DOI: 10.4274/jarem.galenos.2021.54264
J Acad Res Med 2021;11(1):86-89

Adenokarsinom Akciğer Kanserlerinde *SMAD4* Gen Metilasyonu Etkili Olabilir

SMAD4 Gene Methylation May Be Effective in Adenocarcinoma Lung Cancers

Metin Budak

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye
Trakya Üniversitesi, Moleküler Araştırma Laboratuvarı, Prof. Mirko Tos Kulak ve İşitme Araştırma Merkezi, Edirne, Türkiye

Cite this article as: Budak M. *SMAD4* Gene Methylation May Be Effective in Adenocarcinoma Lung Cancers. J Acad Res Med 2021;11(1):86-89

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada adenom tipi akciğer kanser olgularında *small mothers against decapentaplegic 4 (SMAD4)* geninin promotör bölge metilasyonunun etkisini araştırmayı amaçladık. Adenokarsinom ve skuamöz tip karsinomlar akciğer kanserlerinin en sık rastlanan türleridir. *SMAD4* geni hücre içi bir sinyal proteinidir. Transkripsiyon faktörlerinden olan bu genin proteini, embriyonik gelişim esnasında doku homeostasisinde görev yapar ve kanserleşme sürecinde etkileri bulunmaktadır.

Yöntemler: Bu retrospektif çalışmaya adenokarsinom akciğer kanserli 20 hastanın parafine gömülmüş tümör dokusu ve aynı hastaların normal akciğer dokusu olmak üzere toplam 40 örnek dahil edilmiştir. Parafine gömülü bu adenokarsinomlu akciğer tümör doku ve aynı dokunun normal eşlerinden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, bisülfit modifikasyon sonrası SMAD4 promotör metilasyonunu araştırmak için metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu ve ardından agaroz jel görüntüleme yöntemleri uygulanmıştır.

Bulgular: Çalışmamız sonucunda 20 adenokarsinomlu olgunun toplam 12'si (%60) olgunun tümör dokusunda *SMAD4* geninin promotör bölgesinde, normal normal dokuya nazaran artmış bir metilasyon varlığı tespit edilmiştir. Bu olguların tümör dokularında normal dokulara göre metilasyonda yaklaşık %25-45 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0.05$).

Sonuç: Çalışmamız sonucunda *SMAD4* gen metilasyonunun akciğer kanserleri için bir tümör belirteci olabileceği ve gen metilasyonu ile SMAD4 protein ekspresyonunun engellenerek hücre içi sinyal yolağının bozulması ve neticesinde kanser gelişimine katkı edebileceğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: SMAD4, DNA metilasyon, akciğer kanseri, adenokarsinom

ABSTRACT

Objective: In this study, we aimed to investigate the effect of promoter region methylation of *small mothers against decapentaplegic 4* (*SMAD4*) gene in adenoma type lung cancer cases. Adenocarcinoma and squamous type carcinomas are the most common types of lung cancer. *SMAD4* gene is an intracellular signal protein. The protein of this gene, which is one of the transcription factors, functions in tissue homeostasis during embryonic development and has effects in the cancer process.

Methods: In this retrospective study, a total of 40 samples including 20 paraffin-embedded tumor tissues of 20 patients with adenocarcinoma lung cancer and normal lung tissue of the same patients were included. After DNA isolation from this paraffin-embedded adenocarcinoma lung tumor tissue and its normal counterparts, methylation specific polymerase chain reaction followed by agarose gel imaging methods were applied to investigate the SMAD4 promoter methylation after bisulfite modification.

Results: As a result of our study, an increased presence of methylation in the promoter region of the *SMAD4* gene in the tumor tissue of a total of 12 (60%) of 20 adenocarcinoma cases compared to normal tissue was detected. A statistically significant increase in methylation rate of approximately 25-45% was found in tumor tissues of these cases compared to normal tissues ($p<0.05$).

