

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

MikroRNA-106a'nın Yüksek Ekspresyonu Kolorektal Kanserlerde Mikrosatellit İnstabilite Durumu ile İlişkilidir

Seçil AK AKSOY¹, Berrin TUNCA², Tuncay YILMAZLAR³, Ersin ÖZTÜRK⁴,
Fuat AKSOY³, Özgen IŞIK³, Ömer YERCI⁵, Nesrin UĞRAŞ⁵, Özkan KANAT⁶,
Melis MUTLU², Çağla TEKİN²

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi, İnegöl Meslek Yüksekokulu, İlk ve Acil Yardım Anabilim Dalı, Bursa.

² Bursa Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

³ Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Bursa.

⁴ Bursa Medicana Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Bursa.

⁵ Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Bursa.

⁶ Bursa Acıbadem Hastanesi, Tıbbi Onkoloji Kliniği, Bursa

ÖZET

Mikrosatellit instabilite (MSI), DNA tamir genlerindeki hatalardan kaynaklanan ve kolorektal kanserin (KRK) oluşmasına neden olan genetik bir durumdur. Sporadik KRK'larda MSI görülme sıklığı, prognoza olan etkisi literatürde çelişkilidir. Bununla birlikte MSI'ya sahip KRK'larda standart kemoterapi yetersiz kaldığı için yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır. miRNA'lar (miRNA) kanserleşme sürecinde görev alan ve tanı, prognozda ve tedavide belirteç olarak kullanılan küçük RNA molekülleridir. Mevcut çalışmada, Türk popülasyonuna ait sporadik gelişen KRK'larda MSI'nın görülme sıklığının tanımlanması ve bu tümörlerde miRNA'ların ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, sporadik KRK tanısı almış 63 hasta değerlendirildi. Hastalara ait arşiv tümör ve normal dokulardan DNA ve RNA izolasyonları yapıldı. DNA örneklerinden fragment analizine dayalı MSI testi gerçekleştirildi. qRT-PCR kullanılarak 38 farklı miRNA'nın ekspresyon profili incelendi. 63 hastada MSI görülme oranı %23.8 olarak belirlendi. MSI ve mikrosatellit stabil (MSS) tümörler karşılaştırıldığında, MSI tümörlerde, miR-124 ve miR-106a'nın yüksek ve miR-145'in ise düşük ekspresyon gösterdiği belirlendi ($p<0.05$). Bununla birlikte miR-106a'nın yüksek ekspresyonunun cerrahi sonrası nüks gelişimi ile ilişkili olduğu saptandı ($p=0.002$). Elde edilen bulgular ışığında miR-106a'nın özellikle MSI genotipine sahip KRK tümörlerde hedeflenmesi ile KRK hastalarında yeni tedavi protokollerinin oluşturularak nüks oluşumunun engellenebileceğini öngörmüştür.

Anahtar Kelimeler: Sporadik Kolorektal Kanser. Mikrosatellit İnstabilite. MikroRNA. miR-106a.

Upregulation of Microrna-106a is Associated with Microsatellite Instability Status in Colorectal Cancer

ABSTRACT

Microsatellite instability (MSI) is a genetic condition that results from errors in DNA repair genes and causes colorectal cancer (CRC). The incidence of MSI in sporadic CRCs and its effect on prognosis are contradictory in the literature. However, since standard chemotherapy is insufficient in CRCs with MSI, new treatment options are needed. miRNAs (miRNAs) are small RNA molecules that take part in the cancer process and are used as markers in diagnosis, prognosis and treatment. In the study, it is aimed to define the prevalence of MSI in sporadically developing CRCs belonging to the Turkish population and to determine the expression differences of miRNAs in these tumors. 63 patients diagnosed with sporadic CRC were evaluated in the study. DNA and RNA isolations were made from archive tumor and normal tissues of the patients. MSI test was performed based on fragment analysis from DNA samples. The expression profiles of 38 different miRNAs were examined using qRT-PCR. In 63 patients, the incidence of MSI was determined as 23.8%. When MSI and microsatellite stable (MSS) tumors were compared, it was determined that miR-124 and miR-106a showed high expression and miR-145 low expression in MSI tumors ($p<0.05$). However, high expression of miR-106a was found to be associated with postoperative recurrence ($p=0.002$). In the light of the findings obtained, we think that by targeting miR-106a especially in CRC tumors with MSI genotype, recurrence can be prevented by creating new treatment protocols in these tumors.

Key Words: Sporadic colorectal cancer. Microsatellite Instability. MicroRNA. miR-106a.

Geliş Tarihi: 29.Nisan.2021

Kabul Tarihi: 09.Temmuz.2021

Dr. Berrin TUNCA
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji AD
Tel.: 0224 295 41 61
E-posta: btunca@uludag.edu.tr

Yazarların ORCID ID Bilgisi:

Seçil AK AKSOY:0000-0002-3760-9755

Berrin TUNCA: 0000-0002-1619-6680

Tuncay YILMAZLAR: 0000-0003-1924-0795

Ersin ÖZTÜRK: 0000-0001-8593-5101

Fuat AKSOY: 0000-0001-5808-9384

Özgen IŞIK: 0000-0002-9541-5035

Ömer YERCI: 0000-0001-7118-5258

Nesrin UĞRAŞ: 0000-0003-0127-548X

Özkan KANAT: 0000-0001-6973-6540

Melis MUTLU: 0000-0002-6633-3428

Çağla TEKİN: 0000-0002-2568-3667

Kolorektal kanserler (KRK), kalınbağırsak boyunca oluşan agresif gastrointestinal sistem tümörleridir. KRK, Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) ve Dünyada genelinde en yaygın üçüncü kanser olup, yılda 690.000'den fazla ölümünün sebebini oluşturmaktadır¹. Sağlık Bakanlığı 2014 verilerine göre de KRK, Türkiye'de hem kadın hem de erkekler arasında en sık gözlenen üçüncü kanserdir².

