

Investigation of MACC1-AS1 gene mutations in colorectal cancer

Kolorektal kanserde MACC1-AS1 gen mutasyonlarının araştırılması

Jamal Sadiq Taib Taib¹, Mehri İğci¹, Ersin Borazan², Emine Bayraktar¹, Ahmet Balık², Ecir Ali Çakmak¹, Ahmet Arslan¹

¹Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, University of Gaziantep, Gaziantep, Turkey

²Department of General Surgery, Faculty of Medicine, University of Gaziantep, Gaziantep, Turkey

Abstract

Colorectal cancer is the frequent cause of mortality in Western world. Metastasis associated with colon cancer 1 (MACC1) gene acts as a key regulator of HGF/Met pathway and is expressed highly in colorectal cancer. MACC1 serves as a prognostic indicator for invasion and metastasis of several cancers. Potential links between MACC1 AS1 RNA locus that located in the intron 6 of MACC1 gene and high expression of MACC1 are unknown. Herein, the secondary structure of MACC1-AS1 noncoding RNA and the complementarities between MACC1 mRNA and MACC1-AS1 were analyzed by RNAfold and IntaRNA programs. Since MACC1-AS1 has a proper secondary structure to hybridize with MACC1 mRNA, a potential role of MACC1-AS1 in regulation of MACC1 expression could be thought. The study included 104 controls and 96 patients. Genomic DNA was isolated from blood samples and analyzed by PCR-SSCP and sequence analysis. Three fragments and six genotypes (1, 2, 3, 1&2, 1&3, 2&3) were observed in the exon 1 of MACC1-AS1. A and GT (rs200028381) insertions in genotype 1, G>A substitution and A insertion in genotype 2 were detected. However, no association was observed between these SNPs and colorectal cancer ($P>0.05$). This is the first investigation on MACC1-AS1 gene mutation in colorectal cancer using molecular techniques. Novel SNPs in exon 1 were identified. In order to understand the association between colorectal tumors and MACC1-AS1 RNA expression clearly; further analysis, like Western blotting and immunohistochemistry of MACC1 and RNA analysis for MACC1-AS1, are needed.

Keywords: Colorectal cancer; DNA sequence analysis; MACC1-AS1; mutation screening

Özet

Kolorektal kanser, batı dünyasında sık gözlenen ölüm nedenlerindedir. Metastazla ilişkili kolon kanseri 1 (MACC1) geni, HGF/Met yolağının anahtar düzenleyicisidir. Kolorektal kanserde yüksek oranda ifade olmaktadır. MACC1 geninin altıncı intronunda MACC1-AS1 karşıt anlamlı RNA bölgesi bulunmaktadır. Bu çalışmada, kodlanmayan MACC1-AS1 RNA'sının ikincil yapısı RNAfold, MACC1 mRNA'sı ile arasındaki etkileşim IntaRNA adlı programlarla analiz edilmiş ve MACC1 gen ifadesinin kontrolünde rol almaya uygun yapısı nedeniyle kolorektal kanserde gözlenen MACC1'in yüksek ifadesi ile ilişkili olabileceği varsayılmıştır. Konu ile ilgili açık bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışma MACC1'in kodlanmayan bölgesindeki (MACC1-AS1) olası genomik değişimler ve kolorektal kanser arasındaki bağlantıyı araştıran ilk çalışmadır. Çalışmaya 104 kontrol ve 96 hasta birey katılmıştır. Kan örneklerinden elde edilen genomik DNA polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle çoğaltılmış ve tek zincir konformasyon polimorfizmi (SSCP) ile analiz edilmiş ve dizin analizine tabi tutulmuştur. Kontrol ve hasta örneklerinde ekzon 1'de, üç farklı banttan (1, 2, 3) oluşan 6 genotip (1, 2, 3, 1&2, 1&3, 2&3) gözlenmiştir. Dizin analizi neticesinde genotip 1'in bir A eklenmesi ve ayrıca GT eklenmesi (rs200028381), genotip 2'nin ise G>A yer değişimi ve A eklenmesi barındırdığı görülmüş; ancak, genotip 3'te bir farklılık bulunamamıştır. Ancak, bu değişimler ve kolorektal kanser tanısı arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır ($P>0.05$). Çalışmamız moleküler teknikler kullanılarak kolorektal kanserde MACC1-AS1 gen mutasyonlarının araştırıldığı ilk çalışmadır. MACC1-AS1'de muhtemel mutasyonların MACC1'in transkripsiyonel düzenlenmesinde başarısızlığa neden olabileceği ve artmış MACC1 ifadesine sebep olacağı düşünülerek araştırma tasarlanmıştır. Ancak kolorektal tümörler ve MACC1-AS1 arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır. İmmünohistokimya, western blotlama ve mRNA ifade analizi gibi ileri analizlere ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kolorektal kanser; DNA dizin analizi; MACC1-AS1; mutasyon tarama

Giriş

Kolon kanseri veya kolorektal kanser (KRK) üçüncü en yaygın kötü huylu kanserdir (1,2). Birleşik Devletler ve Avrupa Birliği ülkelerinde kadın ve

erkeklerin her ikisini etkileyen, giderek artan küresel oluş sıklığıyla ölümlere neden olan ikinci kanserdir (1-3). Tümörler kolon ve/veya rektum duvarlarında yerleşmiş polip olarak adlandırılan kontrolsüz bölünen hücrelerden gelişebilir, iyi huylu veya kötü huylu olabilir (4). Selim poliplerin zamanla adenomatoz dokuya ilerlemesi adenokarsinomaya

Correspondence: Mehri İğci, Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, University of Gaziantep, Turkey

Tel+90 342 3601200/3396

mehriigci@gmail.com

Received: 10.03.2014 **Accepted:** 24.03.2014

ISSN 2148-3132 (print) ISSN 2148-2926 (online)

www.gaziantepmedicaljournal.com

DOI: 10.5455/GMJ-30-154367



neden olabilir ve gerçekte, tüm kolorektal kanserlerin yaklaşık %96'sı adenomatoz dokulardan gelişir (4). Kanser, tümör oluşumunu başlatmak için diğer organlara yayılım yapabilir (4). Yayılım (metastaz) tedavi başarısızlığının en sık nedenidir (4). Birçok çalışma, kolorektal kanserin yaş, aile hikayesi veya inflammatör bağırsak hastalığı, sigara, alkol tüketimi, obezite ve diyet gibi bir dizi risk faktörüyle bağlantılı olduğunu yansıtmaktadır (4).

