

**Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserlerinin Farklı
Grade ve Evrelerinde ERCC1'in Protein, mRNA ve DNA
Düzeyinde Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi**

Proje No: 109S022

Doç.Dr. Vildan CANER
Uzm.Dr. Nur BÜYÜKPINARBAŞILI

AĞUSTOS 2010
DENİZLİ

ÖNSÖZ

Farklı kanser türlerinde, karsinogenezin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına odaklanan çalışmaların bir bölümünde hedef, DNA tamir mekanizmasından sorumlu genler içinde yer alan “Excision Repair Cross-Complementing Gene 1” (ERCC1)’dir. ERCC1, tanımlanan ilk memeli nükleotid ekzisyona tamir (NER) genidir. Bu projede küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC)’nin etyolojisinde ve/veya patogenezinde (progresyonunda) rolü olduğu düşünülen ERCC1’in protein, mRNA ve DNA düzeyinde ekspresyon profillerinin belirlenmesi ve bu ekspresyon profilleri arasındaki olası korelasyonların belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda, çalışmaya dahil edilen olgulara ait tümör serilerinden elde edilen verilere bağlı olarak, ERCC1 durumu ve tümör davranışı hakkında tam bir konsensus sağlanamayan varolan literatür verilerine ek katkı sağlaması planlanmıştır.

Bu projede, ayrıca NSCLC’inin etyolojisinde ve/veya patogenezinde yer alan ERCC1 durumunun belirlenmesinde kullanılacak olan yöntemler, uygulanabilirlikleri ve informatif verilerin alınması açısından da değerlendirilmiştir. Günümüzde medikal onkolojide en önemli yaklaşımın bireye özgün tedavi olduğu göz önüne alınırsa, meme kanserinde Herceptin tedavisi için aday seçiminde HER-2/neu durumunun bilinmesi gerekliliği gibi, akciğer kanserlerinde de kemoterapotik tedavi yaklaşımları için aday genlerden biri olan ERCC1’in protein, mRNA ve DNA düzeyinde profillerinin belirlenmesinde uygulanacak yöntemlerin etkinlikleri de bu proje çerçevesinde tartışılmıştır.

Yukarıda açıklanan amaçlar doğrultusunda hazırlanan ve tamamlanan “Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserlerinin Farklı Grade ve Evrelerinde ERCC1’in Protein, mRNA ve DNA Düzeyinde Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi” başlıklı proje, TÜBİTAK tarafından 25/06/2009 tarihinde 109S022 nolu Hızlı Destek Projesi olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Özet	6
Abstract	7
Giriş ve genel bilgiler	8
Gereç ve Yöntem	10
Bulgular	16
Tartışma	22
Sonuç	25
Referanslar	27
Proje özet bilgi formu	31

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. ERCC1 ve β -aktin genine özgün primer setleri ve hidroliz problemleri dizilimleri	14
Tablo 2. ERCC1 ve β -aktin geninin DNA ve mRNA düzeyinde kantitasyonu amacı ile hazırlanan reaksiyon karışımı	15
Tablo 3. ERCC1 ve β -aktin geninin DNA ve mRNA düzeyinde kantitasyonu amacı ile uygulanan gerçek-zamanlı PCR protokolü.....	15
Tablo 4. NSCLC olgularına ait klinikopatolojik parametreler.....	17
Tablo 5. ERCC1'in DNA, mRNA ve protein düzeyinde ekspresyon profilleri	19
Tablo 6. ERCC1 için IHK ile protein overekspresyonu ve gerçek-zamanlı PCR ile DNA amplifikasyonunun karşılaştırılması	20
Tablo 7. ERCC1 için IHK ile protein overekspresyonu ve gerçek-zamanlı PCR ile mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması	20
Tablo 8. Klinik evrelere göre ERCC1 gen amplifikasyonu ve mRNA ve protein düzeyinde ekspresyon durumları	21

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. β -globin primerleri kullanılarak elde edilen amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	17
Şekil 2. <i>ERCC1</i> ve β -aktin DNA örnekleri için amplifikasyon eğrisi	18
Şekil 3. <i>ERCC1</i> ve β -aktin cDNA örnekleri için amplifikasyon eğrisi	18
Şekil 4. DNA amplifikasyonu, mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonları pozitif olarak değerlendirilen olgularda, IHK ve gerçek-zamanlı PCR arasındaki uyumu gösteren Venn diyagramı	20

Özet

Bugüne kadar, akciğer karsinogenez sürecinde başlıca tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve ERCC1'in de yer aldığı DNA tamir mekanizmasından sorumlu genler olmak üzere farklı türdeki genlerin etkili olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda, normal dokuda suboptimal DNA tamiri, kanser patogenezinde kritik bir basamak olan genomik instabilite ile sonuçlanabilmektedir. Sınırlı sayıdaki prelinik çalışmalardan bazıları ERCC1'in akciğer kanserinde önemli bir prediktif ve/veya prognostik belirteç olabileceğini desteklerken, diğer çalışmalar bu görüşü desteklememektedir. Olasılıkla farklı tekniklerin kullanılmasından kaynaklanan nedenlerle tam bir konsensus sağlanamamakla birlikte, akciğer kanserlerinde farklı klinik evrelerde ERCC1'in protein, mRNA ve DNA düzeyinde ekspresyonunun belirlenmesinin yanısıra düşük veya yüksek düzey ekspresyonun tümör tepkisi ve/veya yaşamla olan ilişkisinin belirlenmesi hala güncelliğini korumaktadır.

Bu projede, İstanbul Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesi Patoloji Bölümü'nde, Ocak – Aralık 2008 tarihleri arasında histopatolojik olarak incelenen ve NSCLC tanısını alan olgulara ait arşiv doku örnekleri kullanılmıştır. ERCC1'in protein düzeyindeki ekspresyonu İmmunohistokimyasal (IHK) analiz ile belirlenmiştir. *ERCC1* geninin hem mRNA düzeyinde hem de DNA düzeyinde ekspresyon profili, gerçek-zamanlı PCR yöntemi ile relatif olarak kantite edilmiştir. Her üç yöntem arasında tam uyum, toplam 39 tümör örneğinde (%42.9) gözlemlendi. *ERCC1* geni için mRNA ve protein ekspresyonu arasında korelasyon belirlenmezken ($r=-0.013$), DNA amplifikasyonu ve mRNA ekspresyonu arasında güçlü bir korelasyon belirlendi ($r=0.662$). Evre III tümörlerde mRNA ve DNA düzeyinde ERCC1 ekspresyonu (sırasıyla %63.1 ve %84.2) diğer evrelere göre daha yüksekti. Bunun aksine evre II ve III'deki protein ekspresyonu (sırasıyla %56.6 ve %52.6) evre I'e göre daha düşüktü.

Bu sonuçlar, ERCC1 ekspresyonu ile ilişkili bir mekanizmanın tümör davranışında rol oynayabildiğini göstermektedir. Aynı zamanda bu çalışma, klinik kullanım ve uygulamaya geçmeden önce, ERCC1 durumunu belirlemede kullanılan yöntemlerin validasyonlarının ve niteliklerinin belirlenmesinin gerekliliğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, ERCC1, IHK, gerçek-zamanlı kantitatif PCR

Abstract

(Determination of Expression Profiles of ERCC1 Status at Protein, mRNA and DNA Level In Different Grades and Stages of Non-Small Cell Lung Cancer)

To date, it has been reported that the different types of genes such as tumor suppressor genes, oncogenes and DNA repair genes including ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementing Gene 1) are involved in human lung carcinogenesis. In addition, suboptimal DNA repair in normal tissue could give rise to the genomic instability which is a critical step in cancer pathogenesis. Some of the preclinical studies support that ERCC1 is a predictive and/or prognostic marker in lung cancer but the others do not support this allegation. There was no consensus between the studies because the different technologies are most probably used. The determination of ERCC1 expression at protein, mRNA, and DNA level in different grades and stages and the relationship between high or low level of the expression and tumor response and/or lifetime are still current topics in lung cancer.

In this study, the archival tissue samples which were histopathologically diagnosed as NSCLC in Pathology Department of Istanbul Yedikule Chest Diseases Hospital during January-December 2008 were examined. ERCC1 expression at protein level were scored by Immunohistochemistry (IHC). The relative quantification profiles of ERCC1 expression at mRNA and DNA level were determined by real-time PCR in the samples. There was complete concordance among the three methods in 39 tumor samples (42.9%). A strong correlation was found between DNA amplification and mRNA expression ($r=0.662$) while there was no correlation between mRNA and protein assessment for ERCC1 expression ($r=-0.013$). ERCC1 expression at mRNA and DNA level (63.1% and 84.2%, respectively) in tumors at stage III was higher than at the other stage. In contrast, the protein expression at stage II and III (56.6% and 52.6%, respectively) of NSCLC was lower than that of tumors with stage I NSCLC.

These results show that the mechanism by which ERCC1 expression might play a role in tumor behavior. This study was also confirmed that the appropriate validation and qualification in methods used for ERCC1 status were needed before its clinical application and implementation.

Keywords: Non-small cell lung cancer, ERCC1, IHC, Real-time quantitative PCR

Giriş ve genel bilgiler

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 2003 yılına ait kanser raporunda, global kanser oranının hızla arttığı ve 2020 yılında bu oranın %50 artarak 15 milyon kişiyi etkileyebileceği bildirilmiştir. Akciğer kanseri tüm dünyada mortalitesi en yüksek kanser türüdür ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Erkeklerde %31 ve kadınlarda %26 oran ile kanser ölümlerinin başında gelen akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'ini küçük hücreli olmayan akciğer kanserleri oluşturmaktadır (JEMAL, 2008).

