve p53 tümör baskılayıcı genlerinin, tahmini olarak erken ortaya çıkan meme kanserlerinin ailesel grupta olanlarının yaklaşık %50'sinde önem taşıdıkları bildirilmiştir (53, 54). BRCA1 ve BRCA2 proteinleri genomik stabilitenin sağlanmasına, DNA hasarında hücresel cevaba, transkripsiyonel düzenlemeye ve hücresel proliferasyona dahil olurlar (23). BRCA1 kromozom 17 üzerinde bulunur ve otozomal dominant geçiş gösterir, kalıtsal kadın meme kanserlerinin büyük çoğunluğundan (%42) sorumlu olduğu görülür (24). Kalıtsal kanserlerde BRCA2 genini taşıyan 13q bölgesinin olmaması, muhtemelen, genetik değişiklikleri başlatmasıyla ilişkili bir durum olarak işaret edilmektedir (55). BRCA2 genindeki mutasyonlar, kalıtsal meme kanserli kadın vakaların %32 sinde ve erkek meme kanserli vakaların çoğunda gösterilmiştir (24). BRCA1 ve BRCA2 mutasyonu taşıyan kadınların olduğu ailelerde, bu mutasyonların yanında kadınlar 70 yaşına gelmişse, riskin %80'leri aşması söz konusudur. Ailesel vakalara karşın, düşük penetranslı genlerin, meme kanserinin sporadik vakalarına katkıda bulunduğu ve diğerlerine oranla daha geç yaşta teşhis edildiği gösterilmiştir (56).

ATM geni, 11.kromozomun uzun kolunun 22. ve 23. bölgelerinde yerleşik olan bir tümör baskılayıcı gendir. Meme kanserinde ATM geninde çok çeşitli mutasyonlar gözlenmektedir. Meme kanserlerinin %2-7'sinde ATM geninde değişiklik olduğu görülmüştür (57).

2.2. ABC (ATP-Binding Cassette, ATP-Bağlı Kaset) TRANSPORTER GEN AİLESİ

ABC transporter ailesi, aralarında lipid, sterol, metabolik ürünler ve ilaçların da bulunduğu çeşitli moleküllerin hücre membranından taşınmasını sağlayan transmembran proteinlerin en yaygın olanıdır ve bu transporterlar, gerekli olan enerjiyi ATP hidrolizinden sağlayarak bu moleküllerin konsantrasyon gradyentine karşı hücre membranından taşınmasını sağlarlar (58-60). ABC transporterlar, besin ve diğer moleküllerin hücre içine alınmasında ve toksin, lipid ve ilaçların hücre dışına taşınmasında fonksiyon gösterirler. Bu transporterlar, yaşayan tüm canlıların genomlarında bulunurlar, hem prokaryot hem de ökaryotlarda eksporter olarak işlev görürlerken, sadece prokaryotlarda importer olarak işlev görürler (61, 62).

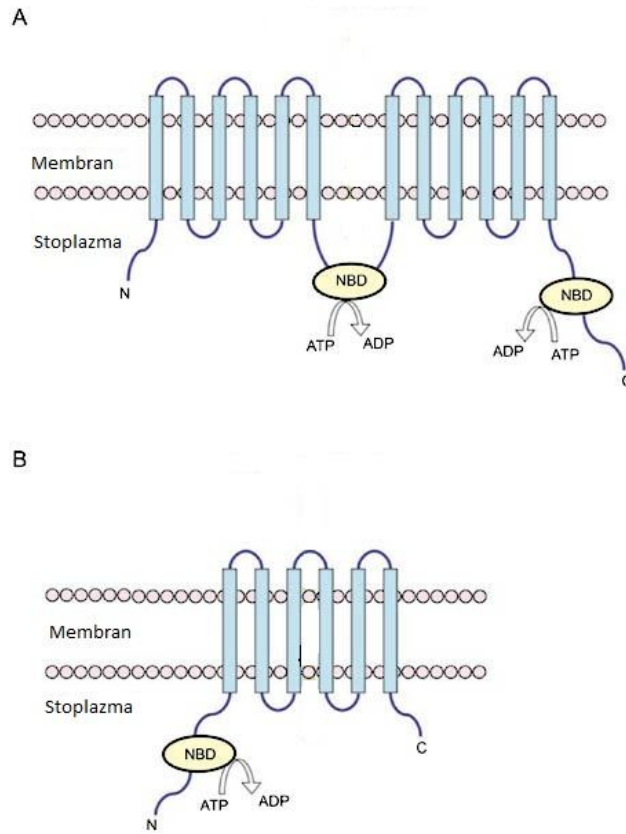
ABC transporterlarındaki mutasyonların kistik fibrozis, hiperkolesterolem, diabet ve kanserin çoklu ilaç rezistansı gibi klinik problemlerle ilişkileri dikkati çekmiştir (63).

İnsan genomunda 49 gen tarafından kodlanan bu protein ailesi, sekans benzerliklerine göre ABCA (12 üye), ABCB (11 üye), ABCC (13 üye), ABCD (4 üye), ABCE (1 üye) ABCF (3 üye), ABCG (5 üye) olarak 7 alt aileye ayrılmıştır. Bu ayırım yapılırken gen yapıları, domen yapıları ve domenlerinin dizi homolojileri dikkate alınmıştır ve bunların içerisinde 14 tanesinin de ilaç taşınmasında görevli olduğu bilinmektedir. Tümör hücrelerinde kanser ilaçlarına karşı oluşan dirençten sorumlu oldukları belirtilen bu proteinler sadece tümör hücrelerinden değil; karaciğer, böbrek, testis, bağırsak, ovaryum ve akciğer başta olmak üzere çeşitli dokulardaki hücrelerden de eksprese edilirler. Ayrıca kan beyin bariyerinden (beyin damar endotellerinin luminal yüzeyinden), kan-testis bariyerinden (endotellerin luminal yüzünde) ve plasentadan da (sinsitiotrofoblast hücrelerinden) eksprese edilen bu taşıyıcı efluks proteinleri ksenobiyotiklerin, başta fötüs olmak üzere canlı için önem taşıyan dokulara girişini engelleyerek önemli bir savunma mekanizmasının fonksiyonel birimlerini oluştururlar.

ABC proteinlerinin membrana bağlandığı bölge “transmembran bölgesi”; sitoplazmik ATP’nin hidrolize olduğu bölgeler ise “ATP-bağlanma bölgeleri” diye adlandırılır (59,61,64-69). Bu proteinler, Tam transporter (Full Transporter) ve Yarı transporter (Half Transporter) şeklinde bulunurlar. Tam transporter proteinleri, iki adet nükleotid bağlayıcı domen (NBD) ve iki adet transmembran domenden (TMD) oluşur.

Transmembran domen, fosfolipid tabakasını altı kez geçen heliks yapısındaki kıvrımlardan ibarettir. Yarı transporterlar ise, bir adet nükleotid bağlayıcı domen ve yine bir adet transmembran domenden oluşurlar (Şekil 2.1).

Her nükleotid bağlayıcı bölge yaklaşık olarak 125 aminoasit içeren Walker A ve Walker B adı verilen bölgeler içerirler. Walker A ve Walker B bölgeleri arasında “ABC İmzası veya C Motif” adı verilen korunmuş üç dizi bulunmaktadır, bütün ABC transporterlarını diğerlerinden ayıran kısım C motifidir ve ortak amino asit dizisi ‘LeuSerGlyGlyGln’ dir (61,64,69,70).



Şekil 2-1. İnsan ABC transporter proteinlerinin yapısı A.ABCB Modeli Tam Transporter, B. ABCG Modeli Yarı Transporter(71).

Şu ana kadar insan genomunda yaklaşık 49 tane ABC transporter geni tanımlanmıştır. Bu genler, yapılarındaki benzerlik (tam transporter’ a karşı yarı transporter), bölgelerin düzeni ve NBD, TMD bölgelerindeki dizi homolojisi esas olmak üzere alt ailelere ayrılmaktadır. Memelilerde yedi tane farklı ABC gen alt ailesi vardır

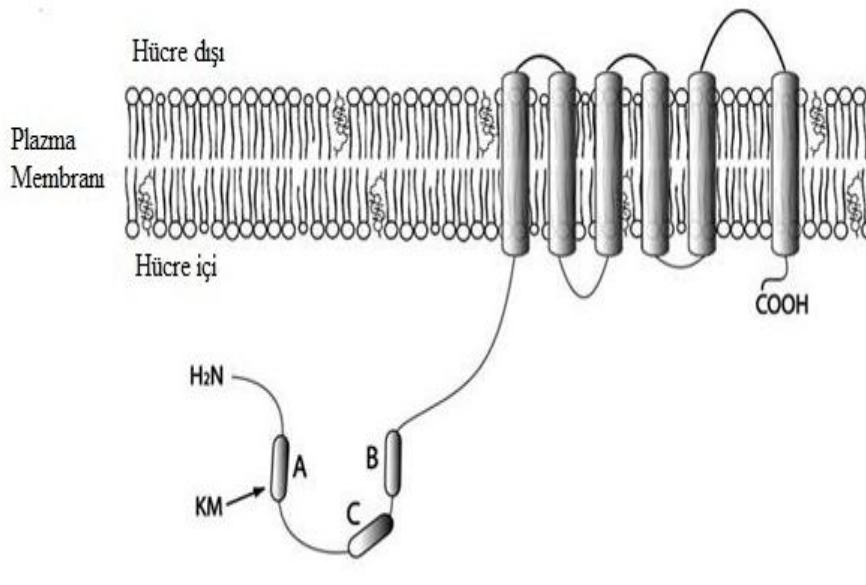
ve bu grubun beş tanesi *Saccharomyces cerevisiae* genomunda da bulunmuştur (72). Bu aileler ABCA-ABCG olarak adlandırılmıştır. Bu genlerde meydana gelen bozukluklar çeşitli genetik hastalıklara neden olmaktadır (61,73-76) (Tablo 2.5). Tüm ABC taşıyıcıları içerisinde en fazla çalışılan P-glikoproteindir (PGP, ABCB1/MDR1), pek çok tedavi ilacının P-glikoprotein substratı olması ve bazı hücrelerde P-glikoprotein ifadesini etkileyen mutasyonların görülmesi bu çalışmalara ağırlık verilmesinin başlıca nedenlerindendir (77, 78).

Tablo 2-5.Bilinen Bazı İnsan ABC transporterları, fonksiyonları ve ilişkili olabilecek hastalıklar (74)

TRANSPORTER	FONKSİYON (Bilinenler)	HASTALIK (Bilinenler)
ABCA1	Kolesterol ve fosfolipid transportu	Tangier hastalığı Ailevi hipoalfalipoproteinemia
ABCA2	İlaç resistansı	Bilinmiyor
ABCA4	Çubuk fotoreseptör retinoid transportu	<i>Stargardt/fundus flavimaculatis</i> Retinitis pigmentosa, Koni-çubuk distrofisi Yaş bağımlı maküler dejenerasyon
ABCB1	İlaç resistansı	Bilinmiyor
ABCB2	Peptid transportu	İmmün eksikliği
ABCB3	Peptid transportu	İmmün eksikliği
ABCB4	Safra-asit transportu, kolestasis	İlerleyen ailevi intrahepatik
ABCB6	Demir transportu	Bilinmiyor
ABCB7	Demir transportu	X'e bağlı sideroblastosis ve anemi
ABCB11	Safra-asit transportu,kolestasis	İlerleyen ailevi intrahepatik
ABCC1	İlaç resistansı	Bilinmiyor
ABCC2	Safra-asit transportu	Dubin-Johnson sendromu
ABCC4	Nukleosid transportu	
ABCC6	Ca ²⁺ transportu	<i>Pseudoxanthoma elasticum</i>
ABCC7	Klorid iyon kanalı	Kistik fibroz
ABCC8	Sülfonilürea reseptörü	Bilinmiyor
ABCD1	Çok uzun yağ asidi zincir transportu	<i>Adrenoleukodystrophy</i>
ABCE1	Oligoadenilat bağlayıcı protein	Bilinmiyor
ABCG1	Kolesterol transportu	Bilinmiyor
ABCG2	İlaç resistansı	Bilinmiyor
ABCG5	Sterol transportu	Sitosterolemia
ABCG8	Sterol transportu	Sitosterolemia

2.3. ABCG TRANSPORTER GEN AİLESİ

ABCG altgrup proteinleri, yarı transporter proteinlerden olup, sitozolik N-terminal NBD ve C-terminal TMD içerirler (Şekil 2-2). İnsanlardaki ABCG üyeleri 5 adettrir: ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5 ve ABCG8. Bu transporterlar, homodimer ve heterodimer halinde bulunurlar. ABCG1, ABCG2 ve ABCG4 plazma membranında homodimer olarak bulunurken, ABCG5 ve ABCG8 plazma membranında heterodimer halinde bulunurlar. Bununla beraber yapılan çalışmalar, ABCG5 ve ABCG8'in endoplazmik retikulumda da homodimer olarak bulunduğunu göstermiştir (58, 70, 79-83).



Şekil 2-2. ABCG yarı-transporter proteinlerinin membran topolojisi (80)

ABCG1, hücrelerden kolesterol, sfingomiyelin ve fosfatidilkolinin dışarı akışını sağlarlar. ABCG4, nuklear reseptörler olan karaciğer X reseptör (liver x receptor-LXR) ve retinoid X reseptör (retinoid X receptor-RXR) tarafından uyarılır ve ABCG1 gibi HDL içinde kolesterolün taşınımını sağlar.

ABCG8 ve ABCG5 genleri kromozom 2p21’de lokalize olmuşlardır ve 13. ekzonda bulunurlar. Bu genler, kolesterolün karaciğerden atılımını düzenlerler. Karaciğer ve ince bağırsağın apikal membranından eksprese edilirler ve bu genlerdeki mutasyonlar, plazmada bitkisel kolesterollerin birikimi ile karakterize edilen ve otozomal resesif bir bozukluk olan sitosterolemia (plazma ve dokularda artmış sterol ile karakterize edilen otosomal bir lipid bozukluğu, hiperkolesterolemi, beta-sitosterolemia) (84), lipid ve kolesterol metabolizması bozuklukları ve prematüre koroner kalp hastalıklarına neden olur.