KRK, bir dizi genomik ve epigenomik değişiklik ile karakterize olan heterojen bir hastalıktır. KRK'nın %75-80'inde germline mutasyonlardan bağımsız olarak sporadik formda tümör gelişirken %20-25'nin ailesinde KRK öyküsü bulunmaktadır³.

Sporadik KRK'lerin yaklaşık % 70'i kromozomal instabilite (Chromosomal Instability; CIN) yolu ile gelişmektedir. CIN yolu ile meydana gelen KRK'lar, anöploid karyotip, tümör baskılayıcı gen lokuslarında sık heterozigotluk kaybı (LOH) ve kromozomal yeniden düzenlemelerle sonuçlanan sayısal veya yapısal kromozomal anormalliklerin birikimi ile karakterize edilmektedir⁴. Ayrıca, CIN tümörleri, spesifik onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonların birikmesi ile ayırt edilmektedir [örn., APC, KRAS, fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz, katalitik alt birim alfa (PIK3CA), B-Raf proto-onkogen, serin / treonin kinaz (BRAF), SMAD4 ve TP53]^{5,6}. KRK oluşumunda diğer bir önemli yol, DNA yanlış eşleşme (MMR) genlerinin işlev bozukluğunun neden olduğu mikrosatellit instabilite (MSI) yoludur. MSI, toplumsal düzeyde farklılık gösterse de, sporadik KRK'ların yaklaşık %15'inde görülmektedir⁷.

Mikrostaellitler, bir ya da birden fazla bazın çeşitli tekrarları ile genomun belli bölgelerinde görülen kısa baz dizi tekrarlarıdır. DNA replikasyonuna bağlı hatalar sonucunda mikrosatellitler bölgelerinde delesyonlar veya insersiyonlar meydana gelmekte, bu durum MSI olarak isimlendirilmektedir^{8,9}. MSI oluşumunda DNA tamirinde görev alan MMR genlerindeki kayıpların etkili olduğu bilinmektedir. Bu mekanizma, MMR genlerinde meydana gelen metilasyonlar ya da bu genlerin somatik mutasyonlar sonucu inaktivasyonları ile meydana gelmektedir. *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ve *PMS2* adlı MMR genlerindeki germ-line mutasyonların varlığı nedeniyle oluşan MSI, Lynch Sendromu ile ilişkilendirilirken, *MLH1* geni promotör bölge metilasyonları sonucunda meydana gelen MSI durumu büyük çoğunlukla sporadik KRK oluşumuna neden olmaktadır¹⁰. MSI, sporadik olarak meydana gelen KRK'ların yaklaşık %15'inden sorumludur. MSI genotipine sahip KRK'ların prognozları ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır¹¹. Bir meta-analiz, yüksek frekanslı MSI (MSI-H) KRK'ların, tümör evresinden bağımsız olarak daha iyi bir prognoza sahip olduğunu ileri sürmektedir. MSI tümörleri olan hastalar, gelecekteki tedavinin başarısızlığına karşılık immünoterapi yapıldığında anti-PD-1 inhibitörlerine iyi yanıt oluş-

turmaktadır. Başka bir meta-analiz, MSI durumunun 5-FU tabanlı kemoterapinin metastatik KRK üzerindeki etkisini tahmin etmede yetersiz kaldığını ortaya koymaktadır. Evre II ve evre III KRK hastaları arasındaki MSI durumunun farklı etkisi ve evre II KRK MSI hastalarında 5-FU tedavisinin potansiyel zararı gibi bekleyen sorular hala mevcut olup büyük ölçüde cevapsız kalmaktadır^{12,13}. Evre II KRK hastalığının bu tartışmalı alanında uygulanması kolay ve nispeten ekonomik bir biyobelirtecin prognostik ve prediktif geçerliliğine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle MSI durumunun prognoz üzerine etkilerinin araştırılacağı kapsamlı çalışmaların planlanması gerekmektedir. Bu nedenle MSI durumunun prognoz üzerine etkilerinin araştırılması ile ilgili kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

MSI varlığı immünohistokimyasal yöntemler ile MMR proteinlerinin analiz edilmesi ile değerlendirilmekte ya da altın standart olarak kabul edilen DNA dizi analizi temelli fragment analizleri ile direkt olarak MSI bölgelerindeki tekrar sayılarının incelenmesi ile değerlendirilebilmektedir¹⁴. MSI bölgelerinin değerlendirilmesinde 1997 yılında oluşturulan Bethesda kriterleri kullanılmaktadır. Günümüzde onlarca mikrosatellit bölgesi belirteç olarak tanımlanmış olsa da D5S346, D2S123, D17S250, BAT25 ve BAT26 en sık takip edilen belirteçlerdir¹⁵.

İnsan genom projesi ile DNA baz dizilimi ortaya çıkartılarak, genomun sadece %2-3'lük kısmının mRNA'ya çevrildiği, %10-18'lik kısımdan protein sentezine yardımcı RNA'ların transkribe edildiği belirlenmiş olup genomun geriye kalan yaklaşık %80-87'lik kısmı ise çöp DNA olarak adlandırılmıştır¹⁶. Çöp olarak adlandırılan bu bölge üzerine yapılan çalışmalarda, protein kodlamayan ancak transkripsiyon sonrası gen düzenlenmesinde görev alan RNA'lar keşfedilmiştir¹⁷. Güncel araştırmalarda kodlama yapmayan küçük RNA'ların (microRNA:miRNA), KRK başta olmak üzere birçok kanserin oluşumunda ve gelişiminde görev aldıkları belirlenmiştir. miRNA'ların hedeflerini transkripsiyon sonrası baskılayarak veya teşvik ederek bir çok tümör hücresinin fizyolojik ve patolojik süreçlerinde anahtar rol oynadıkları kanıtlanmıştır. miRNA'ların anormal ekspresyonları birçok onkogenik ve tümör baskılayıcı genin regülasyonunda görev aldıkları için tümör baskılayıcı veya onkogenik özellik göstermektedirler. Günümüzde devam eden çalışmalarla, KRK'da hücre proliferasyonunu, hücre döngüsünü, metastaz sürecini ve apoptozu yöneten miRNA'lar tanımlanmaktadır^{18,19}.