Kanser gelişimi çok aşamalı bir olaydır. Meme ve kolon kanserleri gibi solid kanserlerde etyoloji, patogenez ve progresyonu aydınlatan birçok genetik mekanizma belirlenmiş olup, son yıllarda akciğer kanserinde de ilgili genetik mekanizmalar aydınlatılmaya başlamıştır. Sigara içimi önemli bir faktör olmakla beraber, sigara içenlerin sadece %20'sinde akciğer kanserinin görülmesi, genetik faktörlerin de akciğer kanserinin etyolojisinde yadsınamayacak düzeyde rol oynadığını düşündürmektedir. Bugüne kadar elde edilen veriler akciğer karsinogenez sürecinde, başlıca tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve ERCC1'in de içinde yer aldığı DNA tamir mekanizmasından sorumlu genler olmak üzere farklı türdeki genlerin etkili olduğunu göstermiştir (BEPLER, 2008; AZUMA, 2007; OLAUSSEN, 2006).

NER, oldukça sıkı korunmuş, çok yönlü ve güçlü bir DNA tamir yolağıdır ve DNA çift sarmal hataları, DNA baz paylaşım hataları gibi bir çok farklı DNA hasarlarının tamirinde rol oynamaktadır. Memeli NER'in moleküler mekanizması oldukça komplekstir ve bu mekanizmada farklı fonksiyonlara sahip birçok protein rol oynamaktadır (GILLET, 2006; GOSSAGE, 2007). Yapı-spesifik endonükleazlardan XPF (Xeroderma Pigmentosum Complementation Group F, ERCC4)/Mus 81 ailesi, dimerik DNA endonükleazların bir grubudur ve bu endonükleazlar, NER ile birlikte DNA replikasyonu ve mayotik rekombinasyon sırasında meydana gelen yapısal DNA anormalliklerinde etkindirler. XPF endonükleazı, kendi katalitik partneri olan ERCC1 ile XPF-ERCC1 heterodimeri oluşturulmasında etkindir. XPF-ERCC1 heterodimeri, memeli NER ensizyon kompleksine katılan son faktördür. ERCC1 ve XPF birbirleri olmaksızın stabil değildirler ve bu dimerik organizasyon XPF'nin stabilitesi ve katalitik aktivitesi için kritiktir. XPF- ERCC1 endonükleazı, DNA 5' lezyonunu parçalar ve aynı zamanda rekombinasyonel DNA tamirinde ve DNA baz paylaşım hataları tamirinde de yer aldıkları bilinmektedir (NIEDERNHOFER, 2004; CUMMINGS, 2006).

ERCC1 geni kromozom 19q13.2-q13.3'e lokalizedir ve 15kb'dan büyük bir genoma yayılmış 10 ekzona sahiptir. ERCC1 proteini 297 amino asitlik bir proteindir ve moleküler ağırlığı yaklaşık 32.5 kDa'dur (PARK, 1995). ERCC1 proteini iki domain'den oluşmaktadır. ERCC1'in korunmuş merkez domain'i arkeal Mus81/XPF homologlarının nükleaz domain'leri ile yapısal olarak önemli ölçüde benzerlik göstermektedir, ancak nükleaz aktiviteden yoksundur. Bu merkez domaini, aynı zamanda tanımlanmış bir polarite ile (5' tek iplik proksimal yüz) ssDNA/dsDNA kavşağına bağlanır. Buna ek olarak merkez domain'i XPA ile etkileşimi yönlendirir (LI, 1994; BUCHKO, 2001). ERCC1'in C-terminal domain'i XPF'nin C-terminal domain'ine bağlanır ve aynı

zamanda DNA'ya da bağlanabilir. Yapısal çalışmalar, ERCC1 ve XPF arasındaki C-terminal bölge etkileşiminin büyük bir ölçüde hidrofobik olduğunu göstermektedir. Biyokimyasal, yapısal ve modelleme çalışmaları, ERCC1 alt-ünite fonksiyonunun sadece XPF'yi stabilize etmediğini, aynı zamanda NER sistemine fonksiyonel bir bağlantı sağladığını da göstermektedir (TSODIKOV, 2005). ERCC1 promoter'ı, ERCC1 geninin transkripsiyonal başlama alanının ± 170 bp upstream bölgesine lokalizedir. Bu promoter bölgesi AP-1-benzeri bağlama alanı içerir. AP-1, c-fos ve c-jun proto-onkogenlerinden oluşan bir nükleer transkripsiyon aktivatörüdür. AP-1'in, AP-1 bağlanma alanları olarak bilinen regülatör elementlerle etkileşime girerek transkripsiyonu regüle ettiği bilinmektedir. Preklinik çalışmalar AP-1'in ERCC-1 ekspresyonunun regülasyonunda kritik olduğunu göstermektedir (ALTAHA, 2004). Cisplatin'in, over kanser hücre hatlarında zamana ve doza-bağlı ERCC1-mRNA ve ERCC-1 protein overekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (DAMIA, 1998; LI, 1998). Moleküler mekanizma net olmamakla birlikte, cisplatin maruz kalmanın c-jun fosforilasyonunda artışla ilişkili olarak c-fos ve c-jun'un mRNA ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Birçok araştırmada ERCC1 mRNA ve protein'in düşük düzeylerinin cisplatin-DNA bileşiklerinin düşük düzeyde tamiri ile ilişkili oldukları rapor edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışma raporlarında, ERCC-1 mRNA düzeylerinin, insan tümörlerinde DNA tamir kapasitesinin bir belirteci olarak da kullanılabileceği yer almaktadır (WEI, 1995; DABHOLKAR, 1992; DABHOLKAR, 1995).

Farklı kanser türlerinde, karsinogenezin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına odaklanan çalışmaların bir bölümünde hedef, DNA tamir mekanizmasından sorumlu genler içinde yer alan ERCC1'dir. Çin hamster over hücrelerinde, ERCC1 defektinin çok daha şiddetli DNA tamir-yetmezlik fenotipine neden olduğu henüz yeni tanımlanmıştır. Farelerde ERCC1 normal yaşlanma, beyin gelişimi ve Ig gen değişimi için önemli olmakla birlikte DNA'daki homolog rekombinasyon ve çift-iplik kırıkların tamirine de katılmaktadır. ERCC1 knock-out farelerin sütten kesildikten kısa bir süre sonra öldükleri gözlemlenirken, canlı insanda ERCC1 defekti rapor edilmemiştir. Bu gen veya bu genin bazı formları yukarıda tanımlanan organizmalarla birlikte, ilginç olarak bakterilerde de bulunmaktadır. Bu nedenlerle, sözkonusu genin yaşam için son derece önemli olduğu düşünülmektedir (SANCAR, 2004; MITCHELL, 2003). Akciğer kanseri ve ERCC1 ile ilgili son 5 yıl içinde yapılan çalışmalarda, genin protein, mRNA ve DNA bazında ekspresyon düzeyleri ile hastalığın evresi, klinik düzeyi ve hatta tedaviye direnç arasında ilişki olduğu gösterilmiş ve bu ilişki iki ucu keskin bıçak şeklinde tasvir edilmiştir. Şöyle ki, artan ERCC1 ekspresyonu opere edilen hastalarda operasyon sonrası artan sağkalım süresi için önemli ve bağımsız bir prognostik faktör olarak tanımlanmakla birlikte, aynı zamanda platinyum-tabanlı kemoterapiye olan direncin artmasıyla da ilişkili bulunmuştur (REED, 2005; CEPPI, 2006; OLAUSSEN, 2007; FUJII, 2008).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde ERCC1'in protein, mRNA ve DNA düzeyinde ekspresyon profillerinin belirlenmesi ile birlikte farklı evrelerdeki tümör olgularında bu profillerin karşılaştırılması ve olası korelasyonların belirlenmesi bu proje kapsamında amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Materyal

Yedikule Göğüs Hastalıkları Hastanesi Patoloji Bölümü arşivinden küçük hücreli olmayan akciğer kanser tanılı doku örnekleri, uzman patolog tarafından yeniden incelenmiş ve yeterli doku kesitlerinin alınmasına uygun arşiv materyaline sahip 92 olgu çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma materyali olarak, olgulara ait %10 formaldehit solusyonu ile tespit edilen ve sonrasında parafin bloklara gömülen (FFPE) arşiv doku örnekleri kullanılmıştır.

Olguların yaşları, cinsiyetleri, sigara içme öyküleri, TNM evreleri ve histolojik tipleri olmak üzere tüm klinikopatolojik parametreleri, patoloji raporları yeniden incelenerek değerlendirmeye alınmıştır.

Kesitlerin hazırlanması

Çalışma grubunu oluşturan olgulara ait FFPE doku bloklarından 4-5 mikron kalınlığında seri kesitler alınmış ve bu kesitler mRNA izolasyonu, DNA izolasyonu ve immunhistokimya analizi amacıyla ayrı tüplere aktarılmıştır.

Immunhistokimya uygulama ve analizi

Tüm uygulamalar tam otomatik immunohistokimya ve in-situ hibridizasyon cihazında (Bond-Max, M211-64) gerçekleştirilmiştir ve uygulama basamakları aşağıda verilmiştir:

- Lamlar 60°C 30 dk inkübe edildikten sonra deparafinizasyon amacı ile lamlar, Dewax solusyonunda (Novacastra) 72°C'de 3 kez yıkandı.
- Lamlar, rezidüe Dewax solusyonundan arındırılmak için 3 kez %96'lık etanol ile yıkandı.
- Lamlar, rezidüe etanolü uzaklaştırmak için yıkama solusyonu ile 2 kez yıkandı (5 dk inkübe edilerek).
- Antijen retrieval için; lamlar ER2 solusyonunda (Novacastra) iki kez oda ısısında ve sonrasında 100°C'de 20 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, lamlar yine aynı solusyonunda bu kez de oda ısısında 12 dk inkübe edildi.
- Lamlar, yıkama solusyonu ile 35°C'de 5 kez yıkandı ve sonrasında yine aynı solusyonda 3 dk inkübe edildi.
- Doku kesitlerindeki eritrositleri ve diğer artefakt yapıları oksidasyonla uzaklaştırmak amacı ile lamlar, peroksit blok solusyonunda (Novacastra) 5 dk inkübe edildi.
- Lamlar yıkama solusyonu ile 3 kez yıkandı.