Tablo 2-6. İnsan ABCG transporter ailesi (62,74)

GEN	LOKASYON	FONKSİYON (Bilinenler)
ABCG1	21q22.3	Kolesterol transport
ABCG2	4q22	Toksin akışı, ilaç direnci
ABCG4	11q23	
ABCG5	2p21	Sterol transport
ABCG8	2p21	Sterol transport

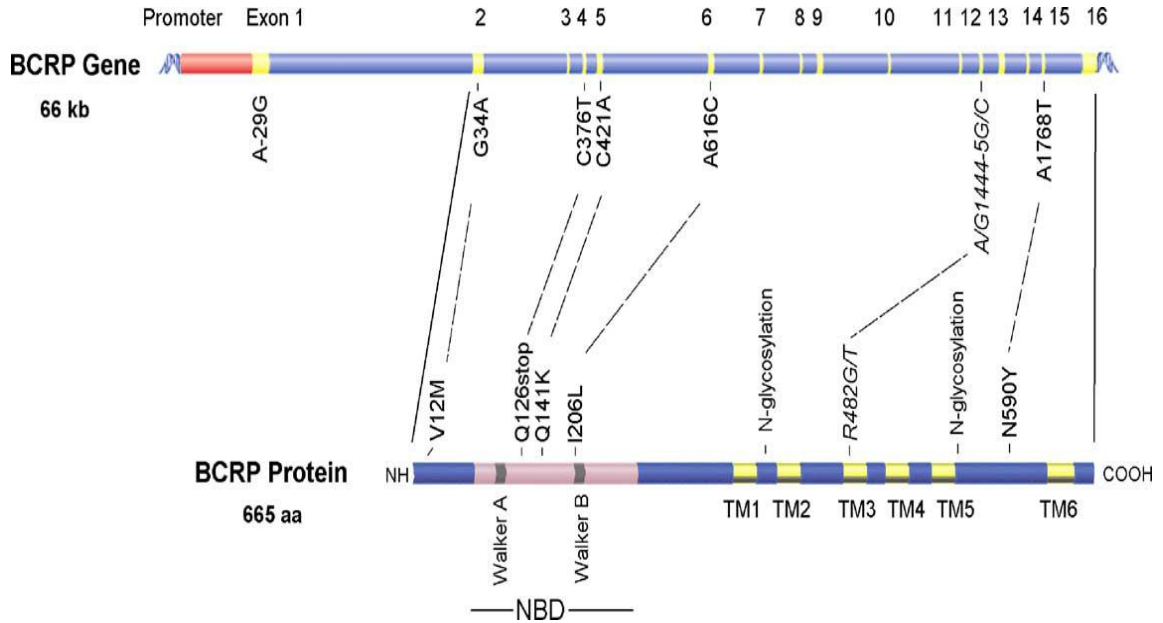
2.4. ABCG2 (BCRP, BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN, MEME KANSERİ DİRENÇ PROTEİNİ) GENİ

Meme Kanseri Direnç Proteini (Breast Cancer Resistance Protein, BCRP) olarak ta bilinen ABCG2, bir ATP bağlanma domeni ve bir transmembran domenden oluşan ATP transporterıdır. BCRP ilk defa Doyle ve arkadaşları (1998) tarafından dextrorubicin-resistant MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında klonlanıp keşfedilince meme kanseri direnç proteini olarak isimlendirilmiştir (85,86). Daha sonra yapısal ve dizi homoloji analizlerine göre ABCG ailesine ait olduğu belirtilmiş ve ABCG2 olarak adlandırılmıştır.

Enerji bağımlı bir akış pompası ve transporter olarak, toksik bileşikler ve antikanser ilaçların da olduğu, geniş aralıktaki yapısal olarak birbirinden farklı substratların intraselüler kompartmandan, ekstraselüler kompartmana transportunu

gerçekleştirir. Bundan dolayı ABCG2, ksenobiyotikler ve onların metabolitlerinden koruyucu rol oynar ve antikanser ilaçların intraselüler konsantrasyonunu etkiler (87,88).

ABCG2 geninin yüksek oranda korunmuş olduğu kuşlar, sürüngenler ve balıkların da dahil olduğu şimdiye kadar dizilenmiş tüm omurgalılarda görülmüştür (89). İnsan ABCG2 geni kromozom 4 üzerinde 4q21-4q22 lokasyonda, 16 ekzon ve 15 introndan oluşan 66 kb'lık bir gendir. Ekzon büyüklükleri 60bp ile 532 bp arasında değişiklik göstermektedir. ABCG2 proteini, 72 kDa'luk bir protein olup, 665 amino asitten oluşmaktadır (85,86,90) (Şekil 2-3).



Şekil 2-3. İnsan BCRP geni genomik organizasyon ve BCRP proteini primer yapısının diagramı (91)

ABCG2 proteini, diğer ABCG ailesi üyeleri gibi yarım bir transporterler, ancak heterodimerize olarak fonksiyon gören ABCG5 ve ABCG8'den farklı olarak homodimerize veya oligomerize olarak fonksiyon gösterdiğine inanılmaktadır (92-95).

Normal dokulardaki ABCG2 ekspresyonu araştırıldığında, en yüksek oranda plasentada, daha düşük olarak beyin, kolon ve ince bağırsak epitelinde, karaciğer kanalikör membranında, memenin kanal ve lobüllerinde ve normal dokuların ven ile kapiler endotelinde olduğu ortaya çıkarılmıştır (86-88, 96). Ayrıca kalp, akciğer, iskelet kası, böbrek, dalak ve timusta ekspresyon görülmemiştir (97). Bununla birlikte yapılan

diğer bir çalışmada northern blot analizine göre, sentral sinir sistemi, karaciğer, adrenal bez, plesenta, prostat, testisler ve uterusda de yüksek oranda ABCG2 seviyelerine rastlanmış, daha düşük oranda mide, akciğer, böbrek ve pankreasta tespit edilmiştir (98).

Plesentadaki tahmini koruyucu rolüne zıt olarak bazı çalışmalarda ABCG2'nin süt bezlerinde toksinlerin sütteki konsantrasyonunu arttırdığı ortaya çıkarılmıştır. Fareler, inekler ve insanlarda laktastondaki süt bezlerinde ABCG2 anlatımının arttığı gösterilmiştir. ABCG2-eksik farelerde, normal olanlara oranla sütlerindeki ABCG2 substratlarından topotecan ve 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) seviyesinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (99).

ABCG2, mitoxantrone (MXR), SN-38, topotecan, ile gibi antikanser ilaçlara direnç tavrı gösterir (94,100-103). Bununla birlikte ABCG2'nin keşfinden sonra substratları ve inhibitörlerinin listesi sürekli genişlemektedir (Tablo 2-7).

Tablo 2-7. ABCG2 substrat ve inhibitörleri (104)

Substratlar
9-aminocamptothecin, abacavir, bisantrene, BNP1350, chlorin E6, CI1033, ciprofloxacin, cladribine, daunorubicin, diflomotecan (BN-80915), dipyridamole, doxorubicin, DX-8951f, edevarbonate (metabolites), epirubicin, erlotinib, etoposide, flavopiridol, gefitinib, gimatecan, glyburide, GW1843, heterocyclic amines, homocamptothecin, imatinib, J-107088, JNJ-7706621, leflunomide, methotrexate, mitoxantrone, NB-506, nelfinavir, nitrofurantoin, norfloxacin, ofloxacin, olmesartan, pheophorbide A, pitavastatin, posuvastatin, protoporphyrin IX, pyropheophorbide A, SN-38 (irinotecan metabolite), sulfasalazine, teniposide, tomudex, topotecan, triglutamate, UCN-01, zidovudine
İnhibitörler
17-β-estradiol, 6-prenylchrysin, abacavir, acacetin, amprenavir, atazanavir, biricodar (VX-710), chrysin, CI1033, curcumin, cyclosporin A, delavirdine, diethylstilbestrol, dihydropyridines, dipyridamole, efavirenz, elacridar (GF120918), estrone, fumitremorgin C (FTC), gefitinib, genistein, ginsenosides, imatinib, Ko143 (FTC analog), lopinavir, naringenin, nelfinavir, nicardapine, nimodipine, nitrendipine, novobiocin, ortataxel, pantoprazole, quercetin, reserpine, ritonavir, rosuvastatin, saquinavir, silymarin, sirolimus (rapamycin), tacrolimus, tamoxifen, tariquidar (XR9576), techochrysin, tryprostatin A, WK-X-34

ABCG2 ekspresyonunun kanser hücrelerinde ilaç direnç fenotipi göstermesinden sonra, ilgili çalışmalar kanserde ABCG2 nin ilaç direncindeki rolünün belirlenmesine yönelik olarak yoğunlaşmıştır. İlk yapılan çalışmalardan birinde, ABCG2'nin lösemide ilaç direnci ile ilgili rol oynadığını sunulmuştur (105). Meme kanseri çalışmalarında hastalıkta ABCG2 ekspresyonunun genelde düşük olduğu rapor edilmiştir (88). Kanserde ilaç direnci ile ilgili olarak ABCG2'nin rolünün doğru bir şekilde belirlenmesi için daha geniş çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada, ABCG2'nin kanser hücrelerinin proliferasyonunda rolü olabileceği belirtilmiştir. Çalışmada, gen spesifik SiRNA veya kimyasal inhibitörlerle ABCG2'si baskılanan hücrelerin hücre proliferasyonunun azaldığı ve hücre siklusu gelişimin G0/G1 fazında bir tutulmaya sebep olduğu bildirilmiştir (106).

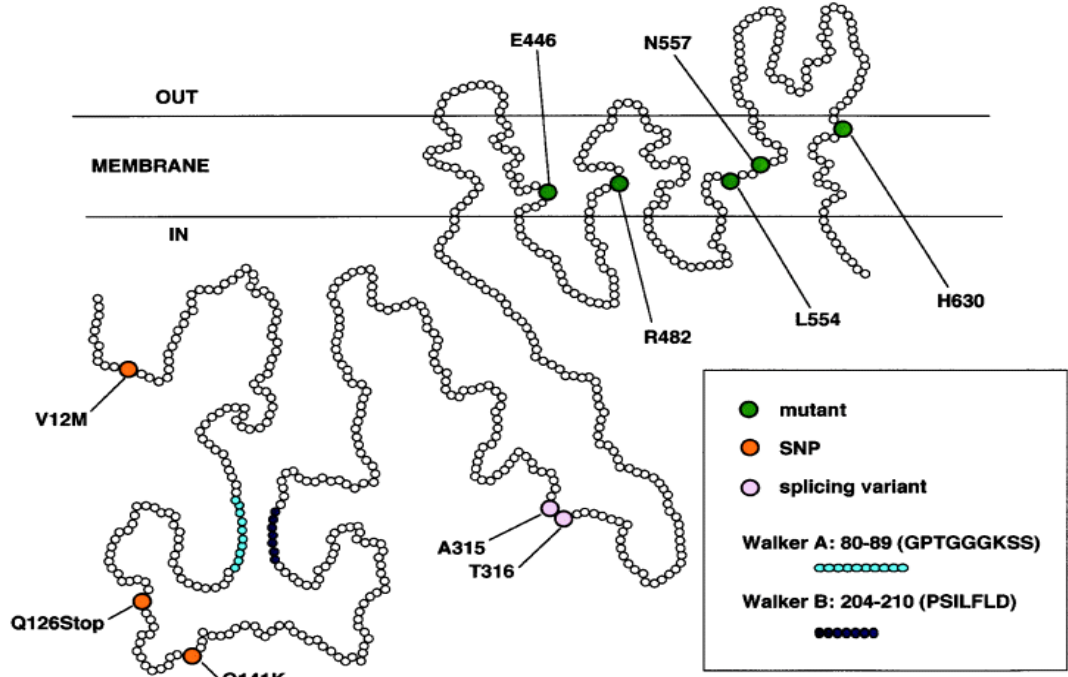
2.4.1. ABCG2 Gen Polimorfizmleri

ABCG2 geninde doğal olarak oluşmuş seksenin üzerinde dizi varyasyonu rapor edilmiştir (107). Çeşitli etnik gruplarda doğal olarak oluşan ABCG2 tek nükleotid polimorfizmleri tanımlanmıştır. Bunlardan en çok çalışılanları G34A (Val12Met, V12M), C421A (Gln141Lys, Q141K) ve C376T (Gly126stop, Q126stop)'dir (Şekil 2.4).

Bir çok etnik popülasyonda yüksek oranda görülen ABCG2 G34A ve C421A polimorfizmlerinin ABCG2 proteininin ekspresyonu ve aktivitesi ile alakalı olduğu gösterilmiştir.

Bunlardan 421 C>A SNP'si geniş oranda çalışılmıştır. C421A SNP'si fonksiyonel olarak önemli olan ATP bağlanma bölgesinde Walker A ve B motifleri arasında oluşur ve nötral glutamin kalıntısının pozitif yüklü lizin kalıntısına dönüşümü (Q141K) ile sonuçlanır. Q141K mutant A alleli azalmış plazma membran ABCG2 ekspresyonu, azalmış ilaç transportu veya indirgenmiş ATPaz aktivitesi ile bağlantılandırılmıştır (87,108-110). Ayrıca, C421A allel sıklığı çeşitli toplumlar arasında büyük bir değişiklik gösterdiği için önemli bir polimorfik variant olarak gösterilmektedir (111). Çeşitli çalışmalarda bu polimorfizmin topotecan, diflomotecan

ve 9-aminocamptothecin gibi kemoterapik ajanların farmakokinetiğini değiştirdiği gözlenmiştir (112-113). G34A SNP'si N-terminal domen üzerinde bulunur ve valin kalıntısının metyionin kalıntısına dönüşümü ile sonuçlanır. Yapılan bir çalışmada domuz böbrek epitelyal hücre hattında (LLC-PK1) G34A mutant varyantının doğal tip varyanta göre, intraselluler ilaç birikimini arttırma yoluyla bu hücrelerde ilaç direncini azaltmakta olduğu rapor edilmiştir (87).