Son zamanlarda, Stein ve ark. (5) *metastasis-associated colon cancer 1* (MACC1) adında yeni bir gen belirlemişlerdir. MACC1 insanda kromozom 7'de (7p21.1) yerleşiktir ve hücre çoğalması, yayılımı, göçü ve koloni oluşumunu teşvik eder (5). MACC1 mRNA'sının yüksek ifadesi, halen kullanılan Uluslararası Kanserle Mücadele Birliği/Amerika Kanser Komitesi (AJCC/TNM) tümör evrelemeden bağımsız, tümör dokularda yayılım ve kolon kanserlerinin tekrarlaması için önemli bir belirleyicidir (5). Birincil tümörlerde 5 yıllık sağkalım oranı, yüksek MACC1 ifadeli hastalar için %15 olan sağkalım oranıyla karşılaştırıldığında, düşük MACC1 ifadeli hastalarda %80'dir (5-7).

MACC1, HGF/MET sinyal yolağının etkinleşmesi üzerinden tümör gelişimi ve yayılımının anahtar bir düzenleyicisi olarak görev alır (5,6). Hücre çoğalması, hareketlilik, nüfus edebilirlik ve yayılımı sağlamak için epitelyal-mezenkimal geçişte önemli bir rol oynar (5,7). MACC1 proteini bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür ve reseptör tirozin kinazların (Met) özendirici bölgelerine (promoter) bağlanır (5-8). Met'in transkripsiyon etkinliğini uyararak için esas olan, Met özendirici bölgesi üzerinde özel Sp1 bağlanma bölgelerinin 60 bç yakınına bağlanır ve HGF/c-Met uyarı yolağının etkinliğini uyarır ve hücre çoğalmasını, hareketliliğini ve yayılımı artırır (9). Böylece, MACC1 Met özendirici bölge etkinliğini ve ifadesini kontrol ederek Met geninin ifadesini düzenler (9). Klinik çalışmalar MACC1'in uzak yayılımcı gelişim için tanı koydurucu bir belirteç ve yüksek yayılım riskli kolorektal kanser belirlenmesine olanak olduğunu düşündürmektedir (10). Çünkü MACC1, birincil kolon kanserine göre yayılımcı kolon kanserinde aşırı ifade olur (5,6,8-10). Benzer şekilde, normal dokulara göre birincil kolon kanserinde de aşırı ifade olur (9,11). Bu da, MACC1 mRNA aşırı ifadesinin mide (12), akciğer (13,14), hepatosellüler (15,16), yumurtalık (17) ve pankreatik kanser (18) gibi diğer katı tümörler için sağkalımı ve kanser ilerleyişi için bir biyobelirteç olarak görülebileceğini düşündürmektedir.

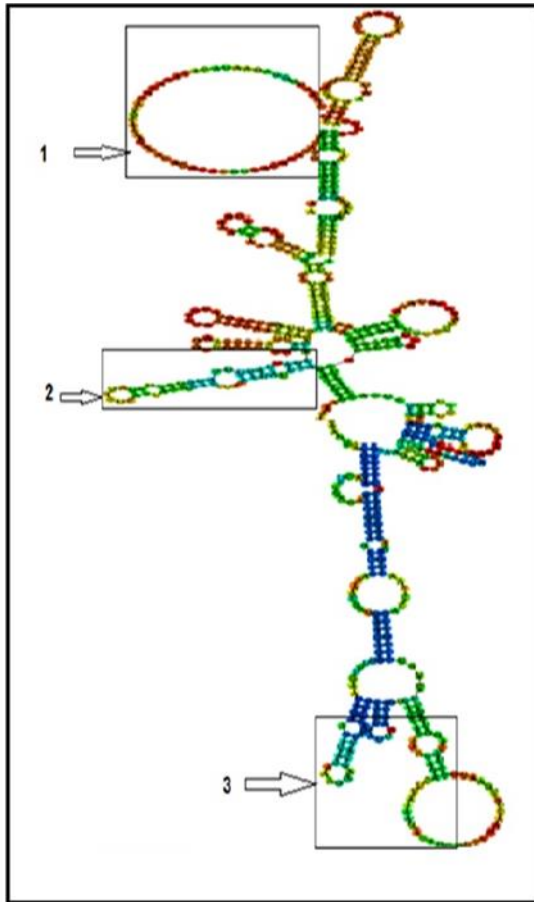
MACC1 geni, yedi ekzon ve altı intron içerir (7). MACC1 852 amino asitlik bir protein kodlar. Kromozom 7'de işlev kazanımı veya p-kolonun seçimli kazanımı KRK'lerde göreceli olarak sık bir oluşumdur (7). 7p21.1 üzerinde bu değişimler MACC1 aşırı ifadesinin teşvik edilmesine izin verebilir (7,19).