- Antijen-antikor reaksiyonu için lamlar, 1/50 oranında ERCC1 (Klon 8F1; Genetex) antikoruna ile 32°C'de 20 dk inkübe edildi.
- Lamlar, bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için yıkama solusyonu ile 3 kez yıkandı (2 kez 2 dk ve 1 kez 3 dk inkübe edilerek).
- Lamlar sekonder antikorla (Novacastra) 32°C'de 8 dk inkübe edildi.
- Lamlar, bağlanmamış antikorların uzaklaştırılması için yıkama solusyonunda 3 kez ve sonrasında distile su ile bir kez yıkandı.
- Lamlar, DAB solusyonunda (Novacastra) 10 dk inkübe edildi.
- Lamlar kromojeni ve diğer yapıları uzaklaştırmak amacı ile distile su ile, 3 kez 1'er dk olmak üzere yıkandı.
- İmmunohistokimyasal yapıları kuvvetlendirmek için; lamlar, DAB enhancer solusyonu (Novacastra) ile 32°C'de 5 dk inkübe edildi.
- Lamlar, bağlanmamış yapıları uzaklaştırmak amacı ile yıkama solusyonunda 3 kez 2'şer dk yıkandı.
- Lamlar, zemin zıt boyaması için hematoksilin ile 20 dk boyandı.
- Fazla hematoksilini uzaklaştırmak için; lamlar, distile su ile 2 kez yıkandı.
- Lamlar, tekrar yıkama solusyonunda 2 kez 2'şer dk yıkandı.
- Lamlar %96 etanol'de 5 dk ve ksilende 5 dk inkübe edildi ve entellan ile kapatılarak mikroskofta incelemeye alındı.

ERCC1 immunreaktivitesinin yoğunluk açısından değerlendirilme kriterleri:

- Skor 0 (tümör hücresinde boyanma yok)
- Skor 1 (tümör hücresinde zayıf boyanma)
- Skor 2 (tümör hücresinde orta şiddette boyanma)
- Skor 3 (tümör hücresinde güçlü boyanma)

FFPE dokulardan genomik DNA izolasyonu

Çalışmaya dahil edilen olgulara ait FFPE doku kesitlerinden genomik DNA izolasyonu ticari kit yardımı ile (QIAmp DNA Mini Kit, Qiagen) yapılmış ve izolasyon uygulama basamakları aşağıda verilmiştir:

- Doku örneklerinden steril bistüri ve pens yardımı ile, fazla parafinin mekanik uzaklaştırma işlemi yapıldı ve steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- Deparafinizasyon için, her örneğe 1000 µl ksilen ilave edildi ve vorteks yardımı ile homojenize edildi.
- Örnekler 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelet üzerine 1200 µl %96-100 etanol ilave edildi ve vorteks yardımı ile iyice homojenize edildi.
- Örnekler 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

- Rezidüe ksileni tamamen uzaklaştırmak için, etanolla yıkama işlemleri bir kez daha tekrarlandı.
- Örneklerdeki etanolün tamamen uzaklaşması için 37°C'de 10-15 dk inkübe edildi.
- Örnekler 180 µl kitle birlikte sağlanan ATL tamponu ve 20 µl Proteinaz K eklendi ve vorteks yardımı ile homojenize edildi. 56°C'de örnekler tamamen lize olana kadar inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası örnekler 200 µl kitle birlikte sağlanan AL tamponu eklendi ve iyice homojenize edildikten sonra 70°C'de 10 dk inkübe edildi.
- Örnekler 200 µl %96-100 etanol ilave edildi ve 15 sn boyunca kuvvetlice vortekslendi.
- Bu karışım dikkatli bir biçimde spin kolonlara aktarıldı ve 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüplerinde bulunan sıvı uzaklaştırıldı.
- Spin kolon üzerine 500 µl kitle birlikte sağlanan 1. yıkama tamponu (AW1) eklendi ve 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Toplama tüplerinde bulunan sıvı uzaklaştırıldı.
- Spin kolon üzerine 500 µl kitle birlikte sağlanan 2. yıkama tamponu (AW2) eklendi ve 14.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Toplama tüplerinde bulunan sıvı uzaklaştırıldı.
- Rezidüe yıkama tamponunu tamamen uzaklaştırmak için ek santrifüj işlemleri uygulandı (14.000 rpm'de 1 dk).
- Spin kolon üzerine 100 µl kitle birlikte sağlanan elüsyon tamponundan eklendi ve oda ısısında 1 dk inkübe edildikten sonra, 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- İzole edilen DNA örnekleri, real-time PCR analizinde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

FFPE dokulardan total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Çalışmaya dahil edilen olgulara ait FFPE doku kesitlerinden total RNA izolasyonu ticari kit yardımı ile (RNeasy FFPE kit, Qiagen) yapılmış ve izolasyon uygulama basamakları aşağıda verilmiştir:

Parafin bloklardan total RNA izolasyonu

- Doku örneklerinden steril bistüri ve pens yardımı ile, fazla parafinin mekanik uzaklaştırma işlemi yapıldı ve steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
- Deparafinizasyon için, her örneğe 1000 µl ksilen ilave edildi ve 2.200 rpm'de vorteks yardımı ile homojenize edildi.
- Etüvde (60°C) overnight inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası örnekler, 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant, mikropipet yardımı ile uzaklaştırıldı.
- Örnekler, uzaklaştırılan ksilen miktarı kadar tekrar ksilen koyuldu ve 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası, süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 1000 µl %100 etanol ilave edildi. Vorteks yardımı ile iyice homojenize olması sağlandı.
- Örnekler 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.

- Rezidüe etanolün tamamen uzaklaştığından emin olana kadar, örnekler oda ısısında inkübe edildi.
- Pelet miktarına bağlı olarak örneklere 150 µl (az pelet gözleendiğinde) veya 240 µl (yoğun pelet gözleendiğinde) kitle birlikte sağlanan PDK tamponu ve 10 µl Proteinaz K eklendi ve vorteks yardımı ile iyice homojenize olması sağlandı.
- Örnekler önce su banyosunda 55°C'de 15 dk ve sonrasında etüvde 80°C'de 15 dk inkübe edildi.
- Pelet miktarına bağlı olarak örneklere 320 µl veya 500 µl kitle birlikte sağlanan RBC tamponu eklendi ve vorteks yardımı ile iyice homojenize edildi.
- Örnekler, kitle birlikte sağlanan "gDNA eliminatör spin kolon"lara aktarıldı ve 14.000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonlar uzaklaştırıldı.
- Toplama tüplerinin içerdiği miktara bağlı olarak, toplama tüplerine 720 µl veya 1200µl 100% etanol eklendi ve mikropipet yardımı ile iyice homojenize edildi.
- Homojenize edilen örneklerden 700 µl alındı ve kitle birlikte sağlanan "RNeasy MinElute spin kolon"lara aktarıldı. Kolonlar 14.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi.
- Toplama tüplerindeki içerik tamamen bitine kadar bir önceki basamak tekrar edildi.
- Kolonlara 500 µl kitle birlikte sağlanan RPE tamponundan eklendi 14.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi.
- Kolonlar aynı tamponla bir kez daha yıkandı ve 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
- Kolonlardaki rezidüe tamponun tamamen uzaklaştırılması için, kolonlar 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Kolonlar, steril RNase-free mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi ve 20 µl "RNase-free su" ilave edildi. 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Elde edilen RNA örneklerinin, konsantrasyonlarını ve saflığını belirlemek amacı ile spektrofotometrede (Biophotometer, Eppendorf) ölçümleri yapıldı. Tüm örneklere ait değerler bir excel dosyasına kaydedildi (Tablo 1). Geride kalan RNA örnekleri, cDNA sentezinde kullanılabilecek kadar -20°C'de saklandı.

cDNA sentezi

İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi ticari kit yardımı ile (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen) yapılmış ve uygulama basamakları aşağıda verilmiştir:

- Genomik DNA'nın eliminasyonu amacıyla, her örnek için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı:

Komponent	Miktar
gDNA wipeout tamponu	2 µl
Template RNA	1 µg (her örnek için konsantrasyon hesaplaması yapıldı)
RNase-free su	X µl (her örnek için hesaplandı)
Toplam hacim	14 µl

- Hazırlanan reaksiyon karışımı 42⁰C'de 2 dk inkübe edildi.
- Reverse transkripsiyon amacıyla, her örnek için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı:

Komponent	Miktar
Reverse transkriptaz (RT)	1 µl
RT tamponu	4 µl
RT primer karışımı	1 µl
Template RNA	14 µl (bir önceki basamaktan elde edilen)
Toplam hacim	20 µl

- Hazırlanan reaksiyon karışımı 42⁰C'de 15 dk inkübe edildi.
- Reverse transkriptazı inaktive etmek için örnekler 95⁰C'de 3 dk inkübe edildi.
- Örnekler, real-time PCR ile analiz edilmek üzere -20⁰C'de saklandı.