Conclusion: As a result of our study, we suggested that *SMAD4* gene methylation may be a tumor marker for lung cancers and may contribute to the development of cancer by inhibiting SMAD4 protein expression by gene methylation and disrupting the intracellular signal pathway.

Keywords: SMAD4, DNA methylation, lung cancer, adenocarcinoma

ORCID ID of the author: M.B. 0000-0002-5968-2048.

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Metin Budak,
E-posta: genomicdna2@yahoo.com

Geliş Tarihi/Received Date: 13.01.2021 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 09.03.2021

©Telif Hakkı 2021 Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gaziosmanpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Makale metnine www.jarem.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2021 by University of Health Sciences Turkey, Gaziosmanpaşa Training and Research Hospital. Available on-line at www.jarem.org

J Acad Res Med 2021;11(1):86-89

GİRİŞ

Akciğer kanseri, tüm kanser türleri arasında erkeklerde ölüme neden olan ilk; kadınlarda ise ikinci kanser türüdür. Dünyada her yıl yaklaşık 1,3 milyon insan akciğer kanserinden ölmektedir. Ancak yeni geliştirilen akciğer kanseri tedavi yöntemleri ile ortalama yaşam süresi ve kalitesi nispeten artmaya başlamıştır (1). Dünya çapında ölüm oranı yüksek olan akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'i küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak bildirilmektedir. KHDAK'ler, adenokarsinom ve skuamöz olmak üzere iki alt tipi mevcuttur ve histopatolojik olarak adenokarsinom ve skuamözlerin hücresel karsinomu olarak sınıflandırılır. Adenokarsinomlar ve skuamöz karsinomlar tüm KHDAK'lerin yaklaşık %50'sini temsil eder (1,2).

SMAD4, kimyasal sinyalleri hücre yüzeyinden çekirdeğe doğru taşıyan bir protein ürünü sentezleyen bir gendir. Bu sinyal yolu, dönüştürücü büyüme faktörü (transforming growth factor-TGF)-yolu üzerinden çalışır ve hücrenin çevresel ortamından etkilenebilir. Sinyal oluşumu, TGF-beta (TGF-β) proteininin hücre yüzeyindeki ilgili reseptöre bağlanmasıyla başlar ve bu olay SMAD grubu proteinlerin aktivasyonunu sağlar (3). SMAD proteinleri, bir protein kompleksi oluşturmak için SMAD4'e bağlanır ve oluşan bu yeni kompleks hücre çekirdeğine doğru hareket ederek sinyali iletir. Ayrıca çekirdekteki tümör baskılayıcı genlerin büyümesini ve aktivasyonunu da kontrol eder (4).

Metilasyon, özellikle genlerin promotör bölgelerinde bulunan CpG nükleotit dizilerindeki 5-karbon sitozine bir metil grubunun eklenmesi ile karakterize olan bir süreçtir. Çalışmalar, memeli genomlarının önemli bir kısmının metillenmiş durumda olduğunu göstermiştir (5,6). Genlerdeki metilasyon reaksiyonları gen ekspresyonunu etkiler ve bu nedenle genler inaktive veya aktive edilebilir. Bu çalışmada, *SMAD4* geninin akciğer kanserleri oluşumuna katkısını belirlemek amacıyla metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (MSP) yöntemi ile adenom tipi akciğer kanserlerinde normal ve tümör dokularının promotör bölgesindeki potansiyel metilasyonunu belirleyerek normal dokudan tümöre dönüşüm aşamasındaki değişimleri göstermeyi amaçladık. Çalışmamız bu yönüyle literatürde bir ilk çalışmadır.