Organizmaların olduğu kadar doku ve organlar da hücre sağkalımı için tüm etkin işlevlerini sürdürmeye ihtiyaç duyarlar (20). Protein sentezinin düzenlenmesi sıkıca kontrol edilmelidir (20). Protein sentezi hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası düzeyde kontrol edilir (20). Transkripsiyonel düzeyde, küçük RNA, mikroRNA ve kodlanmayan büyük RNA'nın tamamlayıcı baz çiftlerinin düzenleyici işlevlerde çeşitliliğe sahip olduğu görülür (20). Son günlerde bu kodlanmayan karşıt anlamlı RNA üzerine olan ilgiler, proteinin sentezinin transkripsiyonel düzeyde bile karmaşık bir düzenlemeye girdiğini ortaya koymaktadır. Kodlanmayan bu RNA'lar küçük çekirdekçik RNA'ları (snoRNA), mikroRNA'lar (miRNA), kısa müdahil (interference) RNA'lar (siRNA), küçük çift zincirli RNA'lar (20) ve kodlanmayan büyük RNAlardır (lncRNA) (21). Kodlanmayan bu RNA'lar kromatin yapımını, RNA düzenlenmesini, RNA uygunluğunu, translyasyonu ve olası transkripsiyon ve ayıklanmayı içeren çoğu düzeylerde gen ifadesini düzenler (20). Karşıt anlamlı RNA'lar ayrıca protein transkriptlerini içeren daha uzun birincil transkript ekzonlar ve intronlardan çok basamaklı yolaklarla işlenir (20). Çoğu gelişimsel farklılaşmada olduğu gibi embriyonal kök hücre farklılaşmasına katılan dokuya özgün ifade kalıpları gösterir ve bazıları mühürlenmiştir (*imprinted*) (20). Böylece, organizmalarda geniş bir oranda gelişimsel ve fizyolojik yolakları kontrol etmek için görev alırlar (20). Kodlanmayan dizilerin transkripsiyonu ve küçük RNA'ların bolluğu, kalıtımla oluşan dış görünümle ilişkisi ve gelişim için geniş düzenleyici bir ağı akla getirir (20). Sağlıkta ve hastalıkta özellikle kanser gelişiminde kodlanmayan küçük RNA'lar tarafından protein sentezinin düzenlenmesi birçok çalışmayla örneklendirilmiştir (21).

Bu çalışmada biz, MACC1 gen ürünü düzeyleri kanser hastaları için sağkalım oranlarını yansıttığı için, MACC1 gen ürünü ifade düzeylerini belirleyen düzenleyici mekanizma(lar)nın var olabileceğini varsaydık. MACC1 karşıt anlamlı RNA 1 (MACC1-AS1)'in açıklığa kavuşturulacak hedef bölgelerden biri olduğunu öngördük. MACC1-AS1 kodlanmayan RNA geni 11616 nt uzunlukta MACC1 geninin 6. intronunda bulunmaktadır (19). Bu çalışmada, MACC1-AS1 RNA'sının tahmini ikincil yapısı *RNAfold* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=oEddQ8Anca>) programı yardımıyla (Şekil 1), MACC1 mRNA'sı ile MACC1-AS1 arasındaki olası eşleşme bölgeleri ise *Freiburg RNA Tools IntaRNA* (<http://rna.informatik.unifreiburg.de:8080/v1/IntaRNA.jsp>) programı (Şekil 2) kullanılarak tespit edilmiştir. Ayrıca, moleküler genetik laboratuvar yöntemlerinin kullanılmasıyla, MACC1-AS1 kodlanmayan RNA genindeki olası değişikliklerin varlığını incelemek ve kolorektal kanser ile ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem**Örneklerin toplanması ve DNA eldesi**

Gaziantep Üniversitesi Cerrahi Anabilim Dalı tarafından toplanan 96 [59 erkek (ortalama yaş: 54,22) ve 37 kadın (ortalama yaş: 51,64)] hasta ve 104 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 200 bireyin kan örneği incelendi. Hastalar klinik özellikleri, cinsiyeti, yaş ortalaması ve kanser tiplerine (birincil oluşum yerine, metastaza ve erkek ve kadınlarda kanser gelişiminin sıklığına) bağlı olarak gruplandırıldı (Tablo 1). Çalışma için hastaların onayı ve etik kurul izni alınmıştır (Karar No: 05.02.2013/54). Hasta ve sağlıklı kontrol örneklerin kan örneklerinden tuz-kloroform metoduyla DNA elde edildi. DNA örnekleri ileri analizlere kadar -20°C'de saklandı.



Şekil 1. MACC1-AS1 RNA'sının RNAFold isimli programla elde edilen tahmini ikincil yapısı. Ok ile gösterilen bölge 1, ekzon 1'in içinde; bölge 2 ekzon 2'nin içinde ve bölge 3 ekzon 3'ün içinde yer almaktadır (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=oEddQ8Anca>).

MACC1-AS1 RNA'sının ikincil yapısının tahmini ve MACC1 mRNA'sı ile etkileşimi

Kodlanmayan MACC1-AS1 RNA'sının ve MACC1 mRNA'sının nükleotid dizileri NCBI veri tabanından indirildi. İlk olarak, MACC1-AS1 karşıt anlamlı RNA'nın ikincil yapısını öngörmek amacıyla RNAFold isimli program (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi->

[bin/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=oEddQ8Anca](http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi?PAGE=3&ID=oEddQ8Anca)) (Şekil 1) kullanıldı.

Tablo 1. Kanser türü ve cinsiyete göre hasta örnek sayısı

Kanser Tipleri	Erkek	Kadın	Toplam
Kolon adenokarsinomu	28	10	38
Kolon kanseri	8	2	10
Kolon kanseri metastazı	14	10	24
Kolorektal kanser	5	11	16
Rektal adenokarsinom	1	2	3
Rektal kanser	1	1	2
Apendiks kanseri	1	1	2
Anal kanal kanseri	1	0	1
Toplam	59	37	96

Sonrasında MACC1-AS1 RNA'sı ve MACC1 mRNA'sı arasındaki muhtemel etkileşimleri görebilmek amacıyla online tahmin aracı IntaRNA (<http://rna.informatik.unifreiburg.de:8080/v1/IntaRNA.jsp>) (Şekil 2) kullanıldı.

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR)

MACC1 geninin 6. intronunda bulunan kodlanmayan MACC1-AS1 geninin (GI: 224589819:20181539-20193154 Homo sapiens kromozom 7, GRCh37.p10 Primary Assembly) dört ekzonunu çoğaltmak amacıyla SDSC Workbench primer tasarım programı (<http://workbench.sdsc.edu>) kullanılarak 4 çift primer tasarlanmıştır (Tablo 2). Polimeraz zincir tepkimesi 10X (NH₄)₂SO₄'lı tampon, 2 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 2 mM dNTP karışımı, 1'er µl 20 mM ileri ve geri primerler ve 1 u Taq DNA polimeraz varlığında; MJ Research, AB Applied Biosystem PCR cihazları kullanılarak 94°C 40 sn, 59.6°C 45 sn ve 72°C 30 sn ısı döngü koşulları altında gerçekleştirilmiştir.