Gerçek-zamanlı kantitatif PCR

ERCC1 ve β -aktin (referans gen) için relatif kantitasyon analizi, gerçek-zamanlı PCR (LightCycler, 2.0; Roche Diagnostics) yöntemi kullanılarak yapıldı. Hedef ERCC1 geni ve β -aktin geninin çoğaltılmasında kullanılan primerler ve hidroliz problemlerinin dizaynı Tıp Molbiol (Berlin, Almanya) tarafından yapıldı. Çalışmada kullanılan primer setleri ve hidroliz prob dizilimleri Tablo 1'de verilmiştir (AZUMA, 2007; ROSELL, 2004).

Tablo 1. ERCC1 ve β -aktin genine özgün primer setleri ve hidroliz problemleri dizilimleri

β -aktin

Primer seti 5'-TGA GCG CGG CTA CAG CTT-3' (Forward)
5'-TCC TTA ATG TCA CGC ACG ATT T-3'(Reverse)
TaqMan Prob (FAM) 5'-ACC ACC ACG GCC GAG CGG-3' (TAMRA)

ERCC1

Primer seti 5'-GGG AAT TTG GCG ACG TAA TTC-3' (Forward)
5'-GCG GAG GCT GAG GAA CAG-3' (Reverse)
TaqMan Prob (FAM) 5'-CAC AGG TGC TCT GGC CCA GCA CAT A-3' (TAMRA)

ERCC1 ve β -aktin geninin hem DNA hem de mRNA düzeyinde kantitasyonu amacıyla optimize edilen gerçek-zamanlı PCR karışımları ve protokolleri Tablo 2 ve 3'de gösterilmiştir.

Tablo 2. ERCC1 ve β -aktin geninin DNA ve mRNA düzeyinde kantitasyonu amacı ile hazırlanan reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim	Final konsantrasyon (ERCC1 için)	Final konsantrasyon (β -aktin için)
PCR-grade su	5 μ l	-	-
Forward primer	2 μ l	0,5 μ M	0,5 μ M
Reverse primer	2 μ l	0,5 μ M	0,5 μ M
TaqMan probu	2 μ l	0,2 μ M	0,2 μ M
Master karışımı*	4 μ l	5 X	5 X
DNA / cDNA örneği	5 μ l	-	-
Toplam hacim	20 μ l		

*: Reaksiyonu karışımı için "LightCycler TaqMan Master" kiti kullanıldı. Master karışımı: FastStart Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, $MgCl_2$ ve dNTP karışımından oluşmaktadır.

Tablo 3. ERCC1 ve β -aktin geninin DNA ve mRNA düzeyinde kantitasyonu amacı ile uygulanan gerçek-zamanlı PCR protokolü*

Analiz Modu	Döngü	Segment	Hedef Isı	Süre	Kazanım Modu
Pre-inkübasyon					
	1		95°C	10 dk	-
Amplifikasyon					
	45	Denatürasyon	95°C	10 sn	-
		Annealing	60°C	20 sn	-
		Ekstensiyon	72°C	1 sn	Tek okuma
Soğutma					
	1		40°C	30 sn	-

*: Gerçek-zamanlı PCR Protokolü; **Pre-inkübasyon**: Enzim aktivasyonu ve kalıp DNA'nın denatürasyonu, **Amplifikasyon**: Hedef bölgenin primerler yardımı ile çoğaltılması ve FAM-işaretli hidroliz problemleri ile ürünün belirlenmesi, **Soğutma**: Sistemde yer alan rotorun ve termal haznenin soğutulması basamaklarını içermektedir.

Her bir örneğin DNA ve mRNA düzeyinde ERCC1 ekspresyonu, aynı örneğe ait eksternal standard olan β -aktin ekspresyon düzeyleri kullanılarak belirlendi. Ekspresyon düzeyleri "LightCycler Relatif Kantitasyon Yazılımı" kullanılarak hesaplandı ve kalibratör DNA olmaksızın sadece external standard kullanılarak relatif kantitasyon analizi yapıldı. Eksternal standart, gerçek-zamanlı PCR ile kantitasyon sırasında hedef ve referans gen / cDNA arasındaki farklılığı hesaplamada, örnek yüklemdeki varyasyonları ve PCR inhibitörlerinin etkisini dengelemede yardımcı olması amacı ile seçildi.

Bulgular

Çalışmaya 92 olgu dahil edilmesine karşın, 1 olgu immunhistokimyasal analiz ile değerlendirilemediğinden çalışma 91 olgu ile tamamlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen olgulara ait evrelerinin belirlenmesinde "American Joint Committee for Cancer (AJCC)" tarafından 1997 yılında kabul edilen Uluslararası Akciğer Kanseri Sınıflaması kriterleri kullanıldı. Buna göre 45 olgu ile (%49.45) en sık T2N1M0 evresi gözlemlenirken sadece 1'er olguda (%1.09) T1N1M0 ve T1N2M0 evresi belirlendi. Olguların 5'i (%5.49) T1 evresi, 67'si (%73.62) T2 evresi, 17'si (%18.68) T3 evresi ve 2'si (%2.19) T4 evresi olarak gruplandırıldı. Olguların 59'u (%64.83) N1 lenf nodu pozitif olarak değerlendirilirken 7 olgu (%7.69) N2 lenf nodu pozitif olarak değerlendirildi. Olguların tümünün metastaz yönünden negatif oldukları saptandı (Tablo 4). TNM evreleme sistemine göre klinik evreler değerlendirildiğinde, 51 olgu ile (%56.04) en sık IIB klinik evrenin gözlemlendiği ve bunu sırası ile 18 olgu (%19.78) ve 16 olgu (%17.58) ile IIIA ve IB klinik evrelerin izlediği belirlendi (Tablo 4). Daha genel bir gruplandırma yapıldığında, 19 olgunun evre I (%20.87), 53 olgunun evre II (%58.24) ve 19 olgunun da evre III (%20.87)'de yer aldığı gözlemlendi.

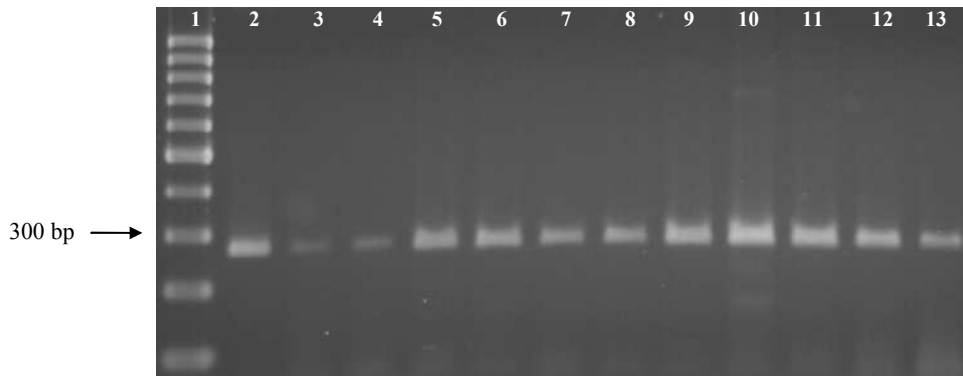
Olguların histopatolojik tümör tipleri Dünya Sağlık Örgütü 2004 yılı sınıflamasına göre belirlendi. Buna göre 54 olgu (%59.34) skuamöz hücreli karsinom, 29 olgu (%31.86) adenokarsinom ve 8 olgu da (%8.79) büyük hücreli, bronkioloalveolar, müsinöz ve adenoskuamöz karsinom olmak üzere diğer karsinomlar olarak gruplandırıldı (Tablo 4).

Çalışmaya dahil edilen olguların 9'u (%9.89) kadın ve 82'si (%90.1) erkekti. Olgular yaşlarına göre gruplandırıldıklarında 69 olgunun (%75.82) 50 ve üzeri yaşında olduğu ve 22 olgunun da (%24.17) 50 yaşın altında olduğu belirlendi. Sigara içme öykülerine göre, 12 olgunun (%13.18) sigara içmediği ve 79 olgunun da (%86.81) sigara içtiği belirlendi (Tablo 4).

Çalışmaya dahil edilen 91 olguya ait DNA ve cDNA örnekleri ile yapılan analizlerin tümünde informatif veriler elde edilmiştir. FFPE doku kesitlerine ait total RNA örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen cDNA sentezinin güvenilirliğinin kontrol etmek için, laboratuvarımızda bulunan insan β -globin genine özgün pozitif kontrol primerleri kullanılarak konvansiyonel PCR yapılmıştır. Bazı örneklerle ait sonuçlar Şekil 1'de gösterilmiştir.