Sporadik KRK'larda MSI durumu popülasyonlar arasında farklılık göstermektedir. Bununla birlikte sporadik KRK'larda miRNA'lar ve MSI ile yapılmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Mevcut çalışmada Türk popülasyonuna ait sporadik KRK tümörlerinde MSI frekansını belirleyerek bu genotipe sahip tümörlerdeki miRNA değişimlerini ve prognoza olan etkilerinin saptanması amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem

Hasta Seçimi

Çalışmada, sporadik KRK tanısı almış 63 hasta değerlendirildi. Neoadjuvan tedavi alan, üç yıldan az takip süresine sahip, primer KRK olmayan veya ailesinde kanser öyküsü bulunan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Çalışmaya ait etik kurul Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi klinik araştırmalar etik kurulu tarafından onay (2011-2/7) alındı.

DNA İzolasyonu

Tümör ve normal olarak işaretlenen parafilm gömülmüş doku örneklerinden işaretli alanlar 15 numara bistöri ucu ile kesildi ve üzeri etiketli 1.5 ml ependorf içerisine aktarıldı.

Kesilen dokuların her biri 1ml Ksilen (Sigma Aldrich, ABD) ve 1 ml Ethennol %99 HPLC Grage (Sigma Aldrich, ABD) ile muamele edildi. High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, İsviçre) kiti kullanılarak genomik DNA elde edildi. DNA kalitesi ve miktarı UV-Vİs Spektrofotometre/Nano Drop (Beckman Coulter, ABD) cihazında 280/260 nm dalga boyundaki optik dansitelerine ve konsantrasyonlarına bakılarak ölçüldü.

DNA Fragment Analizi

MSI analizi floresan işaretlemeye dayanan bir yöntemdir. Bu analiz, Bethesda kriterlerine uygun olarak seçilen, 5'ucu floresan işaretli D2S123, D5S346, D17S250, BAT25 ve BAT26 primerleri ile kapiller elektroforez sisteminde (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, ABD) fragment yöntemi ile gerçekleştirildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Kalitesi ve miktarı ölçülen DNA'ların her birinden 100 ng olacak şekilde ara stok hazırlandı. Multi HS Prime Premix (GeNET Bio, Kore) kit içeriğinde yer alan Multi HS Prime Taq Premix (2X)'ten 10 µl, dH₂O'dan 4.5 µl, her bir primer çiftinin her birinden

1µM olacak şekilde toplamda 2.5 µl eklenerek PCR karışımı oluşturularak primerlerin bağlanma ısısına göre uygun programlarda PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi.

PCR örnekleri ve MSI analiz karışımı 96-kuyulu plakalara hazırlandı. Reaksiyon karışımı, 22 adet (60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550 ve 600 baz) DNA fragmenti içeren 600'lük Size Standart'tan 40 µl PCR ürünlerinden ise 1.5 µl ilave edilerek oluşturuldu ve cihaza yükleme yapıldı.

MSI analizi MSI belirteçlerinin fragman yükseltilerinin, her hastanın tümör ve normal dokusunda karşılaştırılması ile gerçekleştirildi. Bu karşılaştırma sonucunda herhangi bir belirteçte tümör ve normal DNA arasında bir farklılık belirlenmezse hasta mikrosatellit stabil (MSS), bir belirteçte farklılık belirlenirse MSI-low (MSI-L), iki ve daha fazla belirteçte farklılık belirlenirse MSI-high (MSI-H) olarak tanımlanmaktadır.

miRNA Ekspresyon Analizi

Normal ve tümör doku olarak tanımlanmış hastaya ait parafin blok için ependorf tüpler oluşturuldu ve parafin bloklardan 0.2-0.4 cm kesilerek bu ependorflar içerisine alındı. Materyaller, BIOstic (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA) ile 2 kez muamele edilerek parafinden arındırıldı. BIOstic ile doku üzerindeki parafin çözdürüldükten sonra materyaller, %100-%70 ve %40'luk alkol aşamalarından geçirildi ve alkol oda ısısında uçuruldu. Bu aşamalardan sonra 63 hastaya ait tümör doku ve 8 hastaya ait normal dokudan, parafin bloktan RNA izolasyonuna uygun ticari kit (Qiagen RNeasy FFPE kit) kullanılarak prosedüre uygun şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen total RNA'nın 5 ng'ından RT2 miRNA First Stand Kit MA03 (QIAGEN, Germantown, Maryland, USA) kullanılarak komplementer DNA (cDNA) elde edildi. Çalışmada, KRK gelişiminde diagnostik ve prognostik öneme sahip, aynı zamanda ilaç direnci üzerine etkisi belirlenen miRNA'ların değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda değerlendirilen miRNA'lar bu amaç doğrultusunda yapılan literatür araştırması sonu-