Tek iplik konformasyon polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)

Çoğaltılan PCR ürünleri 49:1 %7'lik poliakrilamid jelle yüklenerek 16 saat 430 V elektroforeze tabi tutulmuştur. Hareketliliğinde farklılık gözlenen bantlar jelden kesilerek dizin analizi için hazırlanmıştır.

Nükleotid dizin analizi

Dizilenmek üzere hazırlanan 5 µl PCR ürünü 2µl ExoSap ile karıştırılarak 37°C'de 30 dk, 85°C'de 15 dk bekletilmiştir. Dizin PCR'ı kalıp DNA, 2 µM primer, 5X tampon ve BigDye (v3.0) varlığında; 96°C 10 sn, 50°C 5sn ve 60°C 30 sn (25 tekrar) ısı döngü koşullarında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ürünler Sephadex ile saflandırıldıktan sonra ABI 3330 dizin analiz cihazına yüklenmiştir.

İstatistiki hesaplamalar

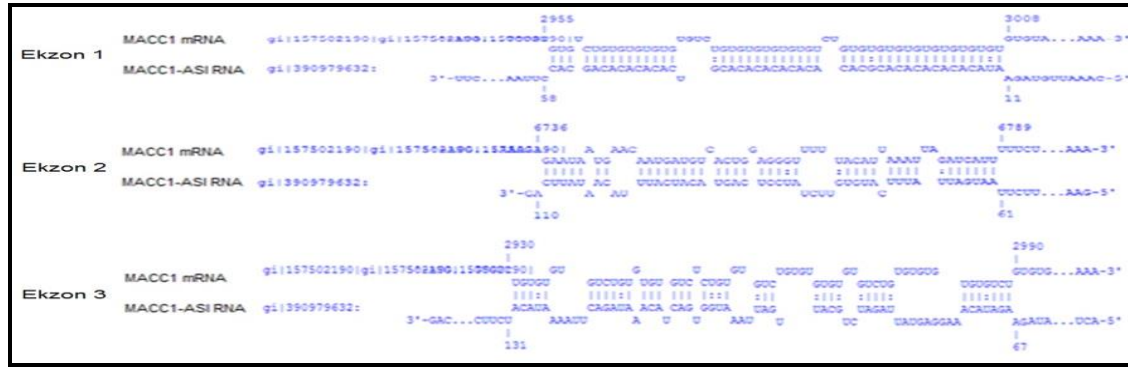
Sonuçları değerlendirmek amacıyla Fisher exact testi kullanılmıştır.

Bulgular**SSCP sonuçları**

Ekzon 2, ekzon 3 ve ekzon 4'ün SSCP sonuçlarında farklı hareketlilik gösteren banda (genotip)

Tablo 2. MACC1-AS1 geninin dört ekzonunu çoğaltmak üzere tasarlanan primer çiftleri ve elde edilen ürün büyüklükleri görülmektedir.

Primer ismi	Primer dizisi (5'>3')	PCR ürünü (bp)
Ekzon 1		
MACC1-AS1-1FW	CCCCCAAATAAGCAAATAAT	180 bp
MACC1-AS1-1RV	AGAGACAAAGGCAGACCAAA	
Ekzon 2		
MACC1-AS1-2FW	CAACAGCAATCTTACCTTCAACA	250 bp
MACC1-AS1-2RV	AATTACATTTTGTACATTAAGGATT	
Ekzon 3		
MACC1-AS1-3FW	AAGCCAGCGAAGTCAATGTT	254 bp
MACC1-AS1-3RV	TTCTTGAAAATCAACAACCTTCTTATC	
Ekzon 4		
MACC1-AS1-4FW	TGCTGTTAGGCACAAGTTAAACA	346 bp
MACC1-AS1-4RV	TTGATTGACTCTACTTTTCATGC	

**Şekil 2.** MACC1-AS1 RNA'sı ve MACC1 mRNA'sı arasındaki tamamlayıcı bölgeler görülmektedir. İntaRNA programı yardımıyla elde edilmiştir (http://rna.informatik.uni-freiburg.de:8080/v1/IntaRNA.jsp)**Tablo 3.** Hasta ve kontrol örneklerinde genotiplerin dağılımı

Genotip	Hasta		Kontrol	
	Adet	Yüzde (%)	Adet	Yüzde (%)
1	3	3.19	2	1.92
2	14	14.89	14	13.46
3	9	9.75	20	19.23
1,2	12	12.76	16	15.38
1,3	18	19.14	17	16.34
2,3	32	34.04	31	29.80
X	8		4	
Toplam	96		104	

rastlanmamıştır. MACC1-AS1 geninin 1. ekzonunda sağlıklı ve hasta örneklerinde, altı farklı genotip tespit edilmiştir (Şekil 3). Genotip 1, 2, 3, 1&2, 1&3 ve 2&3, sırasıyla tüm örneklerde % 5,0, % 28,35, % 28,98, % 28,14, %35,48 ve % 63,84 sıklıkla belirlenmiştir (Tablo 3).

Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında tüm genotip dağılımı Tablo 4'te gösterilmiştir. Veriler istatistiksel olarak Fisher exact test kullanılarak değerlendirilmiştir (P>0.05). MACC1-AS1 geni ve kolorektal kanser gelişimi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Dizileme sonuçları

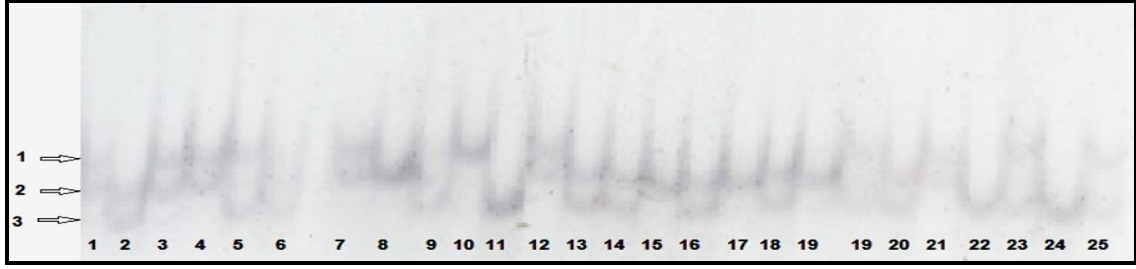
SSCP sonucunda farklı hareketlilik gösteren birinci ekzon örneklerinden, altı farklı genotip (1, 2, 3, 1&2, 1&3 ve 2&3), mutasyon veya çokyapılılık belirlemek üzere dizilenmiştir. MACC1-AS1'in nükleotid dizisi NCBI veri tabanından indirilerek hasta örneklerinden elde edilen DNA dizin sonuçlarını karşılaştırmada kullanılmıştır.