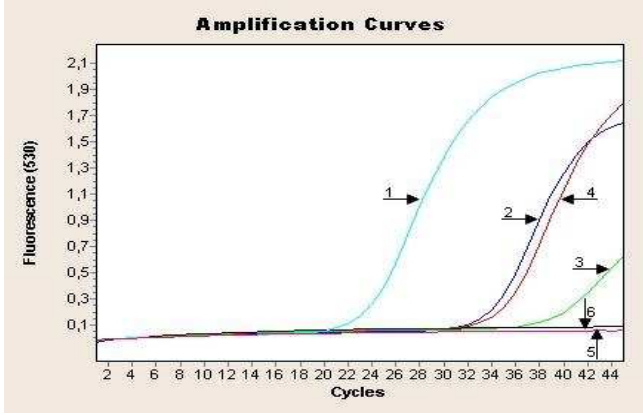
Tablo 4. NSCLC olgularına ait klinikopatolojik parametreler

Klinikopatolojik Parametre	Olgu Sayısı (%)
Yaş	
≥50	69 (%75.82)
<50	22 (%24.17)
Cinsiyet	
Erkek	82 (%90.1)
Kadın	9 (%9.89)
Sigara içimi	
Sigara içenler	79 (%86.81)
Sigara içmeyenler	12 (%13.18)
Patolojik evre	
T1	5 (%5.49)
T2	67 (%73.62)
T3	17 (%18.68)
T4	2 (%2.19)
Lenf nodu ile ilişkili evre	
N0	25 (%27.47)
N1	59 (%64.83)
N2	7 (%7.69)
Klinik evre	
IA	3 (%3.29)
IB	16 (%17.58)
IIA	1 (%1.09)
IIB	51 (%56.04)
IIIA	18 (%19.78)
IIIB	2 (%2.19)
Histolojik alt tip	
Skuamöz hücreli karsinom	54 (%59.34)
Adenokarsinom	29 (%31.86)
Büyük hücreli karsinom	3 (%3.29)
Bronkioalveolar karsinom	2 (%2.19)
Adenoskuamöz karsinom	2 (%2.19)
Müsinöz karsinom	1 (%1.09)

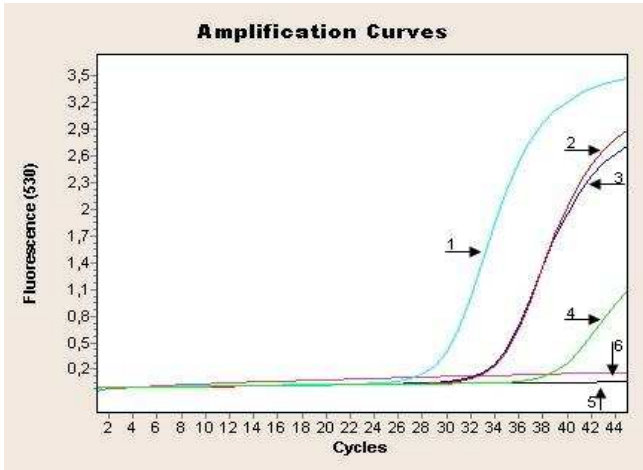


Şekil 1. β-globin primerleri kullanılarak elde edilen amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. Sıra 1: Molekül ağırlık markerı (80-1031 bp), Sıra2-13: Seçilen 12 adet örneğe ait amplifiye edilmiş β-globin ürünleri.

Gerçek-zamanlı relatif kantitasyon ile ERCC1'in hem DNA hem de mRNA düzeyinde ekspresyonları değerlendirildiğinde, 61 olguda (%67) DNA düzeyinde amplifikasyonun varlığı belirlenirken 46 olguda (%51) mRNA düzeyinde ekspresyonun varlığı belirlenmiştir (Şekil 2 ve 3).



Şekil 2. ERCC1 ve β -aktin DNA örnekleri için amplifikasyon eğrisi: 1. DNA amplifikasyonu pozitif olarak değerlendirilen olguya ait ERCC1 genine özgün amplifikasyon eğrisi, 2. DNA amplifikasyonu pozitif olarak değerlendirilen olguya ait β -aktin genine özgün amplifikasyon eğrisi, 3. DNA amplifikasyonu negatif olarak değerlendirilen olguya ait β -aktin genine özgün amplifikasyon eğrisi, 4. DNA amplifikasyonu negatif olarak değerlendirilen olguya ait ERCC1 genine özgün amplifikasyon eğrisi, 5. ERCC1 genine özgün reaksiyona ait negatif kontrol, 6. β -aktin genine özgün reaksiyona ait negatif kontrol.



Şekil 3. ERCC1 ve β -aktin cDNA örnekleri için amplifikasyon eğrisi: 1. mRNA ekspresyonu pozitif olarak değerlendirilen olguya ait ERCC1'e özgün amplifikasyon eğrisi, 2. mRNA ekspresyonu pozitif olarak değerlendirilen olguya ait β -aktin'e özgün amplifikasyon eğrisi, 3. mRNA ekspresyonu negatif olarak değerlendirilen olguya ait β -aktin'e özgün amplifikasyon eğrisi, 4. mRNA ekspresyonu negatif olarak değerlendirilen olguya ait ERCC1'e özgün amplifikasyon eğrisi, 5. ERCC1'e özgün reaksiyona ait negatif kontrol, 6. β -aktin'e özgün reaksiyona ait negatif kontrol.

ERCC1'in protein düzeyinde ekspresyonunun belirlendiği immunhistokimyasal analiz sonucunda da 29 olgu +3, 23 olgu +2, 17 olgu +1 ve 22 olgu 0 olarak skorlandırılmıştır. Bu skora göre 52 olgu (%57) protein ekspresyonu açısından "pozitif" olarak ve 39 olgu (%43) da "negatif" olarak değerlendirilmiştir.

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde ERCC1'in protein, mRNA ve DNA düzeyinde ekspresyon profilleri arasındaki korelasyon değerlendirildiğinde, 39 olguda (%43) tam bir korelasyon gözlemlenirken 52 olguda (%57) her üç molekül düzeyinde de uygulanan yöntemler açısından tam bir korelasyon gözlemlenmemiştir (Tablo 5).

Tablo 5. ERCC1'in DNA, mRNA ve protein düzeyinde ekspresyon profilleri*

ERCC1 ekspresyon profili	Olgu sayısı (%)
DNA +, mRNA+, protein +	26 (28.57)
DNA -, mRNA-, protein -	13 (14.28)
DNA +, mRNA+, protein -	19 (20.87)
DNA -, mRNA-, protein +	16 (17.58)
DNA +, mRNA-, protein +	10 (10.98)
DNA +, mRNA-, protein -	6 (6.59)
DNA -, mRNA+, protein -	1 (1.09)

*: (+); DNA amplifikasyonu, mRNA ve protein ekspresyonu yönünden pozitif olarak değerlendirilen olgular, (-); DNA amplifikasyonu, mRNA ve protein ekspresyonu yönünden negatif olarak değerlendirilen olgular

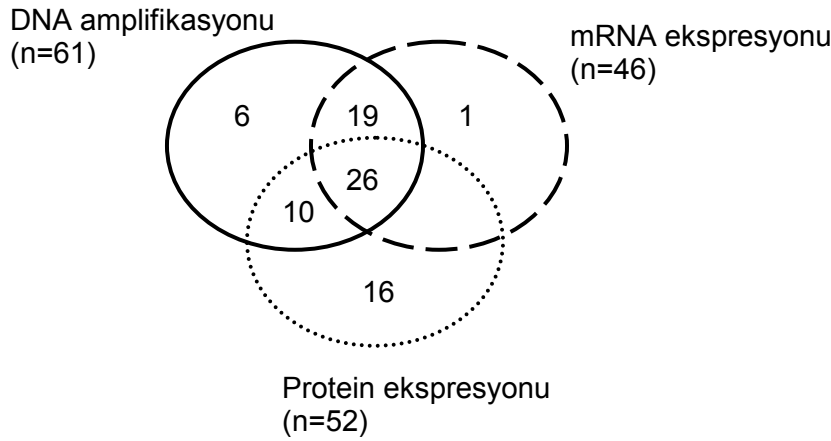
IHK analiz ile ERCC1 ekspresyon artışı negatif (0 /1+) olarak değerlendirilen 39 olgunun 14'ünde DNA düzeyinde amplifikasyon ve 19'unda da mRNA düzeyinde ekspresyon artışı saptanmamıştır. IHK analiz ile ERCC1 ekspresyon artışı pozitif (2+/3+) olarak değerlendirilen 52 olgunun 36'sında DNA amplifikasyonu ve 26'sında da mRNA düzeyinde ekspresyon artışı belirlenmiştir (Tablo 6 ve 7). DNA amplifikasyonu ve mRNA ekspresyon düzeyi birlikte değerlendirildiğinde, olgular arasında güçlü ($r=0.662$) bir korelasyon ve DNA amplifikasyonu ile protein overekspresyonu arasında zayıf korelasyon ($r=0.054$) belirlenirken, mRNA ekspresyonu ile protein overekspresyonu arasında korelasyon saptanmamıştır ($r=-0.013$). DNA, mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonları pozitif olarak değerlendirilen olgularda, IHK ve gerçek-zamanlı PCR arasındaki uyum Şekil 2'de gösterilmiştir. Ayrıca ERCC1 DNA amplifikasyonu, mRNA ekspresyonu ve protein overekspresyonu ile TNM evre ve histolojik alt tipler arasında ilişkinin araştırılması için yapılan istatistiksel çalışmalarda, parametrelerin fazlalığından kaynaklı örnek sayı azlığı nedeni ile güvenli sonuçlar elde edilememiştir.

Tablo 6. ERCC1 için IHK ile protein overekspresyonu ve gerçek-zamanlı PCR ile DNA amplifikasyonunun karşılaştırılması

Gerçek-zamanlı PCR	IHK 3+ (%)	IHK 2+ (%)	IHK 1+ ve 0 (%)	Toplam (%)
ERCC1 gen amplifikasyonu pozitif	21	15	25	61 (67.03)
ERCC1 gen amplifikasyonu negatif	8	8	14	30 (32.96)

Tablo 7. ERCC1 için IHK ile protein overekspresyonu ve gerçek-zamanlı PCR ile mRNA ekspresyonunun karşılaştırılması

Gerçek-zamanlı PCR	IHK 3+	IHK 2+	IHK 1+ ve 0	Toplam (%)
mRNA ekspresyonu pozitif	16	10	20	46 (50.54)
mRNA ekspresyonu negatif	13	13	19	45 (49.45)



Şekil 4. DNA amplifikasyonu, mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonları pozitif olarak değerlendirilen olgularda, IHK ve gerçek-zamanlı PCR arasındaki uyumu gösteren Venn diyagramı. Her 3 metod arasında tam uyum 26 olguda belirlenirken, protein overekspresyonu gözlemlenen 52 olgudan 16 olgu sadece protein overekspresyonu yönünden pozitif olarak değerlendirilmesine karşın gerçek-zamanlı kantitatif PCR ile DNA amplifikasyonu ve mRNA düzeyinde ekspresyon artışı yönünden bu olguların negatif oldukları belirlenmiştir.