şekil 2-4. BCRP proteinin şematik yapısı, SNP, splicing varyantlar ve aminoasit değişikliklerinin pozisyonları (115).

Çalışmamızda, Türk toplumundaki meme kanserli vakalarda ve sağlıklı kontrollerde, BCRP protein seviyesinin ve bu gende yer alan kritik gen polimorfizmlerinden G34A (Val12Met, rs2231137) ve C421A (Gln141Lys, rs2231142) polimorfizmleri incelenerek, genotip ve allel frekanslarının saptanması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI

Çalışmada meme kanserli ve sağlıklı kontrol grubu olmak üzere iki farklı grup kullanılmıştır. Meme kanserli bireyler, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Cerrahi Kliniği tarafından takip edilen kadın hastalardan seçilmiştir. Hastaların klinik parametrelerine göre değerlendirilmeleri, kan örneklerinin sağlandığı klinik tarafından yapılmıştır. Buna göre, mamografi, ultrasonografi ve patolojik testlerle meme kanseri teşhisi konulan 128 kadın hasta çalışma grubuna alınmıştır. Kontrol grubu ise, herhangi bir patolojik bulgusu, malign ya da selim tümörü ve tercihen ailesinde tümör hikayesi olmayan 106 sağlıklı kadın bireyden oluşturulmuştur.

ABCG2 gen polimorfizmi için, çalışma ve kontrol grubundaki bireylerden çalışma etiği göz önünde tutularak alınan kan örnekleri steril tüplere aktarılmıştır. Serumlar o gün içerisinde ayrılmış ve serum konulan tüpler -80 C lik derin dondurucuda çalışma yapılncaya kadar saklanmıştır. DNA'lar, en geç bir gün içerisinde çalışılmak suretiyle elde edilmiş ve oda ısısında saklanmıştır.

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Agaroz (Invitrogen, 16500100), Asetik asit (MECK K-04134156), Borik asi (Sigma B-6768), Bromfenol blue (Sigma B-6896), EDTA (Merck K-90602121), Etanol (%99 Merck), Etidyum Bromid (Sigma E-8751), Hidroklorik asit (% 37 Merck K-13190114), İzopropanol, Primerler (Invitrogen), Sodyum dodesil (lauryl) sülfat (Sigma L-5750), Sodyum hidroksit (Merck C754962), Sodyum klorür (Carlo Erba 368257), Trizma baz (Sigma T-1503), dNTP seti (Intronbio), Taq polimeraz (Intronbio), DNA marker (Intronbio), restriksiyon enzimleri (Fermentas).

3.3. KULLANILAN GEREÇLER

Elektroforez için güç kaynağı (E-C apparatus Corporation, E-C4000P), Hassas terazi (Mettler), Görüntüleme sistemi (EL LOGIC 100, Kodak), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifüj (TDX), PZR aleti (Longgene Scientific), pH metre (Hanna), Pipet takımı (Eppendorf), Falkon santrifüj (Hereaus), Su banyosu (Elektromag), Vorteks (Nuve mix), Elektroforez Sistemi (LKB 2013 miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxiphor electrophoresis), Derin dondurucu (-80°C) (Regal), Buzdolabı (+4°C)(Arçelik), Santrifüj (Nüve Mf 048), Elısa plate okuyucu, Nanodrop.

3.4. ÇÖZELTİLER

3.4.1. AGARoz ELEKTROFOREZİNDE KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.4.1.1. 0,5 M Disodyumetilendiaminteraasetat (EDTA) (pH 8.0)

186,1 gram Etilendiamintetraasetat (EDTA) tartılarak beher içine alındı ve 800 ml distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü ve pH'sı NaOH çözeltisi ile 8.0'e ayarlanarak distile su ile 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.2. 1 M Tris Tamponu (Stok)

121,1 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 42 µl hidroklorik asit (HCl) ile yaklaşık 800 mililitre distile su eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü. Daha sonra balon jojeye aktarıldı ve 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.4.1.3. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5X)

20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS, 0.2 mililitre 0.5 M ,etilendiamintetraasetat, 1 mililitre 1M Tris (pH 8.0), 200 miligram Bromfenol blue, 200 miligram xylene cyanol tartılarak steril distile su ile 100 mililitreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

3.4.1.4. Etidyum Bromür (10 mg/ml)

1 gram Etidyum bromür tartılarak steril distile su ile 10 mililitreye tamamlandı.

3.4.1.5. Yükleme Tamponu (Loading Buffer : 6X)

Yükleme tamponu (loading buffer) olarak %40 süktroz + %0,25 bromfenol mavisi karışımı kullanıldı.

3.4.1.6. 5X Tris-Borik Asit-Etilendiamintetraasetat (TBE)

54 gram Tris baz ve 27,5 gram borik asit tartılarak beher içine aktarıldı. Üzerine 20 mililitre 0.5 M EDTA (pH 8.0) ve 800 ml. distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Çözelti balon jojeye aktarılarak 1 litreye tamamlandı ve 120°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.5.1. Periferik Kandan Serum Ayrılması

Serum ayırmak için 10 ml periferik kan örneği alınarak oda sıcaklığında 15-20 dakika kadar bekletilmiştir. Daha sonra 5000 g’de 5 dk santrifügasyona tabi tutularak, santrifügasyon işleminden sonra tüpteki serum steril bir enjektör ile alınarak 1,5 ml’lik steril polipropilen eppendorf tüplerine konulmuş ve serum konulan tüpler -80 C lik dolapta çalışma yapılncaya kadar saklanmıştır.

3.5.2. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için alınan kan örneği ticari kitteki prosedüre göre işleme tabi tutularak DNA izole edilmiştir (Invitrogen, K182001).

3.5.2.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kit İçeriği ve Hazırlık Aşaması

Invitrogen Purelink Genomic DNA Kit içeriği; RNase, Proteinaz K, PureLink Genomik Liziz/Bağlama solüsyonu, Elution Buffer, Yıkama Solüsyonu 1 ve Yıkama Solüsyonu 2, PureLink Koleksiyon tüpü.

Başlamadan önce, DNA izolasyon kiti içerisindeki yıkama solüsyonları, her etiketin üstündeki yönergelere uygun olarak PureLink Genomik Yıkama Solüsyonu 1 ve PureLink Genomik Yıkama Solüsyonu 2'ye %96-100 etanol ekledi.

3.5.2.2. Kan Örneklerinden Lizat Hazırlanması

İlk olarak su banyosu veya ısı bloğu 55°C'ye ayarlandı. 200 µl taze veya dondurulmuş kan örneği steril bir mikrosantrifüj tüpü içine alındı. Örnek içine kit ile sağlanan Proteinaz K'dan 20 µl eklendi. Daha sonra örnek içine yine kit ile sağlanan RNaz A'dan 20 µl eklendi, vortekslenerek iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi. 200 µl PureLink Genomik Liziz/Bağlama solüsyonu eklenir, homojen bir solüsyon eklemek için vorteksleyerek iyice karıştırıldı. Protein digesyonunu ilerletmek için 55°C'de 10 dk. inkübe edildi. Lizata 200 µl %96-100 etanol eklendi. Homojen bir solüsyon elde etmek için vorteksleyerek 5 saniye iyice karışması sağlandı. Daha sonra DNA'ya bağlanma aşamasına geçildi.

3.5.2.3. DNA'ya Bağlanma

Koleksiyon tüpü içinde sağlanan spin kolonu paketten çıkarıldı. Genomik Liziz/Bağlama solüsyonu ve etanol ekli lizatı (~640 µl) PureLink spin kolona eklendi. Kolon, 1 dk. oda sıcaklığında 10.000xg'de santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünü atılarak kit ile sağlanan yeni bir PureLink Koleksiyon tüpü içine yerleştirildi. DNA yıkama aşamasına geçildi.

3.5.2.4. DNA Yıkama Aşaması

Kolona, etanol ile hazırlanan yıkama solüsyonu I'den 500 µl eklendi. Kolonu 1 dk. oda sıcaklığında 10.000xg'de santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünü atılarak kolon, kit ile sağlanan yeni bir PureLink Koleksiyon tüpü içine yerleştirildi. Kolona etanol ile hazırlanan Yıkama solüsyonu II'den 500 µl eklendi ve oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dk. santrifüj edildikten sonra toplama tüpü ayılarak DNA elüsyon aşamasına geçildi.

3.5.2.5. DNA Elüsyon Aşaması

Kolonu steril bir 1.5 ml mikrosantrifüj tüp içine konudu. Üzerine 25-200 µl PureLink Genomik Elüsyon Çözeltilisi eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk. İnkübe edildikten sonra, oda sıcaklığında maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpte toplanan purifiye genomik DNA saklandı. Daha fazla DNA kurtarmak için kolon yeni

bir steril 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve aynı miktarda elüsyon çözeltisi kullanarak ikinci bir elüsyon aşaması yapıldı. Elde edilen pürifiye genomik DNA - 20°C’de saklandı.

3.5.2.6. Elde Edilen DNA’nın Konsantrasyon ve Kalitesinin Tayini

Spektrofotometrik olarak 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerle DNA’nın saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. 50µg/ml çift iplikçikli DNA içeriğinin 260 nm dalga boyunda 1 optik densite (OD) verdiği kabul edilmektedir. 260 nm’deki ölçüm değeri aşağıdaki formüle uygulanarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

DNA Konsantrasyonu: $OD_{260} \times 50\mu\text{g/ml}$

DNA örneklerinin saflığı OD_{260}/OD_{280} oranı kullanılarak belirlendi. Yeterince iyi saflıkta kabul edilen DNA’nın OD_{260}/OD_{280} değeri yaklaşık 1.8’dir. Ortamda fenol veya protein mevcutsa bu oran 1.8’den küçük olacaktır. OD_{260}/OD_{280} değeri 2’den büyükse ortamda RNA bulunduğu anlamına gelmektedir.

3.5.3. ABCG2 Geninin N-terminal 2. Ekzon Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction -PCR) Yöntemi İle Çoğaltılması

ABCG2 geninde G34A polimorfizminin görüldüğü N-terminal 2.ekzon bölgesini çoğaltmada kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir (116).

İleri primer: 5’-AAT CTC ATT TAT CTG GAC TAT CAA C-3’

Geri primer: 5’-TCG ATAATATTT CTT TCT CAA CTG-3’

3.5.4. ABCG2 Geninin NBD 5.Ekzon Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi İle Çoğaltılması

ABCG2 geninde C421A polimorfizminin gözlemlendiği NBD 5.ekzon bölgesini çoğaltmada kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir (116).

İleri primer: 5'-TCATTATGT CTC ATTAAG ATG CTAT-3'

Geri primer: 5'-GGA CAC AGG GAAAGT CCTAC-3'

3.5.5. PCR'da Kullanılan Kimyasal Maddeler ve PCR'ın Hazırlanışı:

DNA Taq polimeraz enzimi (5U/μl) (Intronbio 25022)

PCR reaksiyonundaki son konsantrasyonu 1 unite olacak şekilde 25 μl lik PCR reaksiyonuna eklendi.

dNTP'ler (100 μmol/ml) (Intronbio 32111)

100 mM' lık dNTP' lerden (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10' ar μl alınıp (toplam 40 μl) 1500 μl' lik tüpe kondu ve üzerine 960 μl distile su eklenerek (d₂H₂O) 1000 μl 1mM' lık dNTP karışımı hazırlandı ve -20 °C derin dondurucuda saklandı. PCR reaksiyonuna bu stoktan alınan dNTP karışımı kullanıldı.

3.5.5.1. PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) Karışımının Hazırlanışı :

Toplam reaksiyon hacmi 25 μl olacak şekilde, ABCG2 G34A için tablo 3-1' ve C421A için tablo3-2'deki bileşenler sırası ile 0,5 ml'lik steril tüpe konuldu. 10 örnek çalışılacak ise pozitif ve negatif kontrol için birer tane ve pipetleme hataları için de bir tane olmak üzere toplam 13 üzerinden reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR karışımının hazırlanma işlemlerinin hepsi buz üzerinde soğukta ve steril kabin içerisinde yapıldı.

Tablo 3-1.ABCG2 G34A PCR reaksiyonu karışımının hazırlanması

Malzemeler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	Kullanılan hacim	13' lük reaksiyon
PCR Tamponu	10 X	1X	2,5 µl	32,5 µl
dNTP	1mM	200 µM	1,5 µl	19,5 µl
İleri primer	100pmol/µl	10 pmol/µl	0,8 µl	10,4 µl
Geri primer	100pmol/µl	10 pmol/µl	0,8 µl	10,4 µl
MgCl ₂	25 mM	-	1,5 µl	19,5 µl
Taq polimeraz	5U/ µl	-	0,4 µl	5,2 µl
Distile su	-	-	16,5 µl	214,5 µl
DNA	-	150-200 ng.	1 µl	-

Tablo 3-2.ABCG2 C421A PCR karışımının hazırlanması

Malzemeler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	Kullanılan hacim	13' lük reaksiyon
PCR Tamponu	10 X	1X	2,5 µl	32,5 µl
dNTP	1mM	200 µM	1,5 µl	19,5 µl
İleri primer	100pmol/µl	10 pmol/µl	0,8 µl	10,4 µl
Geri primer	100pmol/µl	10 pmol/µl	0,8 µl	10,4 µl
MgCl ₂	25 mM	-	1,5 µl	19,5 µl
Taq polimeraz	5U/ µl	-	0,4 µl	5,2 µl
Distile su	-	-	16,5 µl	214,5 µl
DNA	-	150-200 ng.	1 µl	-

Taq polimeraz eklendikten sonra hiç vakit kaybetmeden tüp içine konan bileşenlerin iyice karışması için pipetleme işlemi yapıldı. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 24 µl reaksiyon karışımı dağıtıldı. Daha sonra her tüpe 1 µl DNA eklenerek yeniden pipetleme yapıldı ve daha önceden 95 °C sıcaklığa çıkarılmış PCR cihazına (Longgene Scientific) örnekler yerleştirildi ve PCR işlemi başlatıldı.

3.5.5.2. PCR Şartları

ABCG2 geni ekzon 2 bölgesinin çoğaltılmasında, ileri ve geri primerler için kullanılan annealing derecesi 57 °C olarak kullanıldı (Tablo 3-3).