Genotip 1, 2 ve 3'de birtakım değişiklikler bulunmuştur. Genotip 1'de A (adenine) ve GT (guanin timin) (rs200028381) eklenmeleri gözlenmiştir (Şekil 4). Genotip 2'de G>A yer değiştirmesi ve adeninin eklenmesi görülmüştür (Şekil 5). Genotip 3'de bir değişim saptanmamıştır.

Tartışma

Kolorektal kanser dünya çapında ölüme neden olan ikinci kanserdir ve en yaygın üçüncü kanser tipidir (4). MACC1 geni tüm genom (*whole-genome screening*) araştırmalarıyla keşfedilmiş yeni tanımlanmış bir genidir (5). MACC1 uzak metastaz oluşumunda tanımlanabilecek bir belirteçtir ve metastatik kanser için yüksek riskli kolorektal kanser hastalarının belirlenmesine olanak sağlar. Bu genler insan kolon kanser dokularında, normal dokularda, birincil tümörlerde ve metastazda farklı bir şekilde ifade edilirler (5).

Stein ve arkadaşları (7) MACC1 mRNA ifadesinin kolorektal kanserinde, hastalısız sağkalım ve tekrarlamada bağımsız bir tanı belirteci olabileceğini

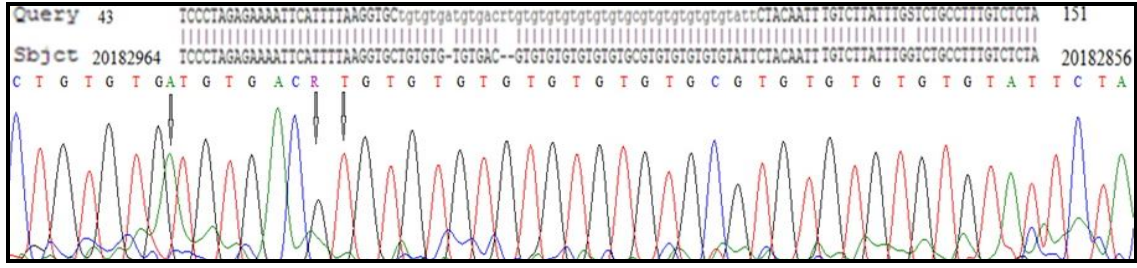


Şekil 3. Poliakrilamid jel elektroforezi sonrası gümüş boyama ile elde edilen SSCP bandlarının görünümü. (1), (2), (3), (1 & 2), (1 & 3), (2 & 3) numaralı genotipler gözlenmiştir. 1 numaralı genotip 10. kuyuda, 2 numaralı genotip 8, 15, 17 ve 19. kuyuda, 3 numaralı genotip 6, 9, 11, 23 ve 25 numaralı kuyularda, 1&2 genotipi 1, 3, 4, 7, 12 ve 22 numaralı kuyularda, 1&3; 5, 20, 24 ve 26 numaralı kuyularda ve 2&3 genotipi ise 2, 13, 14, 16, 18 ve 21 numaralı kuyularda görülmektedir.

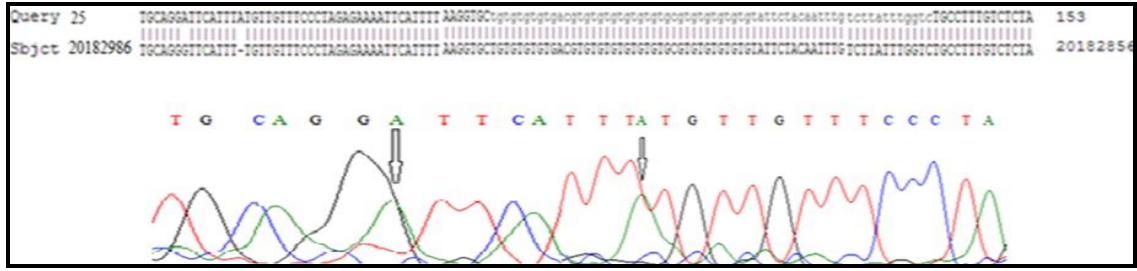
bildirmiştir. Yüksek MACC1 mRNA ifadesi olan MACC1 mRNA ifadelili kolorektal kanserli hastalardaki %15 oranıyla karşılaştırıldığında düşük hastaların sağkalım oranı %80'dir (5).

Tablo 4. Hem hasta hem kontrol gruplarının genotip dağılımı ve P değerleri

Kanseri Tipleri	Genotip	Erkek	Kadın	Toplam	P değeri
Kolon adenokarsinomu	1	1	2	3	0,1191
	2	3	3	6	0,7865
	3	4	0	4	0,3128
	1,2	3	0	3	1,0000
	1,3	4	2	6	1,0000
	2,3	11	2	13	0,6831
	X	2	1	3	0,3847
Toplam		28	10	38	
Kolon kanseri	3	0	1	1	0,4481
	1,2	2	0	2	1,0000
	1,3	2	1	3	0,4388
	2,3	4	0	4	1,0000
	Toplam	8	2	10	
Kolon kanseri metastazi	2	2	3	5	0,3588
	3	2	1	3	0,5624
	1,2	1	1	2	0,5217
	1,3	2	3	5	0,7650
	2,3	4	2	6	0,8038
	X	3	0	3	0,1262
	Toplam	14	10	24	
Kolorektal kanser	2	2	1	3	0,7190
	3	0	2	2	0,5215
	1,2	1	2	3	1,0000
	1,3	1	1	2	0,7347
	2,3	1	4	5	1,0000
	X	2	1	3	0,0679
	Toplam	7	11	18	
Rektal kanser	1,2	1	0	1	1,0000
	2,3	0	1	1	1,0000
	Toplam	1	1	2	
Rektal Adenokarsinom	1,3	0	1	1	1,0000
	2,3	1	1	2	1,0000
	Toplam	1	2	3	
Apendiks kanseri	1,2	1	0	1	1,0000
	2,3	0	1	1	1,0000
	Toplam	1	1	2	
Anal kanal kanseri	1,3	1	0	1	1,0000
	Toplam	1	0	1	
Toplam		59	37	96	



Şekil 4. Genotip 1'de gözlenen A ve GT (rs200028381) eklenmeleri oklarla işaret edilmiştir.