YÖNTEMLER

Çalışmamız kesitsel retrospektif bir araştırma olup hasta onamı alınmamıştır. Bu çalışma için, histolojik olarak doğrulanmış ileri evre (evre 3) 10, erken evre (evre 1) ve orta evre (evre 2) adenokarsinomlu akciğer tümör dokularından 5'er adet kesit ve aynı olguların normal akciğer dokusu olarak cerrahi sınırların en dış kısımlarından 5 adet kesit olmak üzere olgu başına 10 adet olmak üzere formalinle fikse edilmiş parafine gömülü doku bloklarında toplam 20 olguya ait 200 kesit slayt doku örneği hazırlandı (7). Hastaların klinik özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Çalışılacak örnek sayısı power analizi ile belirlenmiş olup bu çalışmada kullanılan tüm olgular Trakya Üniversitesi Patoloji Bölümü'nde 2007-2018 yılları arasında akciğer kanseri tanısı almış hastalara ait parafin doku arşivi kullanılmıştır. Tüm dokuların patolojik olarak değerlendirilmesi patoloji anabilim dalında yapılmıştır. Bu çalışma Trakya Üniversitesi Yerel Etik Kurul izni ile yürütülmüştür (onay numarası: 05/21, onay tarihi: 27.02.2013).

Tablo 1. Adenokarsinomlu hastaların klinik özellikleri

	Normal olgu (n=20)	Metilasyon normal doku	Tümör olgu (n=20)		Metilasyon tümör doku
	n (%)	n (%)	n (%)	%	n (%)
Yaş, yıl (ortalama ± SS)	58±7	-	-	-	-
≤53	9 (45)	-	9 (45)	45	-
>59	11 (55)	-	11 (55)	55	-
Cinsiyet					
Kadın	5 (25)	-	5 (25)	25	-
Erkek	15 (75)	-	15 (75)	75	-
Evre					
1	-	-	10	50	4 (40)
2	-	-	7	35	6 (85,7)
3	-	-	3	15	2 (66,6)

SS: standart sapma

Parafine Gömülü Dokulardan Genomik DNA İzolasyonu ve Bisülfit Modifikasyon

Daha önce belirtildiği şekilde seçilmiş dokulardan kesitler elde edilerek slaytlardan kazınma suretiyle tüplere alınmış ve DNA'ları literatürde belirtildiği gibi izole edilmiştir (8). Bu DNA'lar daha sonra spektrofotometrik yöntemle 280 nm ve 260 nm dalga boyunda DNA miktarları belirlendikten sonra analiz edilmiş; ve numuneler daha ileri analiz için +4 ˚C'de saklanmıştır. DNA'ların bisülfit modifikasyonları EpiJET Bisulfite Conversion Kit ve Protokolü'ne uygun olarak yapılmıştır (Thermo Fisher Scientific-USA) (7,8).

SMAD4 Promotörünün Metilasyon Analizi

Genomik DNA'nın sodyum bisülfit modifikasyonu ile DNA'da bulunan tüm metillenmemiş sitozinler timine dönüştürülür fakat bu reaksiyon, metile durumda bulunan sitozinler etkilemediği için potansiyel bir dizi farklılığı oluşturulmaktadır. DNA'nın bu kimyasal modifikasyonundan sonra DNA örnekleri *SMAD4* geninin metilasyon analizi için kullanılmıştır. *SMAD4* geni dizisi için potanisyel metilasyon bölgelerini ve metilasyona özel primer dizilerini belirleyebilmek için MethPrimer V1.1 beta programı kullanılmıştır (www.urogene.org adresinde mevcuttur) (9).

Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi

SMAD4 gen bölgesinin promotörü için metilasyona özgü primerler aşağıdaki gibidir: İleri 5': GTAATAATACGGTTTTGGTCGTC-3', ters: 5'-TCCCACCCCCTAAACGACCGCG-3', ürün boyutu: 164 baz çifti (bç), Tm: 77,4 ˚C, SMAD4 gen bölgesinin promotörü için kullanılan metillenmemiş bölgeye özel primerler şunlardır: İleri: 5'-GTAATAATATGGTTTTGGTTGTT-3', ters: 5'-CTCCCACCCCCTAAACAACCACA-3', ürün boyutu: 163 bç, Tm: 72,3 ˚C. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) koşulları, 95 ˚C'de 10' için başlatmayı takiben 95 ˚C 45', 55 ˚C 30', 72 ˚C 30'x35 döngü ve son olarak 72 ˚C'de 5' sonlandırma aşamalarından

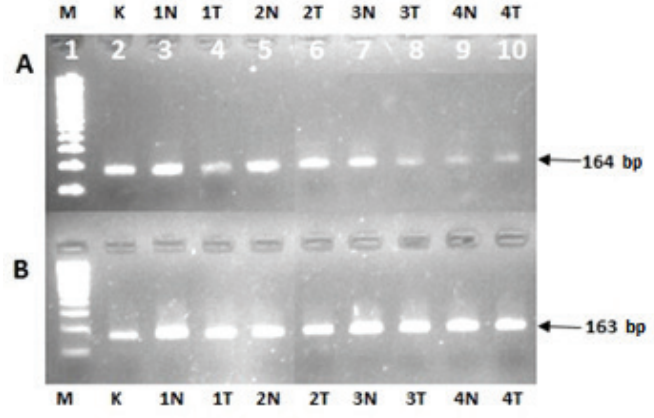
oluşturulmuştur. Metillenmiş ve metillenmemiş PCR ortamı; PCR tamponu 1x, $MgCl_2$: 2 mM, DMSO: %5 (h/h), dNTP: 12,5 mM, primer ileri: 10 nM, primer ters: 10 nM, taq polimeraz: 1U (5U/µL). Şablon DNA 100 ng, 50 µL'ye kadar dH_2O ile tamamlanmıştır. Metillenmiş ve metillenmemiş insan DNA'ları, pozitif ve negatif kontrol DNA'ları olarak kullanıldı (S8001 | CpGenome™ İnsan Metillenmiş ve Metillenmemiş DNA Standart Seti). Bu DNA'lar, PCR'den önce bisülfit modifikasyon yapılmıştır. Modifiye edilmiş bu DNA örnekleri ile PCR, metilasyona özgü ve metilasyona özgü olmayan primerler kullanılarak gerçekleştirildi. Daha sonra PCR ürünleri ultraviyole ışık altında %2 agaroz jel için değerlendirildi (9), tümörler ve metilasyon için normal dokular karşılaştırıldı ve metilasyon oranları belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizi SPSS 20 programı (IBM Corp, Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapıldı. Sürekli değişkenler ortalama ± standart sapma ve nitel değişkenler yüzde olarak ifade edildi. MSP sonuçların istatistiksel analizleri yapıldı ve deney ve kontrol grubu sonucu χ^2 testi ile karşılaştırıldı, $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (10).

BULGULAR

Her un-MSP için 1-3 µL bisülfitle modifiye edilmiş DNA kullanıldı. MSP ve un-MSP ürünleri, etidyum bromür ile boyanarak %2'lik agaroz jeli üzerinde değerlendirildi (Resim 1 A-B). *SMAD4* geninin promotöründe beklenen bant boyutu, MSP ve un-MSP için 163-164 bp idi (Resim 1) (11). Sonuç olarak adenokarsinom tümörlerinin yaklaşık 12'sinde (%60) SMAD4 promotör metilasyonunun mevcut olduğu ve un-metilasyonun %3-10 olduğu, normal akciğer dokularında ise %70 un-metilasyon ve yaklaşık %20 metilasyon görülmüştür ($p<0,05$). Tümör evrelerine göre değerlendirildiğinde birinci evre tümörlerin %40'ı (4 örnekte), 2. evre tümörlerin %87,5'i (6 örnekte) ve 3. evre tümörlerin %66'sı (2 örnekte) metilasyonda artış gözlenmiştir (Tablo 1).