Tablo 3-3.ABCG2 geni ekzon 2'nin G34A bölgesi PCR reaksiyonu termal profil şartları

95°C	5 dakika	
94 °C	45saniye	35 döngü
57 °C	45 saniye	
72°C	45saniye	
72°C	5dakika	

ABCG2 geni ekzon 5 bölgesinin çoğaltılması için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi 56°C olarak kullanıldı (Tablo 3-4).

Tablo 3-4.ABCG2 geni ekzon 2'nin C421A bölgesi PCR reaksiyonu için termal profil şartları

95 °C	5 dakika	
94 °C	45 saniye	35 döngü
56 °C	45 saniye	
72°C	45 saniye	
72°C	5 dakika	

3.5.6. Agaroz Jel Elektroforezinin Uygulanması

3.5.6.1. %2'lik Agaroz Jel Hazırlanması:

- 4 gr. agaroz (Sigma) tartılarak erlen içine konuldu. Üzerine son hacim 200 ml. olacak şekilde 1X TBE tamponu eklenerek, mikrodalga fırında kaynatma yolu ile çözündürüldü.
- Erlenin sıcaklığı elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde (50-55°C) çözülmüş agaroz jel içine 4.5 µl etidyum bromür (10mg/ml) ilave edildi.
- Hazırlanan jel yatay jel yatağı içine dökülerek, yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilerek donmaya bırakıldı.
- Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel örnek yüklenmesi için hazır duruma geldi.

3.5.6.2. PCR Ürünlerinin %2'lik Jel'e Yüklenmesi:

- %2'lik jel hazırlandıktan sonra 1X TBE tamponu içeren jel tankı içine uygun şekilde konuldu.
- Agaroz jelin üzerini 2-3 ml gelecek şekilde 1X TBE tamponu jel üzerine eklendi.
- 7 µl PCR ürününe, 3 µl yükleme tamponu (6X) eklenip pipetleme yapılarak karıştırıldı. 10 µl'lik örnek karışımı kuyucuklara sırasıyla yüklendi.

- Yükleme işleminden sonra jel tankının kapağı kapatıldı. Güç kaynağı (E-C apparatus Corporation, E-C4000P) 250 miliamper 120 volt elektrik gücüne ayarlanarak elektroforez jel yürütülmesi gerçekleştirildi.

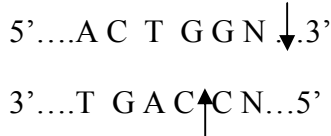
3.5.6.3. PCR Ürünlerinin Kontrolü

ABCG2 genine ait istenilen bölgelerin, PCR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacı ile her iki bölge için de ayrı ayrı PCR tüpünden alınan 7 µl örnek 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak yukarıda tanımlanan elektroforez sisteminde yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel UV ışık altında (304 nm dalga boyunda) PCR ürünleri incelendi ve fotoğrafı UV transillüminator düzeneğinde çekildi. PCR reaksiyonları sonucu ABCG2 geni G34A için 264bp (baz çifti, bp) lık bir ürün ve C421A için 246bp lık bir ürün elde edilmesi beklendi.

3.5.7. ABCG2 Geni 2 İnci Ekzon Bölgesinin PCR Ürünlerinde Bsr I Enzim Kesimi

3.5.7.1. Bsr I Enzim Kesiminde Kullanılan Enzimler ve Kimyasal Maddeler:

Bsr I Kesim enzimi (10U/µl): (Fermentas ER0881) Bsr I enzimi 10X Buffer Tango ile birlikte kullanıldı. Bsr I enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



3.5.7.2. Bsr I Enzim Kesimi

PCR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacmi 10 µl olacak şekilde restriksiyon enzim kesimi tablo 3-5'de belirtilen çözeltilerin ve Bsr I enziminin sırasıyla eklenmesi ile gerçekleştirildi.

Tablo 3-5.Bsr I enzim kesiminde kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları

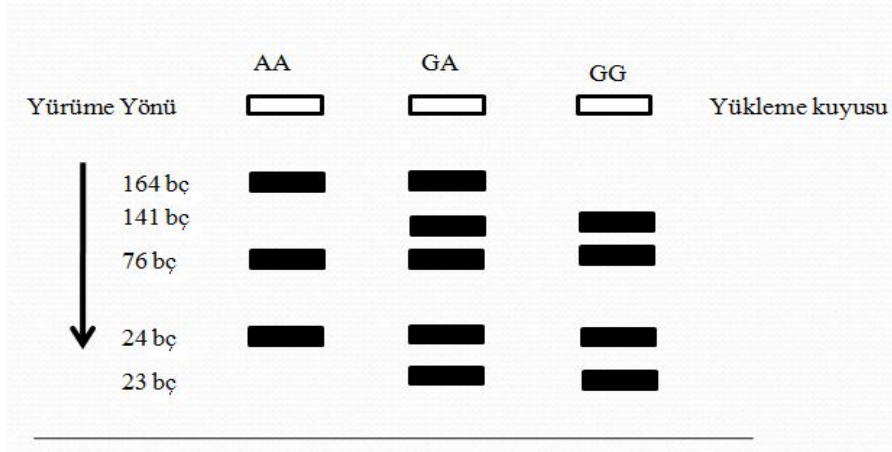
Malzemeler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	Eklenen hacim
PCR ürünü			5 µl
Distile su			4 µl
10X Buffer Tango Tamponu	10 X	0,8 X	0,7 µl
Bsr I enzimi	10 U/µl	5 U/µl	0,3 µl

3.5.7.3. Bsr I Enzim Kesim Ürünlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü

- %3'lik agaroz jel hazırlandı.
- Bsr I kesim enzimi ile kesilen PCR ürününden 8 µl ve yükleme tamponundan 2 µl alınarak karıştırılıp %3'lük agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı.
- Kesim ürünleri (Intronbio, 50 bç marker) DNA moleküler marker ile birlikte yürütüldü.
- Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, UV ışık (304 nm) altında incelendi.

3.5.7.4. Bsr I Enzim Kesimi Değerlendirilmesi

ABCG2 G34A mutasyonu varlığında PCR ile çoğaltılan bölgede birden fazla Bsr I kesim bölgesi oluşmaktadır. A/A genotipi için, PCR ürünleri 164 bç, 76 bç ve 24 bç büyüklüğünde üç bant verirken, homozigot G/G genotipi içeren PCR ürünleri, enzim kesimi sonrası 141 bç, 76 bç, 24 bç ve 23 bç olmak üzere dört bant verir. Heterozigot G/Agenotipi içermesi durumunda ise, kesim sonrası PCR ürünleri 164, 141, 76, 24 ve 23 bç olmak üzere beş bant verir (Şekil 3-1).



Şekil 3-1. Bsr I enzim kesimi sonrası oluşabilecek DNA parçalarının %3'lük agaroz jelde çıkabilecek bant şeklinin şematik görüntüsü

3.5.8. ABCG2 Geni 5. Ekzon Bölgesinin PCR Ürünlerinde Taa I Enzim Kesimi

3.5.8.1. Taa I Enzim Kesiminde Kullanılan Enzimler ve Kimyasal Maddeler:

Taa I Kesim Enzimi (10U/ µl) : (Fermentas ER1361) Taa I kesim enzimi 10X Buffer ile birlikte kullanıldı. Taa I enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



3.5.8.2. Taa I Enzim Kesimi

PCR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacmi 12,5 µl olacak şekilde restriksiyon enzim kesimi tablo 3-6'da belirtilen çözeltilerin ve Taa I enziminin sırasıyla eklenmesi ile gerçekleştirildi.

Tablo 3-6.Taa I enzim kesiminde kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları

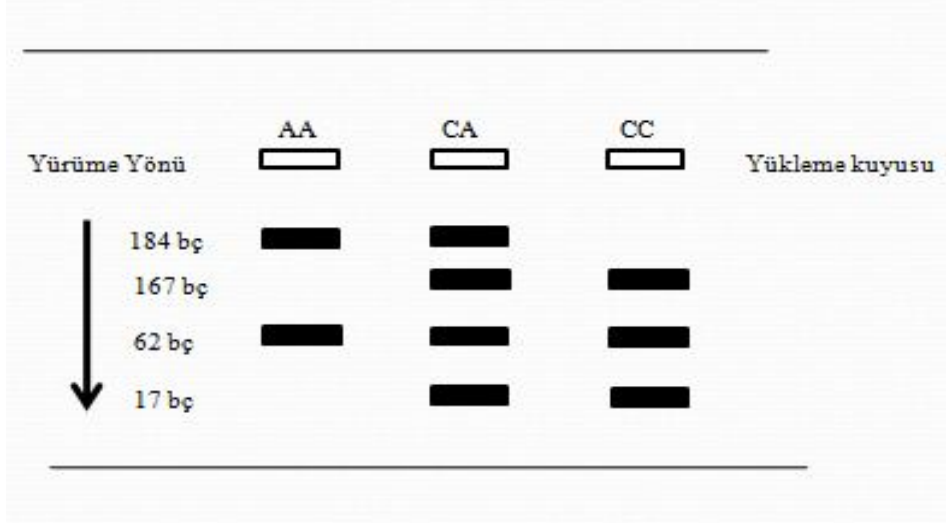
Malzemeler	İlk konsantrasyon	Son konsantrasyon	Eklenen hacim
PCR ürünü			7,0 µl
Distile su			4,6 µl
10X Buffer Tamponu	10 X		0,5 µl
Taa I enzimi	10 U/µl	5 U/µl	0,4 µl

3.5.8.3. Taa I Enzim Kesim Ürünlerinin Değerlendirilmesi ve Kontrolü

- %3'lük agaroz jel hazırlandı.
- Taa I kesim enzimi ile kesilen PCR ürününden 8 µl ve yükleme tamponundan 2 µl alınarak karıştırılıp %2,5'lik agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı.
- Kesim ürünleri (Intronbio 50 bç marker) DNA moleküler marker ile birlikte yürütüldü.
- Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, UV ışık (304 nm) altında incelendi

3.5.8.4. Taa I Enzim Kesimi Değerlendirilmesi

PCR ile çoğalttığımız bölgede birden fazla Taa I kesim bölgesi oluşmaktadır. Kesim reaksiyonu sonucunda, ABCG2 C421A polimorfizmi AA genotipi içeren ürünler için jelde 184 ve 62 bç' lik iki bant görünmektedir. Heterozigot CA genotipi için 184, 167, 62 ve 17 bç' lik dört bant görülürken, homozigot CC genotipi için 167, 62 ve 17 bç' lik üç bant görülür (Şekil 3-2).



Şekil 3-2. Taa I enzim kesimi sonrası oluşabilecek DNA parçalarının %3'lük agaroz jelde çıkabilecek bant şeklinin şematik görüntüsü

3.5.9. ABCG2 Serum Düzeyleri Tayini

ABCG2 serum düzeyi tayini için daha önce ayrılan ve -80 °C'de saklanan serum örnekleri, ticari kitteki prosedüre göre işleme tabi tutularak serum düzeyleri tayin edilmiştir (USCN Life, SEA960Hu, Lot No: L130812300).

Elisa prosedürüne başlamadan önce serum örnekleri ve elisa kiti 30-60 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından Biotin antikoru ve HRP-avidin kit içerisinde bulunan dilüsyon solüsyonları kullanılarak 1:100 oranında seyreltilmiştir. Yıkama solüsyonu da distile su kullanılarak 1:25 oranında dilüe edilerek hazırlanmıştır. Prosedüre uygun olarak örnek dilüsyon solüsyonu kullanılarak standartlar da hazırlanılarak prosedüre başlanmıştır.

İlk aşamada, plate kuyularına 100 ul standartlar ve serum örnekleri belirlenen kuyulara ayrı ayrı eklenerek 37°C'de 2 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından yıkama yapmadan plate üzerindeki kuyular boşaltılarak her kuyuya 100 ul biotin antikoru eklenmiş ve 37°C'de 1 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu kuyular boşaltılarak 3 kere yıkama solüsyonu ile yıkama yapılmıştır. 3. yıkamanın ardından kuyuların her birine 100 ul HRP-avidin ilave edilerek 37°C'de 30 dakika inkübasyon başlatılmıştır. Ardından kuyular boşaltılarak 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkama gerçekleştirilmiştir. 5. yıkamadan sonra kuyular boşaltılarak 90 ul

TMB substratı eklenerek karanlık ortamda 15-30 dakika reaksiyonun gerçekleşmesi beklenmiştir. Reaksiyonun sonlandırılması için 50 ul stop solüsyonu eklenerek 5 dakika içinde 450 nm dalga boyunda Elisa Plate okuyucu da absorbanlar okunmuştur. Standartların absorbanları kullanılarak standart eğri grafiği çizilmiş ve serum örneklerinin hesaplamaları yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir

3.5.10. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 11.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak alınmıştır. ABCG2 G34A ve C421A polimorfizmlarına ait genotip ile allellerinin görülme sıklığının, gruplar arası farklılıklarla beraber değerlendirilmesi için Ki kare (χ^2) ve Fisher testi kullanılmıştır. Allel frekansları gen sayma metoduna göre yapılmıştır. Gruplar arası demografik verilerin karşılaştırılmasında Student't ve Mann Whitney U testleri kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONRASINDA ELDE EDİLEN BULGULAR