Şekil 5. MACC1-AS1 geninin 1. ekzonunda gözlenen 2 numaralı genotipin dizin analizi sonucu. Oklarla işaret edilen G>A değişimi ve adenin (A) eklenmesi gözlenmiştir.

Ayrıca Stein ve arkadaşları (5,7), MACC1 geninin insan 7. kromozomu üzerinde 7p21.1 kromozomal bölgede bulunduğunu ve hücre göçü, yayılım, koloni oluşumu ve çoğalmayı artıran tanı amaçlı kullanılabilir bir belirteç olduğunu göstermişlerdir. MACC1, yayılım göstermeyen tümörlerin sitoplazmasında baskın olarak gözlenirken, esas olarak yayılımcı tümör hücrelerinin çekirdeğinde ifade olduğu gözlemlendi. Fakat yayılımcı tümör HGF ile muamele edildiğinde, MACC1 mRNA'sı sitoplazmadan çekirdeğe geçme yeteneğindedir ve ifadesini düzenlemek için özgün Met özendirici bölgesinin Sp1 uyuşum dizisine bağlanır (5,7). MACC1 transkripsiyonel hedef geni MET için ana düzenleyici olarak görev alır. Özendirici bölgesine bağlanarak Met ifadesini ve etkinliğini kontrol eder (5,7,9). Bu bulgular, MACC1'in HGF/Met uyarı yolunun düzenlenmesi için ana anahtar olarak görev aldığına kanıtlanmaktadır. Dahası, MACC1 MAPK uyarı yoluna katılabilir (5,7,9).

Bu çalışma, MACC1 geninin 6. intronunda bulunan MACC1-AS1 geninin ekzonlarında oluşması muhtemel çokyapılılığın etkisini ve KKR'in tanısındaki etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. Bu çalışmada, hasta ve sağlıklı kontrol örneklerinde MACC1-AS1 geninin birinci ekzonunda tanımlanmamış bir tek nükleotid polimorfizmi (SNP) bulunmuştur. Bununla birlikte, ortaya çıkan genotipler ve fenotip arasında anlamlı bir ilişki olmadığı gözlenmiştir. Karşıt anlamlı RNA'ların prokaryotik ve ökaryotik organizmaların her ikisinde de gen ifadesinin düzenlenmesinde işlevsel olduğu bilinmektedir (22).

Karşıt anlamlı RNA tarafından gen ifadesinin düzenlenmesi kavramı, tamamlayıcı bir nükleotid dizisine sahip olan karşıt anlamlı RNA'nın

transkripsiyonunu içerir. Özgün hedef mRNA ile hibridize olabilir ve RNA-RNA hibridizasyonu oluşur. RNA sarmalının oluşumu transkripsiyon, ayıklanma, RNA taşınımı, translasyon ve RNA kararlılığı gibi çeşitli basamaklarda gen ifadesini engelleyebilir (23). Gen ifadesini düzenlemek için karşıt anlamlı RNA işlevini etkileyen bazı hücrel etkenlerin var olduğu ve ayrıca ortaya çıkan RNA'nın akıbetine ve etkili RNA-RNA etkileşimlerinin her ikisine de bağlı işlevlerinin olduğu ileri sürülmüştür (23).

MACC1, miRNA-143'ün hedefidir, yüksek miRNA-143 ifadesi belirgin bir şekilde MACC1 protein ifadesini azaltır (8). KRK yayılımında, miRNA-143'ün, MACC1 genini hedefleyerek KRK hücre yayılımı ve göçünü baskıladığı bulunmuştur (8). Stein ve arkadaşları (5), MACC1 siRNA'sı ile muamelelerin Met yıkımı ve göç veya çoğalmanın engellenmesiyle sonuçlandığını, SW620 hücre hattında MACC1 siRNA veya MET siRNA'sı ile muamele edildiğinde hücre hareketinin ve çoğalmasının engellediğini fakat MET siRNA'sı ile muamele edildiğinde MACC1 ifadesine etki etmediğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, anal kanal kanserinde, kör bağırsak kanserinde, rektal kanserde, kolorektal kanserde, kolon kanser metastazında, kolon kanserinde, rektal adenokarsinomada ve kolon adenokarsinomasında MACC1 ekzon bir kodlanmayan bölgesinde bazı yeni SNP'ler (MACC1-AS1 RNA geni) ve tanımlanmış bir SNP (rs200028381) belirledik. Ancak kanser varlığı ile anlamlı bir ilişki gözleyemedik.

Schmid ve arkadaşları (24) birincil kolorektal tümörlerde MACC1'in kodlanan bölgesinde rs4721888, rs975263, rs3735615 numaralı SNP'ler belirlemişlerdir. Fakat bu SNP'ler ile MACC1 ifadesi arasında, metakronoz metastazda olduğu gibi yaş,

cinsiyet, UICC-evreleri, tümör ve lenf nodu infiltrasyonu gibi klinik etkenlerle birlikte ilişki gözlenmemiştir (24). Lang ve arkadaşları (25), KRK'li hastalarda ölüm için artmış risk ile MACC1'de yer alan SNP rs1990172 arasında pozitif ilişki bulmuştur. Genotiplenmiş SNP'ler rs3114446, rs10275612, rs3095007, rs3095009 ve rs7780032'nin genel sağkalımla ilişkili olmadığı görülmüştür (25). Bu değişkenlerin hepsi kodlanmayan veya düzenleyici olmayan bölgelerde bulunmaktadır ve HapMap veri tabanında verilen işlevsel SNP'lerin hiçbirisiyle yüksek bağlantı eşitsizliğinde (*linkage disequilibrium*) değildir (25). Çeşitli zararlı varsayılan SNP'ler MACC1 lokusunda bulunmaktadır: 390. noktada erken dur kodonunun oluşmasıyla bağlantılı olarak SNP rs2108292, 670 numaralı amino asit sonra okuma çerçevesinde kaymaya neden olan rs36106647 ve rs35043094 numaralı SNP'ler bilinmektedir (25).