Resim 1. A. *SMAD4* geni için un-metilasyona özel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sonucu, hat 1: M: 100 bç marker, hat 2: (+) kontrol DNA, her bir olgu için normal ve tümör çiftleri hat 3-11. B. *SMAD4* geni için methylationa özel PCR sonuçları, hat 1: M: 100 bç marker, hat 2: (+) kontrol DNA, her bir olgu için normal ve tümör çiftleri hat 3-11
N: normal, T: tümör, bç: baz çifti

TARTIŞMA

Kromozom 18q21'de bulunan *SMAD4* geni, birçok pankreas ve kolorektal tümörlerde aday bir tümör baskılayıcı gen olarak olarak bilinmektedir. Pankreas ve kolorektal kanserlerde *SMAD4* geninde delesyon gibi mutasyon mekanizmalarla inaktive olmasına sebep olan değişimlerin etkili olduğu gösterilmiştir (11). Bu sebeplerden dolayı SMAD4 metilasyonu öncelikle kolorektal ve pankreas kanserlerinde incelenmiştir. MSP, gen metilasyonlarının araştırılması için kullanılan başlıca yöntemdir ve birçok kanser ve diğer hastalık gruplarında başarıyla kullanılmaktadır (12). Literatürde akciğer kanserlerinde SMAD4 metilasyon durumunu gösteren bir çalışma bulunmadığından MSP yöntemini kullanarak SMAD4 promotör bölgesini inceledik. SMAD4, özellikle transkripsiyonel fonksiyonu rolü nedeniyle iyi bir kemoterapötik seçeneği olabilir (13). SMAD4 ekspresyonu ve bağlantılı TGF- β ile artan fonksiyonel gen ekspresyonları ve onkogenez sinyal yolakları aktifleşmesi arasında, özellikle kanser gelişiminde bir ilişki mevcuttur (10,11). Araştırmamız, akciğer adenokarsinomunda SMAD4 metilasyonlarının görülebileceğini göstermiştir. Belki bu şekilde, *SMAD4* gen inaktivasyonlarının ve diğer aktif genlerle birlikte akciğer kanserlerinde yaşam beklentisinin azalmasının sebeplerinden biri olabilir. Literatürde bu konuyla ilgili sınırlı bilgi vardır. Bu bilgiler ışığında onkogenez yolakları aktive veya inaktive edebilmenin kanser tedavilerindeki potansiyel önemini gösterir. Bu genin hem epigenetik özelliklerini inceleyen hem de epigenetik inhibisyon mekanizmalarının açıklama çalışmaları yeni kanser kemoterapi ajanları arayışında ilgi çekici olabilir (10,11,14).

Fakat sadece bu yönüyle bile çalışmamız en sık görülen akciğer kanseri türlerinden biri olan adenokarsinom akciğer kanserlerinde SMAD4 metilasyonu olduğunu göstermiştir. Çalışmamız SMAD4 promotör metilasyonu ile adenokarsinom akciğer kanserlerinde ilişkili olabileceğini gösteren nadir bir çalışmadır.

Çalışma Kısıtlılıkları

Çalışmamızda tümör ve normal akciğer dokularında *SMAD4* gen metilasyonu ile birlikte RNA ve protein seviyelerinde *SMAD4* gen ekspresyonunun çalışılamamış olması bir kısıtlılık oluşturmaktadır.

SONUÇ

Akciğer kanserlerinde SMAD4 için gen ekspresyonu ve yolakları üzerine daha fazla araştırma yapılması gereklidir. Yakın bir gelecekte SMAD4 promotörlerinin metilasyon bölgeleri akciğer kanserlerinde ve bu genin rol oynadığı bilinen diğer kanser türlerinde terapötik hedef olmayı vaat etmektedir. Belki bu sayede mevcut olan kanser tedavilerinin etkinliğini arttırabileceği ve kanser hastaları için yaşam beklentisi/yaşam kalitesi üzerinde olumlu etkileri olabileceğine inanıyoruz.