Tablo I. Custom array ile çalışılan 38 farklı miRNA ve KRK ile ilişkili hedef genleri

miRNA	Hedef genleri*	miRNA	Hedef genleri	miRNA	Hedef genleri*
hsa-miR-21	KRAS, AKT, MAPK	hsa-miR-16	RET, NF1	hsa-miR-137	ABCD2, CTNB1
hsa-miR-143	NRAS, STAT	hsa-miR-181b	IL1A, PAM2	hsa-miR-221	KRAS
hsa-miR-145	MAPK1, NF1A, MAPK14	hsa-miR-200c	PMS1, IL2	hsa-miR-223	BRAF, TGFB
hsa-miR-19a	PIK3CA, SOX2	hsa-miR-139-3p	AKT, NF1	hsa-miR-148a	ERK, RAF
hsa-let-7a	KRAS, MAPK	hsa-miR-26a	CTNNB1, CD4	hsa-miR-200a	JNK, Axin
hsa-let-7c	KRAS, MYC	hsa-miR-27a	Twist, CHD2	hsa-miR-15b	LGR5, PIK3
hsa-miR-17	MAP3K8, MYC, MLH1	hsa-miR-30a	DDL-1, P53	hsa-miR-15a	MEK, BCL2
hsa-miR-155	VHL, SOX4	hsa-miR-34a	RET, NF1	hsa-miR-15b	SMAD4, BAD
hsa-miR-29b	KRAS, LGR5	hsa-miR-96	ALK, BICRAL	hsa-miR-20a	MEK, SOS
hsa-miR-106a	RB1, CTNNB1	hsa-miR-133b	P53, PMS2	hsa-miR-99a	TP1, BAK
hsa-miR-139-5p	ZEB1, HRAS	hsa-miR-135b	FOXO1, CD47	hsa-miR-478	CD133
hsa-miR-191	PTEN, PIK3CA	hsa-miR-124	SMAD4	hsa-miR-320	MAP3K1, PTEN
hsa-miR-181	MTOR, SMAD4	hsa-miR-155	ERBB2, SMAD2		

*miRBAase, KEGG

cu belirlendi. Seçilen 38 farklı miRNA'nın tümör dokularındaki ekspresyon durumları, kromozomal lokalizasyonları ve hedef genleri ile ilgili bilgiler Tablo I'de verildi. Çalışmamızda kullanılmak üzere belirlendiğimiz miRNA'lar için dizayn ettirilmiş olan 384 kuyucuklu PCR arrayler düzenlendi. PCR arrayler içerisinde, her bir örnek için 3 adet PCR array kontrolü (miRTC, PPC, U6), 3 adet housekeeping gen (SNORD44, SNORD47, SNORD48) ve 42 miRNA (38 farklı, 4 tanesi 2 tekrar olacak şekilde) yer verildi.

İstatistiksel Analiz

Hastalara ait klinik ve patolojik özelliklerin nüks olan etkileri Bağımsız T, Ki-kare ve Tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) kullanılarak belirlendi. miRNA'ların ekspresyon düzeyleri web-tabanlı "RT2 Profiler PCR Array Data Analysis v3.5" programından yararlanılarak değerlendirildi. Tanı anından nüks kadar geçen süre hastalısız sağ kalım (Disease free survival- DFS) olarak tanımlandı ve değerlendirilen tüm parametrelerin DFS'ye olan etkileri Kaplan Meier Analizi ile belirlendi. Tüm istatistiksel analizlerde SPSS (20.0) ve Graphpad Prism 16.0 programlarından yararlanıldı. Parametrelerin DFS'ye olan etkilerinin değerlendirildiği Kaplan Meier analizi MedCalc 16.0 programı ile gerçekleştirildi. Tüm istatistik analizlerinde p değerinin 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

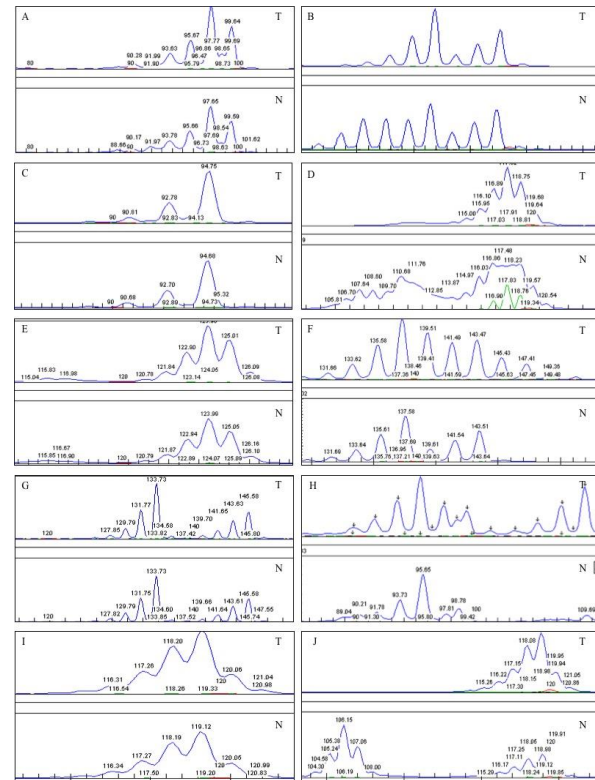
Bulgular

Çalışmada değerlendirilen 63 hastanın 35'i (%55.6) erkek, 28'i (%44.4) kadındı. Ortalama yaş 52.2 (42-64) olarak belirlendi. Evre I ve evre II hastalarına sadece cerrahi rezeksiyon uygulanırken, evre III ve evre IV hastalarının uygun görülenerine 5 Fluorourasil bazlı adjuvan kemoterapi (KT) ve gerekli görülür rektum tümörlerine ise ilave olarak radyoterapi (RT) uygulandı. RT alan hasta sayısı sınırlı olduğunda bu parametre çalışma dışı bırakıldı. Değerlendirilen hastaların %65'inin (n=26) KT aldığı tespit edildi. Hastaların ortalama takip süresi 56 ay olup takip süresinde 11 (%17.4) hastada sistemik veya lokal nüks gelişimi belirlendi. Hastalara ait klinik ve patolojik özellikler Tablo II'de verildi. KT tedavisi gören 26 hastanın ise 5'inde (%19.2) nüks gelişimi gözlemlendi. Nüks gelişimi gözlenen 5 hastanın 1 (%20)'inde MSI pozitifliği belirlendi.