MACC1'in birincil ve metastatik tümörlerde daha yüksek miktarda ifade olduğu, kolon kanser metastazı ve metastazsız sağkalım için (5,7,10) ayrıca uzak metastaz oluşumu ve bazı kanser tiplerinin sağkalımında, MACC1'in aşırı ifadesinin tanı koydurucu hayati etken olduğu çeşitli çalışmalarda incelenmiştir (5,7,10). MACC1 kolorektal kansinomada tanı koydurucu bir belirteçtir (11). Ayrıca bazı çalışmalar mide (12), akciğer kanseri (13,14), hepatosellüler karsinoma (15), yumurtalık kanseri (17) ve pankreatik kanser (18) metastazında yüksek düzeyde MACC1 mRNA varlığını göstermiştir.

MACC1'in aşırı ifadesi, yerleşik bulunduğu, kromozom 7p21.1'de anöploididen kaynaklanabilir (11). Aslında, Galimi ve arkadaşları (11) tarafından gösterildiği gibi, MACC1 ifadesi metastatik KRK'de kromozom 7'nin polizomisi veya p-kolonun ploidiyle ilişkilidir. Çünkü MACC1 kolon kanserinde MET gen ifadesinin düzenlenmesiyle göç, yayılım ve hücre çoğalmasını artırabilir (5). MET'in aşırı ifadesi HGF/MET sinyal yolağının düzenini bozar, artmış hücre çoğalması, istila ve yayılıma neden olur (26).

MACC1 proteininin c-Met özendirici bölgesine bağlanarak ve c-Met ifadesini artırarak HGF/c-Met uyarı yolağında anahtar düzenleyici olarak görev alır (26). Met almaç farklı hücre tiplerinde ve farklı stres koşullarına yanıtta hücre ölümü öncesi (pro-apoptotik) ve hücre ölümüne karşı (anti-apoptotik) önemli bir role sahiptir (27). HGF sitoplazmadan çekirdeğe MACC1'in yer değişimini sağlayabilir (28). MACC1 Met geninin özendirici bölge etkinliğini kontrol eder ve almaç tirozin kinaz Met'in transkripsiyonunu etkinleştirir, bu Met proteininin artmış miktarları ile bağlantılıdır ve Met daha fazla ligand (HGF) molekülüne bağlanarak metastaz, çoğalma, hücre hareketi, HGF/Met uyarısında artışa neden olabilir (28). Etkinleştirilmiş MET, anjiyogenez, yayılım, istila, anti-apoptoz ve hücre sağkalımına neden olan MAPK ve PI3K/Akt yolağı gibi çeşitli uyarı yollarını tetikler (28). HGF/MET uyarı

yolağındaki aşağı yönlü olaylar Grb2-Ras-MAPK yolağını kapsar, ileride uyarı iletiminde MACC1'in katılımı olasıdır (5).

Kolorektal kansinomalar, çoğalmayı, gelişimi, hücre döngüsünün ilerleyişini, hücre ölümünü, hücre tutunmasını, DNA tamirini düzenleyen genlerde ve uyarı-ileti işlemlerine katılan genlerde mutasyonların sonucu olarak bir dizi histopatolojik değişiklikler üzerinden artar ve ilerlerler (28). Örneğin, tümör baskılayıcı genlerde (APC, p53, DCC, ve SMAD4), etkin olmayan mutasyonlar, onkogenlerde (K-Ras, c-Myc ve B-katenin) etkin mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler (28). APC mutasyonları tümör ilerleyişinin erken evrelerinde oluşur, kolon tümörlerinin %85'inde APC mutasyonu görülür ve Wnt uyarı yolağının "kapı bekçisidir" (29). Ayrıca B-katenin, Wnt yolağında önemli bir rol oynar ve sıklıkla hücre döngüsü, çoğalma ve hareketliliğini düzenleyen siklin D1, S100A4 veya MMP7 gibi hedef genlerin transkripsiyonunun tetiklendiği kolon kanserlerinde mutasyona uğramıştır (28). K-Ras gen mutasyonu uyarı iletiminin bozulmasına ve çoğalmaya neden olur. Buna ek olarak, MET ve ErbB2'nin almaç tirozin kinazları kolon kanserinde sıklıkla yüksek oranda ifade olur ve ayrıca tümör ilerlemesinde önemli bir rol oynar (28,30). Birçok risk etkeni kolorektal kanser ilerleyişi ve gelişimiyle bağlantılıdır. Yaş (kolorektal kanser vakalarının %90 dan fazlası 50 yaş ve üstü insanlarda gelişir), adenomatoz poliplilerin kişisel hikayesine benzer kalımsal etkenler, inflamatuvar bağırsak hastalığı, adenomatoz polipler veya kolorektal kanser aile hikayesi, kalımsal genetik risk, beslenme, fiziksel etkinlik ve obezite, sigara içme, aşırı alkol tüketimi ve diğer faktörleri içeren önemli sayıda çevresel faktör ve yaşam tarzı risk etkenleridir.

Bu çalışma moleküler teknikler kullanılarak MACC1-AS1 geni ve kolorektal kanser gelişimi arasında ilişkiyi inceleyen ilk çalışmadır. Ancak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. Fakat MACC1-AS1 geninin 1. ekzonunda bazı yeni SNP'ler belirlenmiştir. Kolorektal tümörler ve MACC1-AS1 RNA ifadesi arasında ilişkiyi ortaya koyabilmek için western blotlama, RNA ifadesinin incelenmesi gibi ileri analizlere ihtiyaç olduğu görülmüştür; çalışmalara başlanmıştır.