Özetle, 39 olguda (%42.85) her üç yöntem arasında tam bir konsensus saptanmıştır. mRNA ve protein ekspresyonu birlikte değerlendirildiğinde, 45 olguda (%49.45) tam bir konsensus saptanırken, 20 olgu (%21.97) mRNA ekspresyonu açısından pozitif iken, protein ekspresyonu

açısından negatif olarak değerlendirilmiştir. Benzer şekilde, 26 olgunun (%28.57) protein ekspresyonu açısından pozitif iken mRNA ekspresyonu açısından negatif olduğu belirlenmiştir.

Klinik evrelere göre, ERCC1 geninin DNA, mRNA ve protein ekspresyon durumları Tablo 8'de gösterilmiştir. Buna göre evre I ve evre III birlikte karşılaştırıldığında, ERCC1 için DNA amplifikasyonu ve mRNA düzeyinde ekspresyonunda bir artış gözlemlenirken, protein ekspresyonunda bir azalma gözlemlenmiştir. Hem DNA amplifikasyonu hem de mRNA ve protein ekspresyonları açısından her bir klinik evre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p<0.05$).

Tablo 8. Klinik evrelere göre ERCC1 gen amplifikasyonu ve mRNA ve protein düzeyinde ekspresyon durumları

Klinik evre (n)	DNA amplifikasyonu n (%)	mRNA ekspresyonu n (%)	Protein ekspresyonu n (%)
Evre I (19)	13 (%68.42)	10 (%52.63)	11 (%57.89)
Evre II (53)	32 (%60.37)	24 (%45.28)	30 (%56.60)
Evre III (19)	16 (%84.21)	12 (%63.15)	10 (%52.63)

Tartışma

Akciğer kanseri, dünyada kanser kaynaklı ölümlerin en önemli nedenidir. Akciğer kanseri olgularının yaklaşık %80-85'ini NSCLC'i oluşturmaktadır ve güncel tedavi yaklaşımlarına rağmen olguların 5 yıllık sağkalım oranları son derece düşüktür. Birçok solid tümörlerde olduğu gibi, akciğer karsinogenez sürecinde de başlıca tümör baskılayıcı genler, onkogenler ve *ERCC1*'in de yer aldığı DNA tamir mekanizmasından sorumlu genler olmak üzere farklı türdeki genlerin etkili olduğu rapor edilmiştir (OLAUSSEN, 2006; SANTOS, 2009, BOZCZUK, 2009). *ERCC1*, NER mekanizmasında 5' endonükleazı kodlayan bir DNA tamir genidir. *ERCC1* genindeki genetik (polimorfizm nedeniyle genetik varyantlar gibi) ve epigenetik değişiklikler, normal dokularda suboptimal DNA tamirine neden olabilmekte ve bu da akciğer kanseri patogenezinde kritik bir basamak olan genomik instabilite ile sonuçlanabilmektedir (TAKENAKA, 2009; SMITH, 2007; WANG, 2010).

Preklinik çalışmalar *ERCC1*'in insan kanserlerinde önemli bir prediktif ve/veya prognostik belirteç olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle birçok çalışma farklı tümör tiplerinde *ERCC1*'in DNA, mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonunu incelemeye ve bu ekspresyonun tümör davranışı ve/veya yaşamla olan ilişkisini araştırmaya odaklanmıştır (CEPPI, 2006; FUJII, 2008; AZUMA, 2007). Yapılan bu çalışmalarda, olasılıkla farklı yöntemlerin kullanılması ve uygulanan bu yöntemlerde bir standardizasyonun tanımlanmaması nedeniyle, *ERCC1* durumu ile hastalığa ilişkin klinikopatolojik parametreler arasında karmaşık ve net olmayan bir ilişki sözkonusudur.

Bu çalışmada, NSCLC olgularında *ERCC1* protein ekspresyonu IHK analizi ile belirlenirken, *ERCC1* geninin hem mRNA düzeyinde hem de DNA düzeyinde ekspresyon profili, gerçek-zamanlı PCR yöntemi ile relatif olarak kantite edilmiştir. Her üç yöntem arasında tam uyum, toplam 39 olguda (%43) saptanmıştır. *ERCC1* gen amplifikasyonu toplam 61 olguda belirlenirken, bu olguların 25'inde amplifikasyonun protein ekspresyonu ile uyumlu olmadığı belirlenmiştir. Gerçek-zamanlı PCR ile gen amplifikasyonunun saptanması, yarı-kantitatif bir yöntem olan immunhistokimyasal analizle protein ekspresyon düzeyinin değerlendirmesine göre daha güvenilirdir ancak amplifikasyon olsa bile gen ürününün artması her zaman beklenmez. *ERCC1* gen amplifikasyonuna rağmen protein ekspresyonunda gözlenen uyumsuzluk, gen amplifikasyonu dışındaki faktörlerin gen ifadesinin regulasyonuna katıldığını düşündürmektedir. Bu mekanizmalardan biri, mutasyon veya polimorfizm nedeniyle genetik varyantların oluşumudur ve bu varyantların da ya transkripsiyonda bir azalmaya neden olabilmeleri ya da mRNA stabilitesi etkileyebilmeleri gerçeğidir. NSCLC'lerinde *ERCC1* gen polimorfizmlerinin farklı fonksiyonları ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte, T19007C (rs11615) ve C8092A (rs3212986) SNP'leri bu çalışmalarda yer alan en yaygın iki polimorfizmdir (TAKENAKA, 2009; SMITH, 2007; ZIENOLDDINY, 2006). *ERCC1*'in kodon 118'inde C/T değişimi ile karakterize T19007C SNP'nin, *ERCC1* ekspresyon değişiminin bir belirteci olarak fonksiyonel öneme sahip olabildiği rapor edilmiştir (SMITH, 2007). Bu polimorfik kodon aynı aminoasidi yani asparajini

kodlar, ancak kodon AAC ile karşılaştırıldığında AAT kodonunun transkripsiyonunda %50'lik bir azalma olduğu gösterilmiştir (YU, 2006). *ERCC1* C8092A polimorfizmi, genin 3' UTR (Untranslated Region)'sinde yer alan bir sessiz varyanttır ve mRNA stabilitesini etkilediği rapor edilmiştir. NSCLC'lerinde hem kemosensitivite hem de kanser riski açısından birçok çalışmada değerlendirilmiş bir parametredir (TAKENAKA, 2009; ZHOU, 2005).

Bu çalışmada 19 olguda (%20.87) *ERCC1* gen amplifikasyonu ve mRNA ekspresyon artışı belirlenirken, bu olgular protein ekspresyonu açısından negatif olarak değerlendirilmişlerdir. Ayrıca, 16 olgu (%17.58) *ERCC1* gen amplifikasyonu ve mRNA ekspresyonu açısından negatif olarak değerlendirilirken, bu olgularda protein overekspresyonu saptanmıştır. Benzer şekilde, bu çalışmada 46 olguda mRNA ekspresyonu ile protein ekspresyonu arasında uyum gözlenmemiştir. *ERCC1* geni mRNA ekspresyonu ve protein ekspresyonu arasındaki korelasyon, akciğer kanserinin de yer aldığı bir çok solid tümörde de değerlendirilmiş ve benzer bulgular rapor edilmiştir. Britten ve ark. (BRITTEN, 2000), 15 farklı servikal hücre hatları ile yaptıkları çalışmalarında Northern Blot analizi ile mRNA ekspresyonunu ve mouse-anti-human *ERCC1* antikoru ile de protein ekspresyonunu değerlendirmişler ve *ERCC1* protein ekspresyon düzeyinin *ERCC1* mRNA ekspresyon düzeyi ile ilişkili olmadığını belirlemişlerdir. Zheng ve ark. (ZHENG, 2007), 44 primer akciğer kanserli ve evre I vakalara ait taze doku ve arşiv doku örnekleri ile yaptıkları çalışmada, *ERCC1* protein ekspresyon durumunu Klon 8F1 monoklonal antikoru kullanarak IHK analizle, *ERCC1* mRNA ekspresyon durumunu da reverse-transkriptaz gerçek-zamanlı PCR ile değerlendirmişler ve *ERCC1* protein ve mRNA ekspresyonu arasında önemli bir korelasyonun olmadığını rapor etmişlerdir. Simon ve ark. (SIMON, 2007), NSCLC'li vakaların ince iğne biyopsi taze doku örneklerinde 18S rRNA housekeeping gen ile *ERCC1* gen ekspresyonunu kantitatif olarak belirlemişler ve benzer korelasyonun olmadığını rapor etmişlerdir. Cobo ve ark. (COBO, 2007), evre IV NSCLC'li arşiv doku örneklerinden izole ettikleri mRNA örneklerini β -aktin ile relatif olarak kantite etmişlerdir. Aynı çalışmada, *ERCC1* ekspresyon düzeyleri ile bireylerin cinsiyet, yaş, histopatoloji gibi klinikopatolojik parametreler arasında önemli bir farklılık saptanmamıştır.