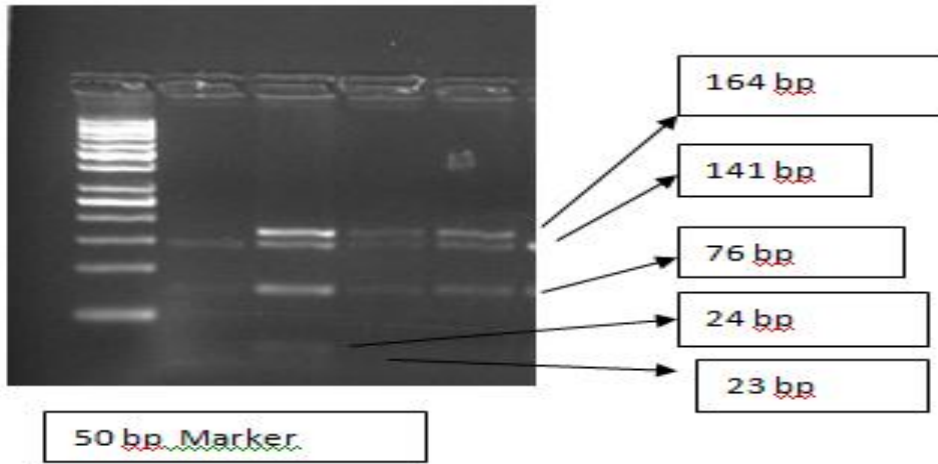
Çalışmamıza, 128 meme kanseri ve 106 sağlıklı kadın kontrol grubu olmak üzere iki grup dahil edilmiştir. Hasta ve çalışma grubumuzun yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Hasta grubumuzun yaş ortalaması $50,11\pm13,14$ iken kontrol grubumuzun yaş ortalaması $52,99\pm11,59$ olarak saptanmıştır. Hasta grubumuza ait klinik parametreler Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

Tablo 4-1. Hasta grubuna ait klinik parametreler

Klinik parametreler	N (%)
T Evreleme	
T1	37 (%37.4)
T2	48 (%48.5)
T3	10 (%10.1)
T4	4 (%4)
N Evreleme	
N0	48 (%48.5)
N1	25 (%25.3)
N2	17 (%17.2)
N3	9 (%9.1)
Perinöral invazyon varlığı	19 (%29,7)
Perigangliyal invazyon varlığı	16 (%25.4)
Kapsüler invazyon varlığı	39 (%75)
Ailede kanser hikayesi	16 (%34)
Sigara içiciliği	15 (%39.5)
Östrojen reseptör pozitif	48 (%72.7)
Metastaz varlığı	5 (%11.4)
Menapoz varlığı	39 (%75)

n: birey sayısı; tablodaki değerler $X\pm SD$ olarak verilmiştir; gruplararası farklılık derecesi student-t testi ve Kikare (χ^2) ile incelenmiştir; * $p<0.05$

Çalışma gruplarımızı, ABCG2 G34A ve C421A genotip ve allel dağılımlarına göre karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir bulguya rastlanılmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4-2 ve Tablo 4-3).

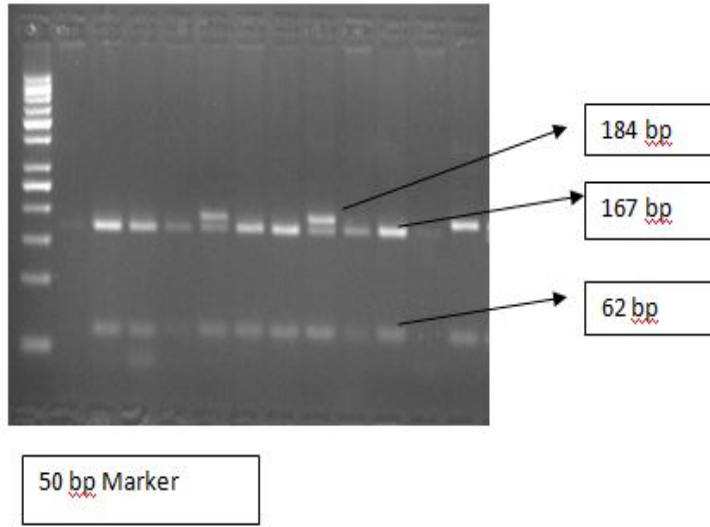


Şekil 4-1 . Bsr I enzim kesimi sonucunda ABCG2 G34A varyantlarının %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: Intronbio 50 bp marker.

Tablo 4-2. Çalışma gruplarında ABCG2 G34A polimorfizmi genotip ve allel dağılımları

	Kontrol (n:106)	Hasta (n:128)
GENOTİP		
AA	1(%0,9)	1(%0,9)
GG	83 (%78,3)	103(%80,5)
GA	22(%20,8)	24(%18,8)
ALLEL		
A	24(%11,32)	26(%10,15)
G	188(%88,68)	230(%89,85)

n: birey sayısı



Şekil 4-2. Taa I enzim kesimi sonucunda ABCG2 C421A varyantlarının %3'lük agaroz jeldeki görüntüsü. Marker: Intronbio 50 bp marker.

Tablo 4-3. Çalışma gruplarında ABCG2 C421A polimorfizmi genotip ve allel dağılımları

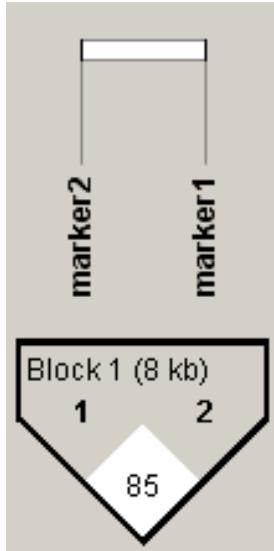
	Kontrol (n:106)	Hasta (n:128)
GENOTİP		
CC	90(%84,9)	110(%85,9)
AA	0 (%0)	2(%1,6)
CA	16(%15,1)	16(%12,5)
ALLEL		
C	196(%92,4)	236(%94,4)
A	16(%7,6)	20(%5,6)

n: birey sayısı

Bulgularımıza ait haplotip analizleri yapıldığında çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir ($D:0.85$, $LOD:0.3$, $r^2: 0.007$) (Tablo 4-4) (Şekil 4-3).

Tablo 4-4.Çalışma gruplarında ABCG2 G34A ve C421A polimorfizmlerine ait haplotip frekansları

Haplotip İlişkileri	Frekans	Hasta, kontrol oranları	X^2	p
CG	0.820	0.822, 0.817	0.016	0.898
CA	0.105	0.100, 0.112	0.175	0.675
AG	0.073	0.077, 0.070	0.085	0.770



Şekil 4-3. LD grafiği

Çalışma gruplarımızda gözlenen serum ABCG2 düzeyleri Tablo 4-5’de gösterilmiştir. ABCG2 düzeyleri açısından gruplararası anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir ($p>0.05$).

Tablo 4-5.Çalışma gruplarında serum ABCG2d düzeyleri

GRUPLAR	HASTA (n:91)	KONTROL (n:89)
ABCG2 düzeyi (ng/ml)	0,95±0,59	1,06±0,55

n: birey sayısı , Gruplararası farklılık Student t testi ile incelenmiştir.

Tablo 4-6’de çalışma gruplarında ABCG2 gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel dağılımlarına göre serum ABCG2 düzeyleri gösterilmiştir. Bulgularımıza göre GA genotipi taşıyan hastalarda serum ABCG2 düzeyleri aynı genotipe sahip sağlıklı bireylere göre azalmış olarak gözlemlenmiştir (p:0,001). Ayrıca A alleli taşıyan hastalarda da aynı şekilde serum ABCG2 düzeyleri kontrol grubu bireylere göre anlamlı düzeyde azalmış olarak saptanmıştır (p:0,001). Çalışma gruplarını kendi içinde değerlendirdiğimizde ise hasta grubunda genotip ve allel dağılımları ile ABCG2 düzeyleri arasında bir ilişki gözlemlenmemesine karşın sağlıklı grupta GG genotipine sahip bireylerde serum ABCG2 düzeyleri daha düşük olarak belirlenmiştir (p:0,003, %95Cl: 0,13-0,63). Her iki çalışma grubunda da AA genotipine sahip tek bir birey bulunduğu için AA genotipi bu değerlendirmeye dahil edilmemiştir. A alleleline sahip sağlıklı bireylerde ise serum ABCG2 düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır (p:0,003, %95Cl: 0,13-0,60). C421A genotip ve alleleri ile serum ABCG2 düzeyleri arasında gerek gruplararası gerekse grup içi karşılaştırmalar sonucunda anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir.

Tablo 4-6.Çalışma gruplarında G34A ve C421A polimorfizmleri genotip ve allel dağılımlarına göre serum ABCG2 düzeyleri

G34A polimorfizmi	Hasta (n:91)	Kontrol (n:89)
Genotip		
GG	1,01±0,58 (n:76)	0,98±0,55 (n:69)**
AA	0,80 (n:1)	0,80 (n:1)
GA	0,67±0,58(n:14)*	1,38±0,41 (n:19)
Allel		
A	0,68±0,56 (n:15)*	1,35±0,42 (n:20)*
G	0,96±0,59 (n:90)	1,06±0,55 (n:88)
C421A polimorfizmi	Hasta (n:91)	Kontrol (n:89)
Genotip		
CC	0,97±0,57 (n:76)	1,07±0,54(n:75)
AA	0,45±0,33(n:2)	0
CA	0,96±0,69 (n:13)	1,04±0,57 (n:14)
Allel		
C	0,96±0,58 (n:89)	1,06±0,55 (n:89)
A	0,89±0,68 (n:15)	1,04±0,57 (n:14)

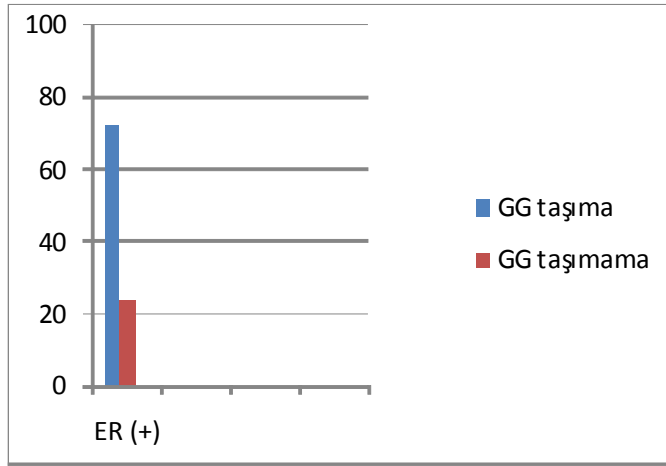
n: birey sayısı, Grup içi ve gruplar arası farklılık Mann-Whitney U ve Student t testleri ile incelenmiştir.*p:0,001, **p:0,003

Hasta grubunda genotip ve allel dağılımları ile klinik parametreler arasındaki ilişkiyi incelediğimizde kapsüler invazyon görülen hastaların tamamının G34A GG genotipine sahip oldukları gözlemlenmiştir (p:0,026) (Tablo 4-7). Ayrıca östrojen reseptör (+) hastalarda GG genotipine sahip olma sıklığının anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır (p:0,027) (Grafik 4-1).

Tablo 4-7.Çalışma grubunda kapsüler invazyon varlığında G34A polimorfizmi genotip dağılımları

G34A Genotipleri	Kapsüler İnvazyon Varlığı	
	Var (n/%)	Yok (n/%)
GG	16 (%32)*	34(%68)
GA	0(%0)	11(%100)
AA	0(%0)	1(%100)

*p:0,026



Grafik 4-1:ER (+) hastalarda G34A GG alleli taşıma sıklığı

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, farklı biyolojik özellik ve klinik davranış gösteren çok sayıda bileşeni olan heterojenik bir hastalıktır (117). Meme kanserinin biyolojik heterojenitesi, geniş genom profillemeye çalışmalarıyla aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Birçok çalışmada meme kanserli hastalar arasındaki bireysel genetik farklılıklar tanımlanmaktadır. Bu farklılıklar hastalığın prognozu ve tedaviye cevabını etkileyebilmektedir. Tedaviye direncin mekanizması meme kanseri gelişimine katılan olası genlerdeki değişikliklerin bulunmasıyla aydınlatılabilir (118).

BCRP olarak da bilinen ABCG2, bir yarı taşıyıcı olan ABCG ailesinin ikinci üyesidir. Normal dokularda ABCG2, çeşitli kanser kemoterapi ilaçları dahil potansiyel toksik substrat moleküllerinin atılımına yardım ederek, gutta, safra kanallıkları, plesanta, kan-testis ve kan-beyin bariyerlerinde ekspresyon ile toksin ve ksenobiyotiklere karşı savunma fonksiyonu gösterir. Bunun yanında ABCG2 hipoksi durumlarında normal hücrenin yaşamasına yardım ederek hem ve folat homeostasisinde anahtar bir rol oynar (119).

ABCG2 ile ilgili çalışmalar genelde klinik kanserlerde ABCG2'nin ilaç direnci üzerine yoğunlaşmıştır. ABCG2 ile atılan antikanser ilaçların spektrumu mitoksantrone, camptotecin, indocarbozole, methotrexate, flavopridol ve quinazoline gibi inhibitörleri içermektedir (120). ABCG2 tarafından ilaç birikiminin azaltılması, kanser hücrelerinin ilaç direncine dahil olmasıyla ABCG2'nin birincil hücrel mekanizması olabilir, ancak bunun yanında bir çalışmada ABCG2'nin özellikle multidrug-resistant kanser hücrelerinin proliferasyonuna dahil olduğu gösterilmiştir (104). Bu ABCG2'nin hücre siklusunu gelişimini düzenleyerek ilaç direnci kontrolüne katıldığını düşündürebilir.

Transporter moleküllerindeki varyasyonlar ile değişen ksenobiyotiklerin metabolizması bazı kanserlerin risk durumunu etkileyebilmektedir (121-125).

İnsan genomundaki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) en yaygın aktarılan dizi varyasyonları oldukları bilinmektedir. Bu polimorfizmlerin ilgili genin ve proteinin ekspresyonunu ve aktivitesini değiştirerek farklı tipteki kanserlerin hassasiyetini etkileyebilmektedir (126-130).

Araştırmacılar ABCG2 geni üzerinde sıklıkla iki polimorfizm göstermişlerdir, bunlar sırasıyla ekzon 2 üzerindeki G34A (V12M) ve ekzon 5 üzerindeki C421A (Q141K) polimorfizmleridir (107,122).

Bu çalışmamızda, ABCG2 genine ait kritik polimorfizmlerden G34A ve C421A ile meme kanseri hastalığı ve serum ABCG2 düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmıştır.

ABCG2 G34A polimorfizmi diğer etnik gruplarla karşılaştırıldığında en yüksek oranda Asya popülasyonlarında görülmektedir A alleli için, allel frekansı 0,175-0,200 dür. Beyaz ırk ve Afroamerikalılarda ise sırasıyla 0,103 ve 0,063 tür (128,131-133).