D2S123, D17S250, D5S346, BAT25 ve BAT26 belirteçleri kullanılarak gerçekleştirilen MSI analizlerinde; 63 KKRK tümörünün 48'si (%76.2) MSS, 15'i ise (%23.8) MSI olarak tanımlandı. MSI tümörlerin %60'ı (n=9) MSI-L, %40'ı (n=8) ise MSI-H olarak belirlendi (Şekil 1). KT tedavisi sonrası nüks ile MSI durumu arasında herhangi bir anlamlılık belirlenmedi (p>0.05).

Tablo II. Hastaların klinik ve patolojik özellikleri

Özellikler	Sayı (%)
Cinsiyet	
Kadın	28 (%44.4)
Erkek	35 (%55.6)
Yaş	52.2 (42-64)
Tümör Lokalizasyonu	
Sağ Kolon	23 (%36.5)
Sol Kolon	28 (%44.4)
Rektum	12 (%19.1)
Tümör Evresi	
Evre I	5 (%7.9)
Evre II	18 (%28.6)
Evre III	21 (%33.3)
Evre IV	19 (%30.2)
Nüks	
Var	11 (%17.4)
Yok	52 (82.6)



Şekil 1.

MSI belirteçleri. (A) D2S123 normal, (B) D2S123 pozitif, (C) D17S250 normal, (D) D17S250 pozitif, (E) D5S346 normal, (F) D5S346 pozitif, (G) BAT25 normal, (H) BAT25 pozitif, (I) BAT26 normal, (J) BAT26 pozitif.

63 tümör doku 15 normal doku ile karşılaştırıldığında, 38 farklı miRNA arasında miR-143'ün, miR-145'in düşük ekspresyonları, ile miR-155'in, miR-106a ve miR-124'ün yüksek ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı belirlendi (Tablo III).

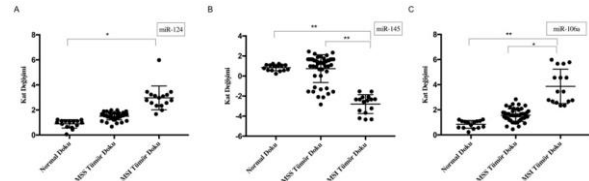
Mikrosatellit İnstabilite Tümörlerde mikroRNA'lar

Tablo III. Normal dokuya göre tümör dokuda ekspresyon farklılığı belirlenen miRNA'lar.

MiRNA	2'Delta CT	2' Delta CT	Kat Değişimi	P Değeri
miR-143	0.2349	0.0364	-3.245	0.001
miR-145	0.3848	0.1374	-2.938	0.023
miR-155	0.8374	2.9283	2.094	0.036
miR-106a	0.7348	2.3948	3.0293	0.001
miR-124	0.9384	1.9484	2.3449	0.042

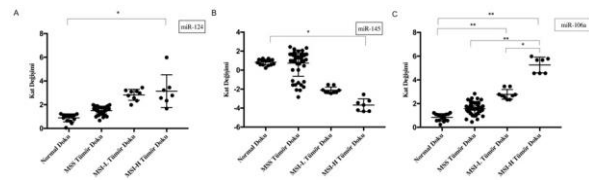
Tümörlerdeki MSI durumu ile miRNA ekspresyon seviyeleri birlikte değerlendirildiğinde, normal dokuya göre tümör dokuda anlamlı seviyede farklı ekspresyon gösteren 5 miRNA arasından miR-124, miR-106a ve miR-145 MSS tümörleri ile karşılaştırıldığında MSI tümörlerinde istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon farklılıkları gösterdi (Şekil 2). Bununla birlikte miR-106a ekspresyonu MSI-H tümörlerde MSS tümörlerine göre 3.1, MSI-L tümörlere göre ise 2 kat artış gösterdi (Şekil 3; $p=0.0001$, $p=0.034$, sırasıyla).

MSI durumu ve miRNA ekspresyon değişimleri nüks gelişimi açısından değerlendirildiğinde, MSI durumu ile nüks gelişimi arasında bir ilişki saptanmazken yüksek miR-106a ekspresyonu kısa hastaliksız yaşam süresi arasında anlamlı istatistiksel ilişki olduğu belirlendi (Şekil 4, $p=0.002$).



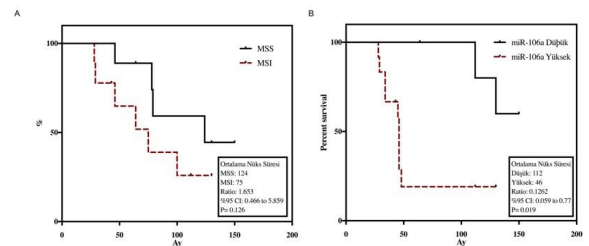
Şekil 2.

Normal doku ile karşılaştırıldığında MSS ve MSI tümör dokularında (A) miR-124, (B) miR-145, (C) miR-106a'nın ekspresyon değişimleri.



Şekil 3.

MSI-L ve MSI-H tümörlerinde (A) miR-124, (B) miR-145, (C) miR-106a'nın ekspresyon değişimleri.



Şekil 4.

Kaplan Meier analizi. (A) MSI durumunun hastaliksız sağ kalım ile, (B) miR-106a ekspresyonunun hastaliksız sağ kalım ile ilişkisi.