ERCC1 gen amplifikasyonuna rağmen protein ekspresyonunda gözlenen uyumsuzluğun ve benzer şekilde *ERCC1* geni mRNA ve protein ekspresyonu arasında korelasyon yokluğunun nedeni, protein ekspresyonun değerlendirilmesinde kullanılan monoklonal antikorun özgünlüğü olabilir. *ERCC1* protein ekspresyonun değerlendirildiği birçok çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmaların bulguları arasında bir konsensus sağlanabilmiş değildir. Özellikle 8F1 klonu hala tartışma konusudur. Akciğer kanserlerinde, siRNA çalışmalarıyla teyit edilmiş ve monoklonal fare antikoru 8F1 tarafından tanınan epitopun ekspresyon düzeyinin şüpheli durumlar oluşturmaksızın ekspresyon düzeyini yansıttığı rapor edilmiştir (CHANG, 2005; LAN, 2004). Her ne kadar 8F1 klonunun *ERCC1* protein ekspresyonunu gösterdiğini belirten bu çalışmaların yanı sıra, zıt bulguların rapor edildiği birçok çalışma da bulunmaktadır. Volker ve ark. (VOLKER, 2001), 8 μ m-porlu filtreden geçen UV ışınının hücrelerde subnükleer UV-ile uyarılan DNA hasar bölgelerine neden oldukları ve bu hasarların aynı klonun kullanıldığı monoklonal antikorlarla

identifiye edilebildiğini göstermişlerdir. Başka bir çalışmada ise, hasara uğrayan fibroblastalarda 8F1 tarafından tanınan antijenin, tercihan hasar oluşan bölgede toplanmadığı gösterilmiştir ve 8F1 tarafından tanınan temel antijenin ERCC1 olmadığını rapor edilmiştir (NIEDERNHOFER, 2007). Klon 8F1'in ERCC1-pozitif ve ERCC1-negatif nükleuslar arasındaki ayırımı tam olarak yapıp yapamadığı ile birlikte, 8F1 tarafından tanınan primer antijenin henüz bilinmediği hala tartışılmaktadır. Ancak, çalışmamızda NSCLC'inde ERCC1 protein ekspresyon düzeyinin karşılaştırılabilmesi amacıyla aynı klona ait monoklonal antikor kullanılmıştır. Aynı zamanda bu çalışma, 8F1 monoklonal antikorun spesifikliğini belirleme amacıyla oluşturulmamış olmasına karşın, elde edilen bu çelişkili bulguların yorumlanmasında bir katkı sağlayabileceği de düşünülmektedir. Niedernhofer ve ark. (NIEDERNHOFER, 2007), 8F1, ERCC1 ve identifiye edilmemiş bir proteinle etkileşime giren, farklı moleküler ağırlıklı iki proteinin varlığını bildirmişlerdir. Bu farklılık da, ERCC1 mRNA ve protein ekspresyonu arasındaki korelasyon yokluğunun bir açıklaması olabilir. Bir diğer mekanizma da, akciğer karsinogenezi sürecinde protein ekspresyonunun inaktivasyonu ile sonuçlanan alternatif sinyal yollarının aktivasyonu olabilir. Genetik faktörlerin dışında, epigenetik mekanizmalardaki değişimler de gen ekspresyonunu regüle etmektedirler. Kodlamayan RNA'ların (özellikle miRNA) translasyonu baskıladıkları bilinmektedir. Henüz tanımlanmayan, ancak bu çalışmanın bulgularına dayanılarak da gelecekte planlanacak mikroarray çalışmaları ile bu epigenetik mekanizmanın ERCC1 protein ekspresyonunun regülasyonundaki rolü netlik kazanacaktır. Özellikle, platinyum-tabanlı tedavi alacak akciğer kanserli vakalarda ERCC1' in artmış ekspresyonun tedaviye dirençle ilişkili olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (REED, 2005; OLAUSSEN, 2007). Bu nedenle tedavi protokolünün belirlenmesinde ERCC1 durumu kritik bir parametre olarak değerlendirilmektedir ve ERCC1'in protein düzeyinde ekspresyon profilinin belirlenmesinde uygulanacak immünohistokimyasal yöntemin standardizasyonu bu nedenle büyük önem taşımaktadır.

Kanser etyolojisinin ve/veya progresyonunun net olarak anlaşılmasında alınan yol düşünüldüğünde, bugün için gelinen noktada elde edilen veriler artık direkt olarak klinisyeni yönlendirmekte ve hastaya verilecek tedaviyi, hastalığın prognozunu ve hastalığın derecelendirilmesini etkilemektedir. Kanser tedavisinde en önemli nokta olan erken tanıda, kullanılacak hızlı ve güvenilir tetkikler büyük önem taşımaktadır. Akciğer kanserli vakalarda, primer tedavi yaklaşımı olarak platinyum tabanlı kemoterapinin başlamasından önce, ERCC1 durumunun belirlenmesi gerekliliği, son yıllarda yapılan çalışmalarda önemle vurgulanmaktadır. Meme kanserli hastalarda Herceptin tedavisi için aday seçimi gibi, yakın gelecekte de akciğer kanserli hastalarda platinyum tedavi protokolünün başlangıcından önce aday seçimi sözkonusu olabilecektir. Bununla birlikte klinisyenin hastaya yaklaşımında elinde daha güçlü veriler olması açısından, ERCC1 durumunun belirlenmesi gerekliliği göz önüne alındığında, bu amaçla uygulanacak yöntemlerin belirlenmesi ve informatif verilerin alınması büyük önem taşımaktadır.

Sonuç

Optimal olmayan DNA tamir kapasitesi, karsinogenez etyolojisinde ve progresyonunda önemli bir basamaktır. *ERCC1*'in de yer aldığı DNA tamir mekanizmasından sorumlu genlerde genetik ve epigenetik değişimlerin DNA tamir kapasitesinde farklılıklara neden olabildikleri ve karsinogenezle ilişkili oldukları bilinmektedir. Sınırlı sayıdaki prelinik çalışmalardan bazıları *ERCC1*'in akciğer kanserinde önemli bir prediktif ve/veya prognostik belirteç olabileceğini desteklerken, diğer çalışmalar bu görüşü desteklememektedir. Olasılıkla farklı tekniklerin kullanılmasından kaynaklanan nedenlerle tam bir konsensus sağlanamamakla birlikte, akciğer kanserlerinde farklı grade ve evrelerde *ERCC1*'in protein, mRNA ve DNA düzeyinde ekspresyonunun belirlenmesinin yanısıra düşük veya yüksek düzey ekspresyonun tümör tepkisi ve/veya yaşamla olan ilişkisinin belirlenmesi hala güncelliğini korumaktadır.

Bu amaçla gerçekleştirilen bu çalışmanın sonuçları aşağıda belirtildiği şekilde maddeler halinde özetlenebilir:

1. NSCLC'de *ERCC1* durumu ile klinikopatolojik parametreler arasında karmaşık ve net olmayan bir ilişki sözkonusudur. Bu çalışmada da farklı klinik evrelerde *ERCC1* durumunun heterojen bir dağılım gösterdiği belirlenmekle birlikte, diğer evrelerle karşılaştırıldığında evre III'de protein ekspresyon düzeyinin çok daha düşük olduğu belirlenmiştir. *ERCC1* ekspresyonunun düşük olduğu evre III olguların daha düşük DNA tamir etkinliğine sahip olabilecekleri ve *ERCC1* ekspresyonundaki bu düşüşün de içinde yer aldığı bir mekanizmanın tümör davranışını etkileyebileceği düşünülmektedir.
2. *ERCC1* durumunun belirlenmesinde kullanılan her 3 yöntemin de kolay uygulanabilir olduğu ve özellikle akciğer kanserli arşiv doku örneklerinden genomik DNA ve total RNA izolasyonu için çalışmada tanımlanan yöntemin informatif verilerin alınması açısından son derece başarılı olduğu belirlenmiştir.
3. NSCL'de hem prognozun hem de tedavi protokollerinin belirlenmesinde prediktif belirteçlere büyük gereksinim olmakla birlikte, bu belirteçlerin klinik kullanımından önce bilimsel ve teknik olarak geçerliliği kanıtlanmış yöntemlere ve bu yöntemlerle ilgili standardizasyonun gerekliliği açıktır. Benzer şekilde, IHK analiz için tanımlanmış monoklonal antikor ve mRNA kantitasyonu için tanımlanmış hedef bölgeler ve yorumlamada kullanılacak tanımlanmış eşik değer gibi uyulması zorunlu olan, validasyonu ve kantitasyonu belirlenmiş yöntemlere gereksinim vardır. Metodolojide standard yöntemler tanımlanmadan, *ERCC1* ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinin bir prediktif marker olarak klinik laboratuvarlarda standard kullanımı için henüz erkendir.

4. NSCL'de hem prognozun hem de tedavi protokollerinin belirlenmesinde prediktif belirteç olarak ERCC1'in klinik kullanımından önce, ERCC1'in durumu ile ilgili verilerin klinik evrelere göre nasıl değerlendirilmesi gerekliliği de belirlenmelidir. Bu amaçla, iyi tanımlanmış olgu grupları ile karşılaştırmalı çalışmalara gereksinim vardır.

Referanslar

ALTAHA R, Liang X, Yu JJ, Reed E. Excision repair cross complementing-group 1: gene expression and platinum resistance. *Int J Mol Med*, 14 (6): 959-70, (2004).

AZUMA K, Komohara Y, Sasada T, Terazaki Y, Ikeda J, Hoshino T, Itoh K, Yamada A, Aizawa H. Excision repair cross-complementation group 1 predicts progression-free and overall survival in non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Cancer Sci*, 98 (9): 1336-43, (2007).

BEPLER G, Begum M, Simon GR. Molecular analysis-based treatment strategies for non-small cell lung cancer. *Cancer Control*, 15 (2): 130-9, (2008).

BORCZUK AC, Toonkel RL, Powell CA. Genomics of lung cancer. *Proc Am Thorac Soc*, 6 (2):152-8, (2009).

BRITTEN RA, Liu D, Tessier A, Hutchison MJ, Murray D. ERCC1 expression as a molecular marker of cisplatin resistance in human cervical tumor cells. *Int J Cancer*, 89 (5): 453-7, (2000).

BUCHKO GW, Isern NG, Spicer LD, Kennedy MA. Human nucleotide excision repair protein XPA: NMR spectroscopic studies of an XPA fragment containing the ERCC1-binding region and the minimal DNA-binding domain (M59-F219). *Mutat Res*, 486 (1): 1-10, (2001).