Çalışmamız sonucunda, ABCG2 G34A gen polimorfizmine ait genotip dağılımımızda % 0,9 AA, % 20,8GA, % 78,3GG bulunmuştur. Buna göre çalışmamızda A aleli frekansını 0,113, G alleli frekansını ise 0.887 olarak saptadık. ABCG2 G34A gen polimorfizmine ait allel frekanslarımız Mizuarai ve arkadaşlarının beyaz ırkta yaptıkları allel frekans bulgularıyla (A alleli için 0,103) uyumlu bulunmuştur (87).

ABCG2 C421A polimorfizminde ise, C> A değişimi en yüksek oranda Asya popülasyonlarında görülmektedir, A allel frekansı 0,278-0,342 arasındadır. A alleli frekansı, beyaz ırk ve Afro-amerikalılarda sırasıyla 0,10 ve 0,023'tür (128, 131,133,134). Bizim çalışmamızda ABCG2 C421A gen polimorfizmine ait genotip dağılımı % 84,9 CC, % 15,1CA, % 0 AA olarak bulunmuştur. Buna göre çalışmamızda A aleli frekansını 0,076, C alleli frekansını ise 0,924 olarak saptadık. ABCG2 C421 gen polimorfizmine ait allel frekanslarımız Mizuarai ve arkadaşlarının beyaz ırkta yaptıkları allel frekans bulgularına yakın(A alleli için 0,090), Uzakdoğu popülasyonlarından uzak bulunmuştur.

Sarı ve arkadaşlarının Türk toplumunda kolorektal kanserli hastalarda yaptığı çalışmaya göre, kontrol grubunda ABCG2 G34A için A alleli frekansı 0,064; G alleli frekansı 0,936 olarak tespit edilmiştir, bunun yanında ABCG2 C421A için A alleli frekansı 0,013; C alleli frekansı 0,987 olarak tespit edilmiştir (135).

Çalışma gruplarımızı ABCG2 G34A ve C421A genotip ve allel dağılımlarına göre karşılaştırdığımızda, kontrol grubu ve meme kanserli hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bulguya rastlanılmamıştır ($p>0.05$).

Çalışmamızda gerek ABCG2 G34A /C421A genotip dağılımı, gerekse de allel frekansları açısından meme kanserli hastalar ailede kanser hikayesi varlığı ve ailede

meme kanseri hikayesi varlığı göz önüne alınarak değerlendirildiğinde, herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır.

İnsan plasentasında BCRP protein seviyesinin 421A homozigot allelinde, 421C homozigot allele göre daha düşük olduğu anlamlı olarak bulunmuş ve heterozigotlarda ara değerde olduğu gösterilmiştir (128). ABCG2 G34A ve C421A genotiplerinin kanserde yatkınlık ve sağkalım ile ilişkisini araştıran çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Hu ve arkadaşlarının, Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma (DLBCL) ile ABCG2 G34A ve C421A polimorfizmlerinin hastalığın risk ve sürvisi arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında, C421A A alleli ile hastalık arasında artmış bir risk görülmüş ($p=0,042$) bununla birlikte G34A AA genotipi taşıyanlarda kötü sağkalım ile bağlantılandırılmıştır (HR, hazard ratio:3,69) (116). Başka bir çalışmada ise ABCG2 421CC homozigot genotipinin nonpapiller renal hücre karsinomunda artmış risk taşıdığı gösterilmiştir (136).

Sarı ve arkadaşlarının Türk toplumunda yaptığı çalışmaya göre, C421A polimorfizmi kolorektal kanserli hastalarda sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlılık sınırında bulunmuştur (OR:16,12 %95 CI 0.928–130.324, $P=0,005$). Bununla birlikte G34A polimorfizminde hastalarla sağlıklı kontroller arasında bir anlamlılık gözlenmemiştir ($P=0,204$) (135). Bu çalışmanın aksine Andersen ve arkadaşları kolorektal kanseri riski ile ABCG2 genotipleri arasında bir bağlantıya rastlamamışlardır, ayrıca ABCG2 C421A ile et tüketimi, sigara kullanımı ve nonsteroid antiinflatuar ilaç kullanımı arasında bir bağlantı tespit edememişlerdir (137).

Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ABCG2 G34A polimorfizminin akut lösemi hastalarında potansiyel bir bağımsız prognostik faktör olabileceği önerilmiştir. Yine aynı çalışmada 34GA/AA genotipi taşıyan hastaların 34GG genotipi taşıyan hastalara göre daha kötü bir sağkalım gösterdiği belirtilmiştir (138).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hastalarıyla yapılan başka bir çalışmada, hastalardaki ABCG2 serum düzeyi sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuş ve kemoterapiye direnç gösteren hastalarda kemoterapiye olumlu yanıt veren hastalara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır ancak ABCG2 ekspresyonunu açısından hastalar ile sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir şekilde farklılık olmadığı gösterilmiştir ($p = 0.08$)(139).

Gardner ve arkadaşlarının Hispanik olmayan beyaz ırkta yaptığı çalışmaya göre, ABCG2 C421A polimorfizmi bakımından prostat kanserli hastalarla sağlıklı kontroller arasında bir anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Ancak, wild tip ABCG2 C421A (CC genotipi taşıyan) olanların hetero veya homozigot varyanta sahip olanlara göre daha uzun bir survi gösterdikleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (7,4 yıl; 5,3 yıl $p=0,044$)(140). Yine aynı çalışmada in vitro olarak, ABCG2 polimorfizmine sahip trasfekte insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293), bu polimorfizmi taşımayan wild tip hücelere göre, hücre içi PhIP birikiminin %80 daha fazla olduğu görülmüştür.

Müller ve arkadaşlarının beyaz ırkta yaptıkları çalışmaya göre, akciğer kanserli hastalarda ABCG2 C421A A alleli taşıyanlarda platinium bazlı ilaç kullanımıyla kötü bir genel sağkalım (overall survi) gözlemlenmiştir (HR:1,60; %95 CI 1,04-2,47) (141).

Çalışmamızda ABCG2 G34A ve C421A gen polimorfizmlerinin dağılımlarına göre çalışma gruplarında serum ABCG2 düzeylerini incelediğimizde, G34A GA genotipi taşıyan hastalarda, aynı genotipi taşıyan sağlıklı kontrollere göre serum ABCG2 düzeyleri azalmış olarak görülmüş ve bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p:0,001$). Bununla birlikte A alleli taşıyan hastalarda yine serum ABCG2 düzeyleri, kontrol grubundaki bireylere göre azalmış olarak gözlemlenmiştir ($p:0,001$).

Çalışma gruplarımız kendi içlerinde değerlendirildiğinde, kontrol grubunda GG genotipine sahip bireylerde serum ABCG2 düzeyleri daha düşük olarak belirlenmiştir ($p:0,003$, %95CI: 0,13-0,63), ancak hasta grubunda genotip ve allel dağılımları ile ABCG2 düzeyleri arasında bir ilişki gözlemlenmemiştir. Gerek sağlıklı gerekse de hasta grubumuzda, AA genotipine sahip tek bir birey bulunduğu için AA genotipi bu değerlendirmeye dahil edilmemiştir. A alleleline sahip sağlıklı bireylerde ise serum ABCG2 düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır ($p:0,003$, %95CI: 0,13-0,60).

Çalışma gruplarında C421A genotip ve alleleri ile serum ABCG2 düzeyleri arasında gerek gruplararası gerekse grup içi karşılaştırmalar sonucunda anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir.

Çalışmamızda, ABCG2 gen polimorfizmleri genotip ve allel dağılımları ile klinik parametreler arasındaki ilişki incelendiğinde, kapsüler invazyon görülen görülen hastaların tamamının G34A GG genotipine sahip oldukları gözlemlenmiştir ve bu istatistiksel olarak anlamlılık düzeyinde bulunmuştur ($p: 0,026$).

Ayrıca çalışma sonucuna göre, östrojen reseptörü (ER) pozitif hastalarda GG genotipine sahip olma sıklığının anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır ($p:0,027$). Östrojen reseptörü (ER) pozitif ve/veya progesteron reseptörü (PR) pozitif tümörlü meme kanserli hastaların teşhis sonrası ER negatif ve/veya PR negatif hastalara kıyasla daha düşük motralite riskine sahip oldukları belirtilmektedir(142). ER ekspresyonu hormon tedavisine potansiyel cevapta temel indikatördür, insan meme kanserlerinin yaklaşık olarak %70'inin hormon bağımlı ve ER pozitif olduğu belirtilmektedir(143).

Sonuç olarak diyebiliriz ki;

Çalışmamız ABCG2 G34A ve C421A gen polimorfizm analizlerinin meme kanserine ait risk, klinik, histopatolojik, prognostik çoğu parametre ile birlikte değerlendirildiği ilk çalışmadır.

Çalışmamız sonucunda ilgili polimorfizmlerin meme kanserindeki genotip frekanslarına ait ilk veriler saptanmıştır. Buna göre G34A ve C421A için allel frekansları; G34A A: 0,102, G: 0,898; C421A A:0,056 C:0,944 olarak saptanmıştır.

Meme kanserine yakalanma riski açısından, hasta ve kontrol grubunda ABCG2 genotipleri ile allel frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir veriye ulaşılamamıştır.

Çalışmamızda meme kanserli hastalar ile sağlıklı kontrol grupları arasında ABCG2 serum düzeylerini incelemiş ve gruplar arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir ($p>0,05$).

Çalışmamız Türk toplumunda meme kanserli hastalarda ABCG2'nin önemli gen polimorfizmlerinden G34A ve C421A ile ilgili ilk verileri sunmuş olup, bu verilerin daha sonra yapılacak olan çalışmalara öncülük edeceğine inanıyoruz. Bununla birlikte ileride yapılacak daha kapsamlı çalışmaların meme kanserinin tedavisinde, kemoterapiye yanıt konusunda ABCG2 gen polimorfizmlerinin öneminin ortaya çıkaracağını öngörmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Harris J., Morrow M., Norton L. Malignant Tumors of the Breast Cancer Principles. Cancer: Principles and Practice of Oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 1557.
2. Gadducci A., Biglia N., Sismondi P., Genazzani A.R. Breast Cancer and sex steroids: Critical review of epidemiological, experimental and clinical investigations on etiopathogenesis, chemoprevention and endocrine treatment of breast cancer. Gyn. End., June 2005; 20 (6): 343-360
3. Williams J.A., Philips D.H. Mammary Expression of Xenobiotic Metabolising Enzymes and Their Potential Role in Breast Cancer. Cancer Res. 2000; 60, 4667-4677
4. Ferlay J., et al. [Online]. Available from: <http://globocan.iarc.fr> [Accessed 15 September 2014].
5. Ozmen V. Breast Cancer in the world and Turkey. The Journal of Breast Health 2008;4:7-12
6. Tavassoli F.A. Pathology of the breast. 2nd ed. Stamford: Appleton-Lange; 1999. pp. 481-570.
7. Thor A.D. Advances in Therapy: Prognostic factors in breast cancer. Advanced therapy of breast disease. 2nd ed. US: BC Decker Inc.; 2004. pp. 181-186
8. Bane A.L, Tjan S., Parkes R.K., Andrulis I., O'Malley F.P. Invasive lobular carcinoma: to grade or not to grade. Mod Pathol 2005; 18: 621-8.
9. Ivshina A.V, George J., Senko O., Mow B., Putti T.C., Smeds J. et al. Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer. American Association for Cancer Research 2006;66: 10292-301.
10. Elston C.W., Ellis I.O. Pathologic prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grades in breast cancer. Experience from a large study with long-term follow-up". Histopathology. 1991 Nov;19(5):403-10.
11. Genestie C., Zafrani B., Asselain B., Fourquet A. et al. Comparison of the prognostic value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham histological grades in a series of

- 825 cases of breast cancer: Major importance of the mitotic count as a component of both grading systems. *Anticancer Research*. 1998 Jan-Feb;18(1B):571-6.
12. Singletary S.E., Connolly J.L. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer Journal for Clinicians* 2006;56: 37-47.
 13. Korde L.A., Zujewski J.A., Kamin L., Giordano S., Domchek S., Anderson W.F., Bartlett J.M., Gelmon K., Nahleh Z., Bergh J., Cutuli B., Pruneri G., McCaskill-Stevens W., Gralow J., Hortobagyi G., Cardoso F. Multidisciplinary meeting on male breast cancer: summary and research recommendations. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 20;28(12):2114-22
 14. McPherson K., Steel C., Dixon J.M. Breast Cancer Epidemic, Risk Factors, and Genetics. *British Medical Journal* 2000; 321: 624–628
 15. Berkey C.S., Frazier A.L., Gardner J.D. and Colditz G.A Adolescence and breast carcinoma risk. *Cancer* , 1999;85: 2400-9
 16. Apter D., Reinila M. and Vihko R. Some endocrine characteristics of early menarche, a risk factor for breast cancer, are preserved into adulthood. 1989; 44: 783-7.
 17. Bernstein L., Henderson B.E., Hanisch R., Sullivan-Halley J. and Ross R.K. Physical exercise and reduced risk of breast cancer in young women. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86:1403-8
 18. Kelsey J.L., Gammon M.D. and John E.M. Reproductive factors and breast cancer *Epidemiology Rev*, 1993; 15: 36-47
 19. Henderson B.E., Ross R.K., Judd H.L., Krailo M.D. and Pike M.C Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer*;1985: 56, 1206-8.
 20. Chie W.C., Hsieh C., Newcomb P.A., Longnecker M.P., Mittendorf R., Greenberg E.R., Clapp R.W., Burke K.P., Titus-Ernstoff L., Trentham-Dietz A. and MacMahon B. Age at any full-term pregnancy and breast cancer risk. *Am J Epidemiol*; 2000;151, 715-22.