Tartışma ve Sonuç

Mikrosatellitler, insan genomu boyunca dağılmış tekrarlayan DNA dizileridir⁸. Yapılan çalışmalar, MSI tümörü olan erken evre KRK hastalarının genellikle daha iyi bir prognoza sahip olduğu ve 5FU bazlı kemoterapiye daha az yanıt verdiklerini göstermektedir¹⁰. Ancak son yapılan meta-analiz çalışmalarında bu konuda çelişkiler bulunmaktadır^{12,13}. Bunun temel sebepleri arasında MSI durumunun popülasyonlar arasında farklılık göstermesinin olabileceği düşünülmektedir. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda Türk popülasyonuna ait sporadik KRK hastalarında MSI frekansı net olarak ortaya konulamamıştır. Mevcut çalışmamız sonucunda sporadik KRK'larda MSI frekansı %23.8 olarak belirlendi. MSI durumu ile KT sonrası nüks gelişimi değerlendirdiğinde istatistiki bir anlamlılık gözlenmedi. Çalışmada değerlendirilen hastalarda kısıtlı KT tedavisi bulunduğu için 5FU-tabanlı KT ve MSI durumu ile ilgili daha kapsamlı çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte, MSI durumu ve kısa hastaliksız sağ kalım süresi arasında da anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Çalışmamızda ikinci aşamada MSS tümörler ile MSI tümörler arasında farklı ekspresyona sahip miRNA'ların belirlenmesi amaçlandı. Bu kapsamda KRK gelişiminde rol oynayan 38 farklı miRNA ekspresyonu incelendi. İlk olarak miRNA ekspresyonları normal doku ile karşılaştırılarak tümör dokuda incelendi. 38 farklı miRNA arasında miR-143'ün, miR-145'in düşük ekspresyonları, ile miR-155'in, miR-106a ve miR-124'ün yüksek ekspresyonları tümör dokuda istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

miR-143 ve miR-145'in düşük ekspresyonları birçok kanserde kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir²⁰. Brinza ve ark. 82 KRK tanılı hastada gerçekleştirdikleri çalışma ile miR-143 ve miR-145'in birbirlerinden bağımsız olarak uzak metastaz ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir²⁰. Bai ve ark., in-vitro ortamda KRK hücrelerinde miR-143'ün ekspresyonu artırıldığında, ERBB3'nin inhibe edilerek hücrelerin invazyon ve metastaz kabiliyetlerinin baskılandığını göstermiştir²¹. Bununla birlikte birbirinden bağımsız gerçekleştirilen çalışmalarda miR-143 ve miR-145 KRK gelişimi ile ilişkili bulunmamıştır^{21,22}. Literatürde, bu çelişkili sonuçların nedeni farklı örneklem büyüklükleri ve etnik grup farklılıkları ile açıklanmıştır²³. Bizim gerçekleştirdiğimiz mevcut çalışmada miR-143 ve miR-145 normal doku ile karşılaştırıldığında tümör dokuda istatistiksel olarak anlamlı düşüş göstermiş ancak uzak metastaza katkıları belirlenmemiştir. Bununla birlikte mevcut çalışmamızda miR-145 MSI tümörlerde MSS tümörlere göre daha düşük ekspresyon göstermiştir. Ancak literatürde miR-145'in MSI durumu ile ilişkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

miR-155'in anormal ekspresyonu daha önce KRK'lar-
da belirlenmiştir²⁴. Ancak bazı çalışmalarda miR-
155'in tümör baskılayıcı özellikte, bazı çalışmalarda
ise onkogenik özellikte olduğu belirtilmektedir^{24,25}.
Mevcut çalışmamızda ise miR-155 normal dokuya
göre tümör dokuda yüksek eksprese bulunmuş, bu
nedenle bu miRNA'nın Türk popülasyonuna ait KRK
tümörlerinde onkogenik özellikte olduğu gösterilmiştir.
Fakat bulgularımız miR-155'in yüksek ekspresyonu-
nun uzak metastaz veya MSI durumu ile ilişkisini
tanımlamamaktadır. Literatürde ise farklı popülasyon-
larda yapılan iki çalışmada miR-155'in ekspresyonu,
MSI-H tümörlerde MSS tümörler ile karşılaştırıldı-
ğında, istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bu-
lunmuştur. Ancak miR-155'inde dahil olduğu miRNA
ekspresyon profillerinin değerlendirildiği farklı çalış-
malarda bu miRNA MSI durumu ile ilişkilendirilme-
miştir^{26,27}. Bu farklılıkların nedeni etnik kökene ve
çalışmaların bir kısmı IHC bir kısmı ise fragmant
analizi ile gerçekleştirildiğinden, metod farklılığına
dayandırılmıştır. Mevcut bulgular miR-155'in KRK
tümörlerinde onkogenik özellikte olduğunu göster-
mektedir.

miR-124, kanser gelişiminde belirlenen ve hedeflenen
miRNA'lar arasında yer almaktadır²⁹. Bu miRNA'nın
düzensiz ekspresyonu, Notch sinyalinde, nöron farklı-
laşması ve aktivasyonunda yer alan diğer genleri he-
defleyerek nöronal gelişimi ve nöral plastisiteyi dü-
zenlediği sinir sistemini etkilemektedir³⁰. miR-124,
medulloblastom ve servikal kanserde düşük ekspres-
yon gösterirken KRK'larda ekspresyon durumu net
bilinmemektedir.