CEPPI P, Volante M, Novello S, Rapa I, Danenberg KD, Danenberg PV, Cambieri A, Selvaggi G, Saviozzi S, Calogero R, Papotti M, Scagliotti GV. ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. *Ann Oncol*, 17 (12):1818-25, (2006).

CHANG IY, Kim MH, Kim HB, Lee DY, Kim SH, Kim HY, You HJ. Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun*, 327 (1): 225-33, (2005).

COBO M, Isla D, Massuti B, Montes A, Sanchez JM, Provencio M, Viñolas N, Paz-Ares L, Lopez-Vivanco G, Muñoz MA, Felip E, Alberola V, Camps C, Domine M, Sanchez JJ, Sanchez-Ronco M, Danenberg K, Taron M, Gandara D, Rosell R. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 25 (19): 2747-54, (2007).

CUMMINGS M, Higginbottom K, McGurk CJ, Wong OG, Köberle B, Oliver RT, Masters JR. XPA versus ERCC1 as chemosensitising agents to cisplatin and mitomycin C in prostate cancer cells: role of ERCC1 in homologous recombination repair. *Biochem Pharmacol*, 72 (2): 166-75, (2006).

DABHOLKAR M, Bostick-Bruton F, Weber C, Bohr VA, Egwuagu C, Reed E. ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 84 (19): 1512-7, (1992).

DABHOLKAR MD, Berger MS, Vionnet JA, Egwuagu C, Silber JR, Yu JJ, Reed E. Malignant and nonmalignant brain tissues differ in their messenger RNA expression patterns for ERCC1 and ERCC2. *Cancer Res*, 55 (6): 1261-6, (1995).

DAMIA G, Guidi G, D'Incalci M. Expression of genes involved in nucleotide excision repair and sensitivity to cisplatin and melphalan in human cancer cell lines. *Eur J Cancer*, 34 (11): 1783-8, (1998).

FUJII T, Toyooka S, Ichimura K, Fujiwara Y, Hotta K, Soh J, Suehisa H, Kobayashi N, Aoe M, Yoshino T, Kiura K, Date H. ERCC1 protein expression predicts the response of cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 59 (3): 377-84, (2008).

GILLET LC, Schärer OD. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev*, 106 (2): 253-76, (2006).

GOSSAGE L, Madhusudan S. Current status of excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in cancer. *Cancer Treat Rev*, 33 (6): 565-77, (2007).

JEMAL A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, 58 (2): 71-96, (2008).

LAN L, Hayashi T, Rabeya RM, Nakajima S, Kanno S, Takao M, Matsunaga T, Yoshino M, Ichikawa M, Riele H, Tsuchiya S, Tanaka K, Yasui A. Functional and physical interactions between ERCC1 and MSH2 complexes for resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in mammalian cells. *DNA Repair*, 3(2): 135-43, (2004).

LI L, Elledge SJ, Peterson CA, Bales ES, Legerski RJ. Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1. *Proc Natl Acad Sci*, 91 (11): 5012-6, (1994).

LI Q, Ding L, Yu JJ, Mu C, Tsang B, Bostick-Bruton F, Reed E. Cisplatin and phorbol ester independently induce ERCC-1 protein in human ovarian carcinoma cells. *Int J Oncol*, 13 (5): 987-92, (1998).

MITCHELL JR, Hoeijmakers JH, Niedernhofer LJ. Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. *Curr Opin Cell Biol*, 15 (2): 232-40, (2003).

NIEDERNHOFER LJ, Odijk H, Budzowska M, van Drunen E, Maas A, Theil AF, de Wit J, Jaspers NG, Beverloo HB, Hoeijmakers JH, Kanaar R. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, 24 (13): 5776-87, (2004).

NIEDERNHOFER LJ, Bhagwat N, Wood RD. ERCC1 and non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, 356 (24): 2538-40, (2007).

OLAUSSEN KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC; IALT Bio Investigators. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*, 355 (10): 983-91, (2006).

OLAUSSEN KA, Mountzios G, Soria JC. ERCC1 as a risk stratifier in platinum-based chemotherapy for nonsmall-cell lung cancer. *Curr Opin Pulm Med*, 13 (4): 284-9, (2007).

PARK CH, Bessho T, Matsunaga T, Sancar A. Purification and characterization of the XPF-ERCC1 complex of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem*, 270 (39): 22657-60, (1995).

REED E. ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. *Clin Cancer Res*, 11 (17): 6100-2, (2005).

ROSELL R, Felip E, Taron M, Majo J, Mendez P, Sanchez-Ronco M, Queralt C, Sanchez JJ, Maestre J. Gene Expression as a Predictive Marker of Outcome in Stage IIB-III A-III B Non-Small Cell Lung Cancer After Induction Gemcitabine-Based Chemotherapy Followed By Resectional Surgery. *Clin Cancer Res*, 10: 4215-19, (2004).

SANCAR A, Reardon JT. Nucleotide excision repair in E. coli and man. *Adv Protein Chem*, 69: 43-71, (2004).

SANTOS ES, Blaya M, Ruez LE. Gene expression profiling and non-small-cell lung cancer: where are we now? *Clin Lung Cancer*, 10 (3):168-73, (2009).

SIMON G, Sharma A, Li X, Hazelton T, Walsh F, Williams C, Chiappori A, Haura E, Tanvetyanon T, Antonia S, Cantor A, Bepler G. Feasibility and efficacy of molecular analysis-directed individualized therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 25 (19): 2741-6, (2007).

SMITH S, Su D, Longrais IA, Schwartz P, Puopolo M, Rutherford T J, Mor G, Yu H, Katsaros D, ERCC1 Genotype and Phenotype in Epithelial Ovarian Cancer Identify Patients Likely to Benefit From Paclitaxel Treatment in Addition to Platinum-Based Therapy, *J Clin Oncol*, 25: 5172-5179, (2007).

TAKENAKA T, Yano T, Kiyohara C, Miura N, Kouso H, Ohba T, Kometani T, Shoji F, Yoshino I, Maehara Y. Effects of Excision Repair Cross-Complementation Group 1 (ERCC1) Single Nucleotide Polymorphisms on The Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Lung Cancer*, 67 (1): 101-7, (2009).

TSODIKOV OV, Enzlin JH, Schärer OD, Ellenberger T. Crystal structure and DNA binding functions of ERCC1, a subunit of the DNA structure-specific endonuclease XPF-ERCC1. *Proc Natl Acad Sci*, 102(32): 11236-41, (2005).

VOLKER M, Moné MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, van Driel R, van Zeeland AA, Mullenders LH. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell*, 8 (1):213-24, (2001).

WANG L, Aakre JA, Jiang R, Marks RS, Wu Y, Chen J, Thibodeau SN, Pankratz VS, Yang P. Methylation markers for small cell lung cancer in peripheral blood leukocyte DNA. *J Thorac Oncol*, 5 (6):778-85, (2010).

WEI Q, Xu X, Cheng L, Legerski RJ, Ali-Osman F. Simultaneous amplification of four DNA repair genes and beta-actin in human lymphocytes by multiplex reverse transcriptase-PCR. *Cancer Res*, 55 (21): 5025-9, (1995).

YU JJ, Mu C, Lee KB. A Nucleotide Polymorphism in ERCC1 in Human Ovarian Cancer Cell Lines and Tumor Tissues. *Mutat Res*, 382: 13-20, (2006).

ZHENG Z, Chen T, Li X, Haura E, Sharma A, Bepler G. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med*, 356 (8): 800-8, (2007).

ZHOU W, Liu G, Park S, Wang Z, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC. Gene Smoking Interaction Associations for The ERCC1 Polymorphisms in The Risk of Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14: 491-496, (2005).

ZIENOLDDINY S, Campa D, Lind H, Ryberg D, Skaug V, Stageland L, Philips DH, Canzian F, Haugen A. Polymorphisms of DNA repair Genes and Risk of Non-Small Lung Cancer. *Carcinogenesis*, 27 (3): 560-567, (2006).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 109S022
Proje Başlığı: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserlerinin Farklı Grade ve Evrelerinde ERCC1'in Protein, mRNA ve DNA Düzeyinde Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç.Dr. Vildan CANER (Proje Yürütücüsü) Uzm.Dr. Nur BÜYÜKPINARBAŞILI (Araştırmacı)
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD Morfoloji Binası Kat:3, 20070 Kınıklı DENİZLİ
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK TÜBİTAK Araştırma Destek Programları Başkanlığı Tunus Cad. No:80 06100 Kavaklıdere-ANKARA
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/08/2009 – 01/08/2010
Öz <p>Bu çalışmada, <i>ERCC1</i> geni için mRNA ve protein ekspresyonu arasında korelasyon belirlenmezken, DNA amplifikasyonu ve mRNA ekspresyonu arasında güçlü bir korelasyon belirlendi. Evre III tümörlerde mRNA ve DNA düzeyinde ERCC1 ekspresyonu diğer evrelere göre daha yüksekti. Bu sonuçlar, ERCC1 ekspresyonu ile ilişkili bir mekanizmanın tümör davranışında rol oynayabildiğini ve ayrıca klinik kullanımdan önce, ERCC1 durumunu belirlemede kullanılan yöntemlerin validasyonlarının ve niteliklerinin belirlenmesinin gerekliliğini göstermektedir.</p>
Anahtar Kelimeler: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, ERCC1, IHK, Gerçek-zamanlı kantitatif PCR
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: Proje ile ilgili henüz bir yayın yapılmamıştır. Ancak, proje verilerinin 01-05 Aralık 2010 tarihinde İstanbul'da düzenlenecek olan "9.Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi"nde "sözlü sunum" olarak aktarılması planlanmış ve bu amaçla bildiri özeti gönderilmiştir.