21. Pathak D.R., Osuch J.R. and He J. Breast carcinoma etiology:current knowledge and new insights into the effects of reproductive and hormonal risk factors in black and white populations. *Cancer*;2000:88, 1230-8
22. Russo J., Hu Y.F., Yang X. and Russo I.H. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr*; 2000: 27 17-37
23. Unger M.A. and Weber B.L Recent advances in breast cancer biology.*Curr Opin Oncol*;2000: 12, 521-5.
24. Ford D., Easton D.F., Stratton M., Narod S., Goldgar D., Devilee P., Bishop D.T., Weber B., Lenoir G., Chang-Claude J., Sobol H., Teare M.D., Struewing J., Arason A., Scherneck S., Peto J., Rebbeck T.R., Tonin P., Neuhausen S., Barkardottir R., Eyfjord J., Lynch H., Ponder B.A., Gayther S.A., Zelada-Hedman M. et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*; 1998: 62, 676-89
25. Cristofanilli M. Breast cancer risk and management. İçinde Winchester JD, Winchester PD, editor. *Breast Cancer. Atlas of Clinical Oncology*. Canada: BC Decker Inc.; 2000. pp. 19-41.
26. Clavel-Chapelon F., Gerber M. Reproductive Factors and Breast Cancer Risk. Do They Differ According to Age At Diagnosis? *Breast Cancer Res Treat* 2002; **72**: 107-115.
27. John E.M. and Kelsey J.L. (1993) Radiation and other environmental exposures and breast cancer. *Epidemiol Rev*;1993:15, 157-62
28. McCormick, B. Radiation and local control in early invasive breast cancer. *The breast Journal*;1999: 5, 330-4.
29. Weiderpass E., Pukkala E., Kauppinen T., Mutanen P., Paakkulainen H., Vasama-Neuvonen K., Boffetta P. and Partanen T. Breast cancer and occupational exposures in women in Finland. *Am J Ind Med*: 1999; 36, 48-53
30. Sugimura T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*; 2000: 21, 387-95
31. Lee I.M, Antioxidant vitamins in the prevention of cancer, *Proc. Assoc. Am. Phys.* 111 (1999) 10–15

32. McKeown N. Antioxidants and breast cancer, *Nutr. Rev.* 57 (1999) 321–324
33. Zheng W., Gustafson D.R., Sinha R., Cerhan J.R., Moore D., Hong C.P., Anderson K.E., Kushi L.H., Sellers T.A., Folsom A.R., Well-done meat intake and the risk of breast cancer (see comments), *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 1724–1729.
34. Hunter D.J. and Willett W.C. Diet, body size, and breast cancer. *Epidemiol Rev*; 1993; 15, 110-32
35. Kuper H., Ye W., Weiderpass E., Ekbom A., Trichopoulos D., Nyren O. and Adami H.O. Alcohol and breast cancer risk: the alcoholism paradox. *Br J Cancer* ;2000: 83, 949-51.
36. Smith-Warner S.A., Spiegelman D., Yaun S.S., van den Brandt P.A., Folsom A.R., Goldbohm R.A., Graham S., Holmberg L., Howe G.R., Marshall J.R., Miller A.B., Potter J.D., Speizer F.E., Willett W.C., Wolk A., Hunter D.J., Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies, *JAMA* 279 (1998) 535–540
37. Palmer J.R., Rosenberg L., Cigarette smoking and the risk of breast cancer, *Epidemiol. Rev.* 15 (1993) 145–156
38. Ambrosone C.B., Shields P.G., Smoking as a risk factor for breast cancer, in: A.M. Bowcock (Ed.), *Breast Cancer: Molecular Genetics, Pathogenesis, and Therapeutics*, Human Press, Totowa, NJ, 1999, pp. 519–536
39. Wartenberg D., Calle E.E., Thun M.J., Heath Jr C.W., Lally C., Woodruff T., Passive smoking exposure and female breast cancer mortality, *J. Natl Cancer Inst.* 92 (2000) 1666–1673
40. Black D.M. The genetics of breast cancer. *Eur J Cancer* 1994;30A:1957–61
41. Van de Vijver M.J. Molecular genetic changes in breast cancer. In: Weinberg RA, editor. *Oncogenes and the molecular origins of cancer*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Press; 1993. p. 25–6.
42. Kristensen L.S., Nielsen H.M., Hansen L.L. Epigenetics and cancer treatment. *Eur J Pharmacol* 2009; 625: 131-42.
43. Osborne C., Willson P., Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 2004;9: 361-77

44. Gehrau R.C., D'Astolfo D.S., Dumur C.I., Bocco J.L., Koritschoner N.P. Nuclear expression of KLF6 tumor suppressor factor is highly associated with overexpression of ERBB2 oncoprotein in ductal breast carcinomas. *PLoS ONE* 2010;5: e8929.
45. Shawver L.K., Slamon D., Ullrich A. Smart drugs. Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 2002;1: 117–23.
46. Steeg P.S., De La Rosa A., Flatow U. et al. NM23 and breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 25: 175
47. Azim H., Azim H.A. Jr. Targeting Her-2/neu in breast cancer: as easy as this! *Oncology* 2008;74: 150–157
48. Slamon D.J., Godolphin W., Jones L.A., Holt J.A., Wong S.G., Keith D.E., Levin W.J., Stuart S.G., Udove J., Ullrich A. et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989 May 12;244(4905):707-12
49. Wu J.D., Odman A., Higgins L.M., Haugk K., Vessella R., Ludwig D.L. et al. In vivo effects of the human type I insulin-like growth factor receptor antibody A12 on androgen-dependent and androgen-independent xenograft human prostate tumors. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3065–3074
50. Liao D.J. and Dickson R.B. c-myc in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2000; 7: 143-164.
51. Vermeulen K., Van Bockstaele D.R., Berneman Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; 36: 131-49.
52. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. et al. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49–53
53. Oesterreich S. and Fuqua S.A. Tumor suppressor genes in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*; 1999: 6, 405-19.
54. Cui J. and Hopper J.L. Why are the majority of hereditary cases of early-onset breast cancer sporadic? A simulation study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 2000: 9, 805-12

55. Kainu, T., Juo S.H., Desper R., Schaffer A.A., Gillanders E., Rozenblum E., Freas-Lutz D., Weaver D., Stephan D., Bailey-Wilson J., Kallioniemi O.P., Tirkkonen M., Syrjakoski K., Kuukasjarvi T., Koivisto P., Karhu R., Holli K., Arason A., Johannesdottir G., Bergthorsson J.T., Johannsdottir H., Egilsson V., Barkardottir R.B., Johannsson O., Haraldsson K., Sandberg T., Holmberg E., Gronberg H., Olsson H., Borg A., Vehmanen P., Eerola H., Heikkila P., Pyrhonen S. and Nevanlinna H. Somatic deletions in hereditary breast cancers implicate 13q21 as a putative novel breast cancer susceptibility locus. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2000: 97, 9603-8
56. Rebbeck T.R Inherited genetic predisposition in breast cancer. A population-based perspective. *Cancer*; 1999: 83, 2493-501
57. Ahmed M., Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene* 2006;25: 5906-5911.
58. Tarr P.T., Tarling E.J., Bojanic D.D., Edwards P.A., Baldan A. Emerging new paradigms for ABCG transporters. *Biochim Biophys Acta* 2009 July; 1791(7): 584-93
59. Brunton L.L., Parker K.L., Buxton I.L.O. and Blumenthal, D.K. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th ed. 2006; www.accessmedicine.com.
60. Kajinami K., Brousseau M., Ordovas J.M., Schaefer A.J. Interactions between common genetic polymorphisms in ABCG5/G8 and CYPA1 on LDL cholesterol-lowering response to atorvastatin. *Atherosclerosis* 2004; **175**: 287-293
61. Higgins C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 8 (1992), pp. 67–113
62. Dean M., Rzhetsky A., Allikmets R., The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.*, 11 (2001), pp. 1156–1166.
63. Rees D.C., Johnson E., Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Mar;10(3):218-27. doi: 10.1038/nrm2646.
64. Klein I., Sarkadi B., Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1461: 237-262

65. Mealey K.L. Therapeutic implication of the MDR-1 gene. *J Vet Pharmacol Ther* 2004 Oct; 27(5): 257-64
66. Takano M., Yumoto R., Murakami T. Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacol Ther* 2006 Jan; 109(1-2): 137-61.
67. Mao Q., Unadkat J.D. Role of breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. *AAPS J* 2005 May 11; 7(1): E118-33
68. Mizuno N., Niwa T., Yotsumoto Y., Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 2003; 55(3): 425-61.
69. Dean M, Allikmets R. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev* 1995 Dec; 5(6): 779-85
70. Garf G.A., Yu L., Li W.P, Gerard R., Tuma P.L., Cohen J.C., Hobbs H.H. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* 2003 Nov 28; 278(48): 48275-82
71. Tingting L., Omedul I. Klaus H. ABC transporters, neural stem cells and neurogenesis – a different perspective. *Cell Research* (2006) 16: 857–871.
72. Dean M., Hamon Y., Chimini G., The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily (2001). *J Lipid Res.* 42:1007-17
73. Dean M. The Human ATP-binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. 1996. Human Genetics Section, Laboratory of Genomic Diversity, National Cancer Institute-Frederick.
74. Stefkova J., Poledne R., Hubacek J.A. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res*, 2004 53:235-43
75. Singaraja R.R., Brunham L.R., Visscher H., Kastelein J.J., Hayden M.R. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003. 23:1322-32
76. Roosbeek S., Caster H., Liu Q.Z., Berne P.F., Duverger N., Christiaens B. et al. *Protein Expr Purif.* 2004. 35:102-10.
77. Eichelbaum M., Fromm M.F., Schwab M. Clinical Aspects of the MDR1 (ABCB1) Gene Polymorphism. *Ther Drug Monit* 2004. 26 :180-185
78. Higgins C.F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature.* 2007;446:749–757

79. Hirata T., Okabe M., Kobayashi A., Ueda K., Matsuo M. Molecular mechanisms of subcellular localization of ABCG5 and ABCG8. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009 Mar 23; 73(3): 619-26.
80. Cserepes J., Szentpetery Z., Seres L., Ozvegy-Laczka C., Langmann T., Schmitz G., Glavinas H., Klein I., Homolya L., Varadi A., Sarkadi B., Elkind NB. Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Jul 30; 320(3): 860-7
81. Klein I., Sarkadi B., Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999 Dec 6; 1461(2): 237-62.
82. Ozvegy C., Varadi A., Sarkadi B. Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J Biol Chem* 2002 Dec 13; 277(50):47980-90.
83. Mitomo H., Kato R., Ito A., Kasamatsu S., Ikegami Y., Kii I., Kudo A., Kobatake E., Sumino Y., Ishikawa T. A functional study on polymorphism of the ATP-binding cassette transporter ABCG2: critical role of arginine-482 in methotrexate transport. *Biochem J* 2003 Aug 1; 373: 767-74
84. Yu L., von Bergmann K., Lütjohann D., Hobbs H.H, Cohen J.C. Ezetimibe normalizes metabolic defects in mice lacking ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res* 2005 Aug; 46(8): 1739-44.
85. Allikmets R., Schriml L.M., Hutchinson A., Romano-Spica V., Dean M. , A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.*, 58, (1998) 5337–5339
86. Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.E., Krogmann T., Gao Y., Rishi A.K, et al., A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95 (1998) 15665–15670
87. Mizuarai S., Aozasa N., Kotani H., Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2, *Int. J. Cancer* 109 (2004) 238–246.
88. Robey R.W., Polgar O., Deeken J., To K.W., Bates S.E., ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance, *Cancer Metastasis. Rev.* 26 (2007) 39–57

89. Annilo T., Chen Z.Q., Shulenin S., Costantino J., Thomas L., Lou H., Stefanov S., Dean M., Evolution of the vertebrate ABC gene family: analysis of gene birth and death, *Genomics* 88 (2006) 1–11.
90. Miyake K., Mickley L., Litman T., Zhan Z., Robey R., Cristensen B., et al. Molecular cloning of cDNAs which is highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes, *Cancer Res.* 59 (1999) 8–13
91. Staud F, Pavsek P. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Apr;37(4):720-5.
92. Ozvegy C., Litman T., Szakacs G., Nagy Z., Bates S., Varadi A., Sarkadi B. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285:111–117
93. Henriksen U., Gether U., Litman T. Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2. *J Cell Sci.* 2005;118:1417–1426
94. Kage K., Tsukahara S., Sugiyama T., Asada S., Ishikawa E., Tsuruo T., Sugimoto Y. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int J Cancer.* 2002;97:626–630
95. Graf G.A., Li W.P., Gerard R.D., Gelissen I., White A., Cohen J.C., Hobbs H.H. Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest.* 2002;110:659–669
96. Maliepaard M., Scheffer G.L., Faneyte I.F., van Gastelen M.A., Pijnenborg A.C., Schinkel A.H., van De Vijver M.J., Scheper R.J., Schellens J.H. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 2001., 61, 3458–3464
97. Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.E., Krogmann T., Gao Y., Rishi A.K., Ross D.D. Cloning and characterization of breast cancer resistance protein (BCRP), a novel ATP-binding cassette (ABC) transporter that may contribute to the multidrug-resistance phenotype of MCF-7/AdrVp breast cancer cells. *Proc Amer Assoc Cancer Res.* 1998;39

98. Fetsch P.A., Abati A., Litman T., Morisaki K., Honjo Y., Mittal K., Bates S.E. Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett.* 2005.
99. Jonker J.W., Merino G., Musters S., van Herwaarden A.E., Bolscher E., Wagenaar E., Mesman E., Dale T.C., Schinkel A.H. The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat Med.* 2005;11:127–129
100. Maliepaard M., van Gastelen M.A., de Jong L.A., Pluim D., van Waardenburg R.C., Ruevekamp-Helmers M.C. et al., Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan selected ovarian tumor cell line, *Cancer Res.* 59 (1999) 4559–4563.
101. Allen D., Brinkhuis R.F., Wijnholds J., Schinkel A.H., The mouse *Bcrp1/Mxr/Abcp* gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin, *Cancer Res.* 59 (1999) 4237–4241
102. Yang C.H., Schneider E., Kuo, E.L. M.L., Volk, E. Rocchi, Y.C. Chen, BCRP/MXR/ABCP expression in topotecan resistant human breast carcinoma cells, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 831–837.
103. Kawabata S., Oka M., Shiozawa K., Tsukamoto K., Nakatomi K., Soda H. et al. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280 (2001) 1216–1223.
104. Cusatis G., Sparreboom A. Pharmacogenomic importance of ABCG2. *Pharmacogenomics.* 2008 Aug;9(8):1005-9. doi: 10.2217/14622416.9.8.1005.
105. Ross D.D., Karp J.E., Chen T.T., Doyle L.A., Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia, *Blood* 96 (2000) 365–368.
106. Zhong C., Fang L., Qian R., Qinjun Z., Hongying R., Shihong L., Lei Z. and Zhongchao H. Suppression of ABCG2 inhibits cancer cell proliferation. *International Journal of Cancer* 2009.
107. Tamura A., Onishi Y., An R., Koshiba S., Wakabayashi K., Hoshijima K., Priebe W., Yoshida T., Kometani S., Matsubara T., Mikuriya K., Ishikawa T. In vitro evaluation of photosensitivity risk related to genetic polymorphisms of human ABC transporter ABCG2 and inhibition by drugs. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007 Dec;22(6):428-40.