Teşekkür: Doktor Ömer Yalçın'a patoloji tetkikleri için teşekkür ederim.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma Trakya Üniversitesi Yerel Etik Kurul izni ile yürütülmüştür (onay numarası: 05/21, onay tarihi: 27.02.2013).

Hasta Onamı: Çalışmamız kesitsel retrospektif bir araştırma olup hasta onamı alınmamıştır.

J Acad Res Med 2021;11(1):86-89

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Finansal Destek: Yazar bu çalışma için finansal destek almadığını beyan etmiştir.

Ethics Committee Approval: This study was conducted with the permission of the Trakya University Local Ethics Committee (approval no: 05/21, approval date: 27.02.2013).

Informed Consent: Our study is a cross-sectional retrospective study and patient consent was not obtained.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Financial Disclosure: The author declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

1. Pinto R, Petriella D, Lacalamita R, Montrone M, Catino A, Pizzutilo P, et al. KRAS-driven lung adenocarcinoma and b cell infiltration: novel insights for immunotherapy. Cancers (Basel) 2019; 11: 1145.
2. Gan Z, Zou Q, Lin Y, Huang X, Huang Z, Chen Z, et al. Construction and validation of a seven-microRNA signature as a prognostic tool for lung squamous cell carcinoma. Cancer Manag Res 2019; 11: 5701-9.
3. Miyaki M, Kuroki T. Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer. Biochemical and b67uj8iophys Res Commun 2003; 306: 799-804.
4. Korc M. Smad4-TGF-ß signaling pathways in pancreatic cancer pathogenesis. Pancreatic Cancer. New York: Springer; 2018. p. 431-55.
5. Ramsahoye BH, Biniszkiewicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. Proc Nat Acad Sci U S A 2000; 97: 5237-42.
6. Cho S, Lee JH, Cho SB, Yoon KW, Park SY, Lee WS, et al. Epigenetic methylation and expression of caspase 8 and survivin in hepatocellular carcinoma. Pathol Int 2010; 60: 203-11.
7. Budak M. Methylation of the promoter of survivin gene may affect immunohistochemical expression of survivin protein in lung cancers. Cerrahpaşa Medical Journal 2019; 43: 44-9.
8. Yalcin O, Budak M. Un-methylation of the survivin gene has no effect on immunohistochemical expression of survivin protein in lung cancer patients with squamous cell carcinoma. Bratisl Lek Listy 2017; 118: 160-3.
9. Li L-C, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. Bioinformatics 2002; 18: 1427-31.
10. Chaopatchayakul P, Jearanaikoon P, Yuenyao P, Limpaiboon T. Aberrant DNA methylation of apoptotic signaling genes in patients responsive and nonresponsive to therapy for cervical carcinoma. Am J Obstet Gynecol 2010; 202: 281.
11. Aitchison AA, Veerakumarasivam A, Vias M, Kumar R, Hamdy FC, Neal DE, et al. Promoter methylation correlates with reduced Smad4 expression in advanced prostate cancer. Prostate 2008; 68: 661-74.
12. Roth S, Laiho P, Salovaara R, Launonen V, Aaltonen LA. No SMAD4 hypermethylation in colorectal cancer. Br J Cancer 2000; 83: 1015-9.
13. Marini KD, Croucher DR, McCloy RA, Vaghjiani V, Gonzalez-Rajal A, Hastings JF, et al. Inhibition of activin signaling in lung adenocarcinoma increases the therapeutic index of platinum chemotherapy. Sci Transl Med 2018; 10: eaat3504. doi: 10.1126/scitranslmed.aat3504.
14. Budak M, Ozkan U, Yildiz M. Identification of potential methylation regions of the smad4 mrna and determining primer sequences for ms-pcr with the 'methprimer'program. Int J Genet Genom 2019; 7: 55-9.