miR-106a, farklı kanserlerde farklı ekspresyon profili
gösterirken KRK'larda onkogenik özelliğe sahiptir^{31,32}.
Çalışma ekibimiz tarafından önceki yıllarda gerçekleştirdiğimiz
araştırmamızda, erken evre KRK'larda miR-106a'nın KRK gelişimi ve kısa sağ kalım ile
ilişkili olduğu bulundu. Mevcut çalışmamızda da miR-
106a normal doku ile karşılaştırıldığında tümör doku-
larda yüksek ekspresyon gösterirken, bu miRNA'nın
yüksek ekspresyonunun nüks ile de ilişki olduğu belir-
lenmiştir. Çalışmamızla benzer olarak Liu H ve ark.
Yaptıkları çalışmada miR-106'nın KRK'larda nüks
gelişimine katkı sağladığını hasta-tabanlı ve in-vitro
çalışmalar ile göstermiştir³³. Mevcut çalışmamızda
miR-106a ekspresyonunun MSI-H tümörlerde, MSS
ve MSI-L tümörlere göre istatistiksel olarak anlamlı
arttığı şekilde belirlendi. Literatürde MSI durumunda
miR-106a ekspresyonunda anlamlı değişim saptayan
bir çalışma bulunmamaktadır.

Sporadik KRK'larda MSI frekansı toplumlar arasında
farklılık göstermektedir. Türkiye'de bu oran ise bilin-
memektedir. Bununla birlikte, MSI ve MSS durumları-
nda miRNA'ların ekspresyon değişimleri de etnik
köken ve coğrafyaya göre değişiklik gösterdiği için
literatürde çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Gerçek-
leştirdiğimiz çalışmada sporadik KRK'larda MSI

frekansı %23.8 olarak belirlenirken, miR-106a'nın
MSI-H tümörlerde yüksek eksprese olduğu ve bu
durumun nüks oluşumuna katkı sağladığı belirlendi.

Çalışmamız sınırlı sayıda hastadan oluşan retrospektif
bir çalışma olmasına rağmen Türk popülasyonunda
sporadik oluşan KRK tümörlerinde MSI görülme
sıklığının ve MSI durumunda miRNA değişimlerinin
belirlendiği ilk çalışmadır. Bununla birlikte miR-
106a'nın MSI-H tümörlerde prognostik önemini gös-
teren ve bu tümörlerde miR-106a'nın teröpatik bir
hedef olabileceği kullanılabileceğine dair katkı sağla-
yan ilk çalışmadır.

Günümüzde MSI tümörlerinin görülme sıklığı, prog-
noza etkisi ve bu tümörlerde uygulanması gereken
tedavi protokolleri net olarak ortaya konmamıştır. Son
çalışmalarda MSI ve özellikle MSI-H tümörlerde
immünoterapinin kullanılabilişliğini göstermektedir.
Pembrolizumab MSI tümörlerde kullanılan en yaygın
immünoterapi ilacıdır ancak bu ilaca karşı henüz yük-
sek başarı oranları gözlenememektedir. Özellikle MSI
tümörlerde 5FU tabanlı standart tedaviye de başarı
oranı düşük olduğu için bu tümörlerde yeni teröpatik
hedeflerin tanımlanmasına ve hedeflenmesine ihtiyaç
duyulmaktadır. Çalışmamızda Türk popülasyonuna ait
sporadik KRK'larda MSI görülme sıklığı belirlenmiş
olup bu tümörlerde teröpatik hedef olabilecek miR-
NA'lar araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda miR-
106a'nın MSI ve özellikle MSI-H tümörlerde yüksek
eksprese olduğu, bu miRNA'nın yüksek ekspresyonu-
nun nüks ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. İleri analiz-
ler gerekmele birlikte çalışmamızda miR-106a'nın
özellikle MSI genotipine sahip KRK tümörlerinde
hedefe yönelik tedavide kullanılabilecek teröpatik bir
hedef olabileceği belirlenmiştir. miR-106a'nın hedef-
lenmesi ile MSI alt grubuna sahip KRK'larda yeni ve
yüksek başarı oranına sahip tedavi protokollerinin
oluşturulabilmesine imkan sağlayabileceği öngörü-
lmektedir.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Onaylayan Kurul: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik

Araştırmalar Etik Kurulu

Onay Tarihi: 17.01.2012

Karar No: 2012-02/20

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikri Tasarım: B.T., E.O., T.Y., Ö.Y., Ö.K.; Veri Toplama ve
İşleme: S.A.A., F.A., O.I., N.U.; Analiz ve verilerin değer-
lendirilmesi: M.M., Ç.T., S.A.A., F.A., B.T.; Makalenin önemli
bölümlerinin yazılması: S.A.A., B.T., F.A., E.O.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Bu makalede yer alan çalışmalar KUAP(T)-2014/35 nolu proje
kapsamında Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler
Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Siegel R., Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, Jemal A (2017) Colorectal cancer statistics, CA A Cancer J Clin. 67; 177–193.
2. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer Statistics, (2017). CA Cancer J. Clin. 67,7–30.
3. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, Starling N. Colorectal cancer. Lancet 2010; 375: 1030–1047.
4. Marisa L, de Reynies A, Duval A, et al. Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. PLoS Med 2013;10:e1001453.
5. Fearon ER and Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990;61:759-767.
6. Becht E, de Reynies A, Giraldo NA, et al. Immune and stromal classification of colorectal cancer is associated with molecular subtypes and relevant for precision immunotherapy. Clin Cancer Res. 2016;22:4057-4066.
7. De la Chapelle A (2003) Microsatellite instability. The New England journal of medicine 349: 209–210.
8. Baudrin LG, Deleuze JF, How-Kit A. Molecular and computational methods for the detection of microsatellite instability in cancer. Front. Oncol. 2018;8:621.
9. Carr PR, Alwers E, Bienert S, Weberpals J, Kloor M, Brenner H, Hoffmeister M. Lifestyle factors and risk of sporadic colorectal cancer by microsatellite instability status: a systematic review and meta-analyses. Ann. Oncol. 2018;4:825–834.
10. Lu Y, Soong TD, Elemento O. A novel approach for characterizing microsatellite instability in cancer cells. PLoS One 2013;8(5):e63056.
11. Zaanani A, Taieb J. Predictive and prognostic value of MSI phenotype in adjuvant colon cancer: Who and how to treat? Bull Cancer. 2019;106(2):129-136.
12. Huang Z, Chen X, Liu C, Cui L. The Clinical Significance of Microsatellite Instability in Precision Treatment. Methods Mol Biol. 2020;2204:33-38.
13. Saridakis Z, Souglakos J, Georgoulas V. Prognostic and predictive significance of MSI in stages II/III colon cancer. World J Gastroenterol. 2014 Jun 14;20(22):6809-14.
14. Sakimoto T, Chika N, Suzuki O, Ishibashi K, Tachikawa T, Akagi K, Eguchi H, Okazaki Y, Ishida H. Evaluation of BRAF V600E Mutations in High-Level Microsatellite Instability (MSI-H) Colon Cancer - Comparison Between Genetic Testing and Immunohistochemical Staining. Gan To Kagaku Ryoho. 2016 Nov;43(12):1693-1695.
15. Siskova A, Cervena K, Kral J, Hucl T, Vodicka P, Vymetalkova. Colorectal Adenomas-Genetics and Searching for New Molecular Screening Biomarkers. Int J Mol Sci. 2020 May 5;21(9):3260.
16. Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, Tuschl T. MicroRNAs in human cancer. Adv. Exp. Med. Biol. 2013;774:1–20.
17. Hussien BM, Hidayat HJ, Salihi A, Sabir DK, Taheri M, Ghafouri-Fard S. MicroRNA: A signature for cancer progression. Biomed Pharmacother. 2021 Mar 23;138:111528.
18. Pan G, Liu Y, Shang L, Zhou F, Yang S. EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance. EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance. Cancer Commun (Lond). 2021 Mar;41(3):199-217.
19. Ak S, Tunca B, Tezcan G, Cecener G, Egeli U, Yilmazlar T, Ozturk E, Yerci O. MicroRNA expression patterns of tumors in early-onset colorectal cancer patients. J Surg Res. 2014 Sep;191(1):113-22.
20. Brînzan C, Aşchie M, Cozaru G, Dumitru E, Mitroi A. The diagnostic value of miR-92a, -143, and -145 expression levels in patients with colorectal adenocarcinoma from Romania. Medicine (Baltimore). 2020 Aug 28;99(35):e21895.
21. Bai JW, Xue HZ, Zhang C. Down-regulation of microRNA-143 is associated with colorectal cancer progression. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2016; 20 (22): 4682-4687.
22. Jay C, Nemunaitis J, Chen P, et al. miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer. DNA Cell Biol. 2007; 26: 293–300.
23. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. Cell Res 2008; 18: 997–1006.
24. Liu J, Chen Z, Xiang J, and Gu X. DNA methylation mediated silencing of microRNA-145 is a potential prognostic marker in patients with lung adenocarcinoma. Sci Rep. 2015;5:16901.
25. Orosz E, Kiss I, Gyöngyi Z, Varjas T. Expression of Circulating miR-155, miR-21, miR-221, miR-30a, miR-34a and miR-29a: Comparison of Colonic and Rectal Cancer. In Vivo. 2018 Nov-Dec;32(6):1333-1337.
26. Yamamoto H, Adachi Y, Taniguchi H, Kunimoto H, Noshio K, Suzuki H, Shinomura Y. Interrelationship between microsatellite instability and microRNA in gastrointestinal cancer. World J Gastroenterol. 2012 Jun 14;18(22):2745-55.
27. Valeri N, Gasparini P, Fabbri M, Braconi C, Veronese A, Lovat F, Adair B, Vannini I, Fanini F, Bottoni A, Costinean S, Sandhu SK, Nuovo GJ, Alder H, Gafa R, Calore F, Ferracin M, Lanza G, Volinia S, Negrini M, McIlhatton MA, Amadori D, Fishel R, Croce CM. Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Apr 13;107(15):6982-7.
28. Yamamoto H, Imai K. Microsatellite instability: an update. Arch Toxicol. 2015 Jun;89(6):899-921.
29. Qin Z, Liu X. miR-124, a potential therapeutic target in colorectal cancer. Onco Targets Ther. 2019 Jan 22;12:749-751.
30. Silber J, Hashizume R, Felix T, Hariono S, Yu M, Berger MS, Huse JT, VandenBerg SR, James CD, Hodgson JG, Gupta N. Expression of miR-124 inhibits growth of medulloblastoma cells. Neuro Oncol. 2013 Jan;15(1):83-90.
31. Ruan F, Wang YF, Chai Y. Diagnostic Values of miR-21, miR-124, and M-CSF in Patients With Early Cervical Cancer. Technol Cancer Res Treat.
32. Silva CMS, Barros-Filho MC, Wong DVT, Mello JBH, Nobre LMS, Wanderley CWS, Lucetti LT, Muniz HA, Paiva IKD, Kuasne H, Ferreira DPP, Cunha MPSS, Hirth CG, Silva PGB, Sant'Ana RO, Souza MHL, Quetz JS, Rogatto SR, Lima-Junior RCP. Circulating let-7e-5p, miR-106a-5p, miR-28-3p, and miR-542-5p as a Promising microRNA Signature for the Detection of Colorectal Cancer. Cancers (Basel). 2021 Mar 24;13(7):1493.
33. Liu Z, Qin Y, Dong S, Chen X, Huo Z, Zhen Z. Overexpression of miR-106a enhances oxaliplatin sensitivity of colorectal-cancer through regulation of FOXQ1.