108. Imai Y., Nakane M., Kage K., Tsukahara S., Ishikawa E., Tsuruo T., Miki Y., Sugimoto Y., C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance, *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002) 611–616.
109. Morisaki K., Robey R.W., Ozvegy-Laczka C., Honjo Y., Polgar O., Steadman K., Sarkadi B., Bates S.E., Single nucleotide polymorphisms modify the transporter activity of ABCG2, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56 (2005) 161–172.
110. Tamura A., Watanabe M., Saito H., Nakagawa H., Kamachi T., Okura I., Ishikawa T., Functional validation of the genetic polymorphisms of human ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2: identification of alleles that are defective in porphyrin transport, *Mol. Pharmacol.* 70 (2006) 287–296.
111. Yanase K., Tsukahara S., Mitsuhashi J., Sugimoto Y. Functional SNPs of the breast cancer resistance protein - therapeutic effects and inhibitor development. *Cancer Letters* 234 (2006) 73–80.
112. Sparreboom A., Loos W.J., Burger H., Sissung T.M., Verweij J., Figg W.D., Nooter K., Gelderblom H., Effect of ABCG2 genotype on the oral bioavailability of topotecan, *Cancer. Biol. Ther.* 4 (2005) 650–658.
113. Sparreboom A., Gelderblom H., Marsh S., Ahluwalia R., Obach R., Principe P., Twelves C., Verweij J., McLeod H.L., Diflomotecan pharmacokinetics in relation to ABCG2 421CNA genotype, *Clin. Pharmacol. Ther.* 76 (2004) 38–44
114. Zamboni W.C., Ramanathan R.K., McLeod H.L., Mani S., Potter D.M., Strychor S., Maruca L.J., King C.R., Jung L.L., Parise R.A., Egorin M.J., Davis T.A., Marsh S., Disposition of 9-nitrocamptothecin and its 9-aminocamptothecin metabolite in relation to ABC transporter genotypes, *Invest. New Drugs* 24 (2006) 393–401
115. Sugimoto Y., Tsukahara S., Ishikawa E., Mitsuhashi J. Breast cancer resistance protein: Molecular target for anticancer drug resistance and pharmacokinetics/pharmacodynamics. *Cancer Science* 2005 Volume 96, Issue 8, pages 457–465
116. Hu LL, Wang X.X., Chen X., Chang J., Li C., Zhang Y., Yang J., Jiang W., Zhuang SM. BCRP gene polymorphisms are associated with susceptibility and survival of diffuse large B-cell lymphoma. *Carcinogenesis*. 2007 Aug;28(8):1740-4. Epub 2007 May 10.

117. Weigelt B., Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Dec;6(12):718-30.
118. Ligresti G., Libra M., Militello L., Clementi S., Donia M., Imbesi R., Malaponte G., Cappellani A., McCubrey JA., Stivala F. Breast cancer: Molecular basis and therapeutic strategies (Review). *Mol Med Rep*. 2008 Jul-Aug;1(4):451-8.
119. Natarajan K., Xie Y., Baer MR, Ross DD. Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol*. 2012 Apr 15;83(8):1084-103.
120. Doyle L., Ross DD. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*. 2003 Oct 20;22(47):7340-58.
121. Agundez J.A. Polymorphisms of human N-acetyltransferases and cancer risk. *Curr Drug Metab*. 2008;9(6):520–531
122. Ambudkar S.V., Dey S., Hrycyna C.A. Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M.M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:361–398
123. Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology*. 2001;167(1):3–23
124. Singh M.S., Michael M. Role of xenobiotic metabolic enzymes in cancer epidemiology. *Methods Mol Biol*. 2009;472:243–264
125. Watkins P.B. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997;27(2–3):161–170
126. Cargill M., Altshuler D., Ireland J., Sklar P., Ardlie K., Patil N., Shaw N., Lane C.R., Lim E.P., Kalyanaraman N. et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet*. 1999;22(3):231–238
127. Gunderson K.L., Kuhn K.M., Steemers F.J., Ng P., Murray S.S., Shen R. Whole-genome genotyping of haplotype tag single nucleotide polymorphisms. *Pharmacogenomics*. 2006;7(4):641–648
128. Kobayashi D., Ieiri I., Hirota T., Takane H., Maegawa S., Kigawa J., Suzuki H., Nanba E., Oshimura M., Terakawa N. et al. Functional assessment of ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms to protein expression in human placenta. *Drug Metab Dispos*. 2005;33(1):94–101

129. McIlwain C.C., Townsend D.M., Tew K.D. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene*. 2006;25(11):1639–1648
130. Sai K., Kaniwa N., Itoda M., Saito Y., Hasegawa R., Komamura K., Ueno K., Kamakura S., Kitakaze M., Shirao K. et al. Haplotype analysis of ABCB1/MDR1 blocks in a Japanese population reveals genotype-dependent renal clearance of irinotecan. *Pharmacogenetics*. 2003;13(12):741–757
131. Zamber C.P., Lamba J.K., Yasuda K., Farnum J., Thummel K., Schuetz J.D., Schuetz E.G. Natural allelic variants of breast cancer resistance protein (BCRP) and their relationship to BCRP expression in human intestine. *Pharmacogenetics*. 2003 Jan;13(1):19-28.
132. Bäckström G., Taipalensuu J., Melhus H., Brändström H., Svensson AC., Artursson P., Kindmark A. Genetic variation in the ATP-binding cassette transporter gene ABCG2 (BCRP) in a Swedish population. *Eur J Pharm Sci*. 2003 Apr;18(5):359-64.
133. Kim K.A., Joo H.J., Park JY. ABCG2 polymorphisms, 34G>A and 421C>A in a Korean population: analysis and a comprehensive comparison with other populations. *J Clin Pharm Ther*. 2010 Dec;35(6):705-12.
134. Meissner K., Heydrich B., Jedlitschky G., Meyer Zu Schwabedissen H., Mosyagin I., Dazert P., Eckel L., Vogelgesang S., Warzok R.W., Böhm M., Lehmann C., Wendt M., Cascorbi I., Kroemer H.K. The ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP), a marker for side population stem cells, is expressed in human heart. *J Histochem Cytochem*. 2006 Feb;54(2):215-21.
135. Sari F.M., Yanar H.T., Ozhan G. Investigation of the functional single-nucleotide polymorphisms in the BCRP transporter and susceptibility to colorectal cancer. *Biomed Rep*. 2015 Jan;3(1):105-109.
136. Korenaga Y., Naito K., Okayama N., Hirata H., Suehiro Y., Hamanaka Y., Matsuyama H., Hinoda Y. Association of the BCRP C421A polymorphism with nonpapillary renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2005 Nov 10;117(3):431-4.
137. Andersen V., Ostergaard M., Christensen J., Overvad K., Tjønneland A., Vogel U. Polymorphisms in the xenobiotic transporter Multidrug Resistance 1 (MDR1) and interaction with meat intake in relation to risk of colorectal cancer in a Danish prospective case-cohort study. *BMC Cancer*. 2009 Nov 21;9:407.
138. Wang F., Liang Y.J., Wu X.P., Chen L.M., To K.K., Dai C.L., Yan Y.Y., Wang Y.S., Tong X.Z., Fu L.W. Prognostic value of

- the multidrug resistance transporter ABCG2 gene polymorphisms in Chinese patients with de novo acute leukaemia. *Eur J Cancer*. 2011 Sep;47(13):1990-9
139. Hu Y., Feng F.Y., Cheng S.J., Gao Y.N., Xiao T., Liu Y.N. Expression of serum breast drug-resistance protein in predicting chemosensitivity of NSCLC. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2006 Oct;28(10):750-2.
 140. Gardner E.R., Ahlers C.M., Shukla S., Sissung T.M., Ockers S.B., Price D.K., Hamada A., Robey R.W., Steinberg S.M., Ambudkar S.V., Dahut W.L., Figg W.D. Association of the ABCG2 C421A polymorphism with prostate cancer risk and survival. *BJU Int*. 2008 Dec;102(11):1694-9.
 141. Müller P.J., Dally H., Klappenecker C.N., Edler L., Jäger B., Gerst M., Spiegelhalder B., Tuengerthal S., Fischer J.R., Drings P., Bartsch H., Risch A. Polymorphisms in ABCG2, ABCC3 and CNT1 genes and their possible impact on chemotherapy outcome of lungcancer patients. *Int J Cancer*. 2009 Apr 1;124(7):1669-74.
 142. Dunnwald L.K., Rossing M.A., Li C.I.. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2007;9(1):R6
 143. Lumachi F., Brunello A., Maruzzo M., Basso U., Basso SM. Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Curr Med Chem*. 2013;20(5):596-604.

FORMLAR

Hasta takip formu

Protokol:

Tarih:

Hasta no:

MEME TÜMÖRÜ ARAŞTIRMA FORMU

Form No:	Protokol No :	Tarih :
Adı Soyadı :	Yaş :	Cinsiyet :
Boy / Kilo :	Meslek :	Kan Grubu:
Memleket:	Yaşadığı yer:	

 yk s :

Yakınmanın başlangıç zamanı:

 z geçmiő:

Doğum sayısı:

Menapoz durumu:

Sigara tüketimi (süre, miktar)/alkol tüketimi

İlaç kullanımı, Steroid kullanımı:

Transfüzyon varlığı:

Hastalık durumu:

İskemik kalp hastalığı

Diabet:

Malign hastalık

Diğer

HRT alıyormu? Alıyorsa süresi

Kemoterapi/radyoterapi alımı:

Beslenme durumu: Meyve t ketimiaz az orta bol
 Sebze tüketimi az orta bol
 Yağ tüketimi zeytinyağı bitkisel yağ(ayçiçek yağı vs.) hayvansal yağ

 z geçmiőinde meme ile ilgili yakınma / hastalık:

Kist

Diğer

Soy geçmiő:

Meme Ca

Diğer malign hastalıklar

Diabetes Mellitus

Kronik Karaciğer Hastalığı

Ameliyat  ncesi tanı :

Yapılan Ameliyat :

Tanı konulmasından sonra geçen süre

Yapılan Biyokimyasal analiz sonuçlarına ait verileri:

Tümörün diferansiasyonu (İyi / orta / kötü)

Tümörün histopatolojik incelemesi sonrası ek veriler:

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 975

Tarih : 02/12/2010

Konu : Doç.Dr. H.Arzu ERGEN hk,

Sayın Doç.Dr. H.Arzu ERGEN
Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi
İlgi : 15.10.2010 tarihli 606 sayılı yazınız

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Doktora Öğrencisi Yemliha YILDIZ'ın yürüteceği 2010/678-170 dosya numaralı "Meme Kanseri Hastalarda ABCG2 Gen Polimorfizmi ve Serum Düzeyinin İncelenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 20.10.2010 tarihli 06 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Toplantı Tarihi : 20/10/2010

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Toplantı Sayısı : 06

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. H.Arzu ERGEN'in üstlendiği ve Doktora Öğrencisi Yemliha YILDIZ'ın yürüteceği 2010/678-170 dosya numaralı "Meme Kanseri Hastalarda ABCG2 Gen Polimorfizmi ve Serum Düzeyinin İncelenmesi" başlıklı çalışma kurumumuzca incelenmiştir.

Etik yönden uygun bulunmuştur.

Prof.Dr. A. Yağız ÜREŞİN
İ.Ü. Farmakoloji ve Klinik Far. A.D.
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Prof.Dr. Ayşen BULUT (T.Katılmadı)
Halk Sağlığı (Emekli)

Prof.Dr. Berrin UMMAN
İ.Ü. Kardiyoloji A.D. (Bşk. Yardımcısı)

Doç.Dr. Tufan TÜKEK
Vakıf Gureba E. ve Araş. Hst. İç Hast.

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İ.Ü. İç Hastalıkları A. D.

Prof.Dr. Ünal KUZGUN
Şişli Etfal Eğitim ve Araş. Hst. Ortopedi

Prof.Dr. Oğuzhan COBAN
İ.Ü. Nöroloji A. D.

Prof.Dr. Ahmet O. ARAMAN (T.Katılmadı)
İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Dekanı

Prof.Dr. Pınar SAİP
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Demir TIRYAKI
Biyofizik (Emekli)

Prof.Dr. Rukiye Eker ÖMEROĞLU
İ.Ü. Çocuk Sağ. ve Hast. A. D.

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK
İstanbul Üniversitesi

Uzm.Dr. Ahmet Rıza URAS
Vakıf Gureba E. ve Araş. Hst. Biyokimya

M. Kerim AKMAN
İİBF İktisat Bölümü (Özel)

Doç.Dr. H. Hanzade DOĞAN
İ.Ü. Cerrahpaşa T.F. Deontoloji

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Yemliha	Soyadı	Yıldız
Doğ.Yeri	Elbistan	Doğ.Tar.	15.10.1986
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	12497785520
Email	yemlihay7@yahoo.com	Tel	05369532457

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	2015
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	2008
Lisans	Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2006
Lise	GOP Plevne Lisesi	2001

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	iyi	iyi	ÜDS	63.75

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı (ALES)	68.36	70.65	70.168
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
M.S. office	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):