Kaynaklar

- 1- American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts and Figures. 2009-2011 Special, Edition 2010. Atlanta: American Cancer Society, 2010.
- 2- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2009. Atlanta: American Cancer Society; 2009. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/500809webpdf.pdf> Accessed on 24 March 2014.
- 3- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin 2009;59(4):225-49.
- 4- American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2011-2013. Atlanta: American Cancer Society, 2011. http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiology_surveillance/documents/document/acspc-028323.pdf Accessed on 24 March 2014.

- 5- Stein U, Walther W, Arlt F, Schwabe H, Smith J, Fichtner I, et al. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nat Med* 2009;15(1): 59-67.
- 6- Stein U, Burock S, Herrmann P, Wendler I, Niederstrasser M, Wernecke KD, et al. Circulating MACC1 Transcripts in Colorectal Cancer Patient Plasma Predict Metastasis and Prognosis. *PLoS One*. 2012;7(11):e49249.
- 7- Stein U, Dahlmann M, Walther W. MACC1-more than metastasis? Facts and predictions about a novel gene. *J Mol Med (Berl)* 2010;88(1):11-8.
- 8- Zhang Y, Wang Z, Chen M, Peng L, Wang X, Ma Q, et al. MicroRNA-143 targets MACC1 to inhibit cell invasion and migration in colorectal cancer. *Mol Cancer* 2012;11:23.
- 9- Stein U, Smith J, Walther W, Arlt F. MACC1 controls Met: what a difference an Sp1 site makes. *Cell Cycle* 2009;8(15):2467-9.
- 10- Shirahata A, Shinmura K, Kitamura Y, Sakuraba K, Yokomizo K, Goto T, et al. MACC1 as a marker for advanced colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2010;30(7):2689-92.
- 11- Galimi F, Torti D, Sassi F, Isella C, Corà D, Gastaldi S, et al. Genetic and expression analysis of MET, MACC1, and HGF in metastatic colorectal cancer: response to met inhibition in patient xenografts and pathologic correlations. *Clin Cancer Res* 2011;17(10):3146-56.
- 12- Shirahata A, Sakata M, Kitamura Y, Sakuraba K, Yokomizo K, Goto T, et al. MACC 1 as a marker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma. *Anticancer Res* 2010;30(9):3441-4.
- 13- Chundong G, Uramoto H, Onitsuka T, Shimokawa H, Iwanami T, Nakagawa M, et al. Molecular diagnosis of MACC1 status in lung adenocarcinoma by immunohistochemical analysis. *Anticancer Res* 2011;31(4):1141-5.
- 14- Shimokawa H, Uramoto H, Onitsuka T, Chundong G, Hanagiri T, Oyama T, et al. Overexpression of MACC1 mRNA in lung adenocarcinoma is associated with postoperative recurrence. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;141(4):895-8.
- 15- Qiu J, Huang P, Liu Q, Hong J, Li B, Lu C, et al. Identification of MACC1 as a novel prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Journal of Translational Medicine* 2011;9:166.
- 16- Shirahata A, Fan W, Sakuraba K, Yokomizo K, Goto T, Mizukami H, et al. MACC 1 as a marker for vascular invasive hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2011;31(3):777-80.
- 17- Zhang R, Shi H, Chen Z, Wu Q, Ren F, Huang H. Effects of metastasis-associated in colon cancer 1 inhibition by small hairpin RNA on ovarian carcinoma OVCAR-3cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2011;30:83.
- 18- Wang G, Kang MX, Lu WJ, Chen Y, Zhang B, Wu YL. MACC1: A potential molecule associated with pancreatic cancer metastasis and chemoresistance. *Oncol Lett* 2012;4(4):783-791.
- 19- MACC1 Antisense RNA 1, <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MACC1-AS1&search=macc1> Accessed on 10 March 2014.
- 20- Mattick JS, Makunin IV. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet* 2005;14 Spec No 1:R121-32.
- 21- Redvers RP and Anderson RL. Long noncoding RNA agent provocateur in breast cancer metastasis. In: *Metastatic Cancer: integrated organ system and biological approach*. Jandial R and Hunter K (eds), Landes Biosciences, 2012;pp.1-20.
- 22- Delilhas N. Regulation of gene expression by trans-encoded antisense RNAs. *Mol Microbiol* 1995;15(3):411-4.
- 23- Arndt GM, Atkins D, Patrikakis M, Izant JG. Gene regulation by antisense RNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 1995;248(3):293-300.
- 24- Schmid F, Burock S, Klockmeier K, Schlag PM, Stein U. SNPs in the coding region of the metastasis-inducing gene MACC1 and clinical outcome in colorectal cancer. *Mol Cancer* 2012;11:49.
- 25- Lang AH, Geller-Rhomberg S, Winder T, Stark N, Gasser K, Hartmann B, et al. A common variant of the MACC1 gene is significantly associated with overall survival in colorectal cancer patients. *BMC Cancer* 2012;12:20.
- 26- Qu JH, Chang XJ, Lu YY, Bai WL, Chen Y, Zhou L, et al. Overexpression of metastasis-associated in colon cancer 1 predicts a poor outcome of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2012;18(23): 2995-3003.
- 27- Kokoszyńska K, Kryński J, Rychlewski L, Wyrwicz LS. Unexpected domain composition of MACC1 links MET signaling and apoptosis. *Acta Biochim Pol* 2009;56(2):317-23.
- 28- Arlt F, Stein U. Colon cancer metastasis: MACC1 and Met as metastatic pacemakers. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(12):2356-9.
- 29- Kwong LN, Dove WF. APC and its modifiers in colon cancer. *Adv Exp Med Biol* 2009;656:85-106.
- 30- Migliore C, Martin V, Leoni VP, Restivo A, Atzori L, Petrelli A, et al. MiR-1 downregulation cooperates with MACC1 in promoting MET overexpression in human colon cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18(3):737-47.

How to cite:

Taib JST, İğci M, Borazan E, Bayraktar E, Balık A, Çakmak EA, Arslan A. Investigation of MACC1-AS1 gene mutations in colorectal cancer. *Gaziantep Med J* 2014;20(2):174-181.