

Uterin leiomyomda Wnt, β -katenin, TGF- β , Siklin D1'in Ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Determination of Wnt, β -catenin, TGF- β and Cyclin D1 Expression Levels in Uterine Leiomyoma

Halime Hanım PENÇE ¹, Özge Kömürcü KARUSERCİ ²
Esra Güzel TANOĞLU ³, Mete Gürol UĞUR ²

1. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

2. Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

3. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enst., Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Amaç: Uterin leiomyomlar oldukça sık görülen östrojen ve progesterone bağımlı benign tümörlerdir. Üreme çağındaki kadınlarda görülebilir ve düzensiz uterin kanama, şiddetli anemi, tekrarlayan gebelik kaybı gibi ciddi problemlere sebep olurlar. Her leiomyomun, tek bir mutasyona uğramış myometrial düz kas kök hücresinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte östrojen/progesteronun leiomyoma büyümesini nasıl düzenlediği bilinmemektedir. Bu çalışmada Wnt, β -katenin, TGF- β , siklin D1 genlerinin uterin leiomyom progresyundaki etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Gereçler ve Yöntem: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na başvuran ve leiomyoma tanısı alan 70 hasta ile 66 sağlıklı bireyden alınan dokular çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta ve sağlıklı gruplar arasında genlerin ekspresyon farklılıkları kantitatif Realtime PCR ile yapılmıştır.

Bulgular: Hastaların ortalama yaşının 44,1±6,8 yıl olduğu bulunmuştur. Sigara için hasta sayısının toplamda %8 olduğu ve gruplar arasında sigara kullanımı açısından fark olmadığı saptanmıştır. Uterin leiomyom tanısına sahip hastalarda Wnt, β -katenin, TGF- β , siklin D1 genlerinin ekspresyon düzeylerinde sağlıklı gruba göre belirgin bir artış olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışmada Wnt, β -katenin, TGF- β , siklin D1'in östrojen/progesteron'un leiomyoma oluşumu ve büyümesinde kritik bir parakrin rolü olduğunu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: leiomyom, uterus, TGF- β , Wnt, β -katenin, siklin D1

ABSTRACT

Objective: Uterine leiomyomas are common estrogen and progesterone-dependent benign tumors. They occur in women of reproductive age and cause serious problems such as irregular uterine bleeding, severe anemia, recurrent pregnancy loss. Each leiomyoma is thought to originate from a single mutated myometrial smooth muscle stem cell. However, it is not known how estrogen / progesterone regulates the growth of leiomyoma. The aim of this study was to show the effects of Wnt, β -catenin, TGF- β , cyclin D1 genes on uterine leiomyoma progression.

Material and Methods: Tissues from 70 patients and 66 healthy individuals who were admitted to Gaziantep University Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology and diagnosed as leiomyoma were included in the study. Differences in the expression of genes between patient and healthy groups were performed by quantitative Realtime PCR.

İletişim

Sorumlu Yazar: Esra Güzel TANOĞLU

Adres: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Tel: +90 (216) 346 36 36

E-Posta: esra.guzel@sbu.edu.tr

Makale Geliş: 04.06.2019

Makale Kabul: 06.10.2019

DOI: http://dx.doi.org/10.16948/zktpb.629373

Results: The mean age of the patients was 44.1 ± 6.8 years. The total number of smokers was 8% and there was no difference between the groups in terms of smoking. The expression levels of Wnt, β -catenin, TGF- β , and cyclin D1 genes were significantly increased in patients with uterine leiomyoma compared to healthy group.

Conclusion: In this study, it was demonstrated that Wnt, β -catenin, TGF- β and cyclin D1 play a critical role in the formation and growth of leiomyoma of estrogen / progesterone.

Keywords: leiomyoma, uterus, TGF- β , Wnt, β -catenin, cyclin D1

GİRİŞ

Uterin leiomyomların görülme oranı, reproduktif çağda %60, tüm yaşam döngüsü boyunca %80'e ulaşır. Leiomyomlar düzensiz kanama, ciddi anemi, pelvik ağrı, üriner inkontinans, preterm doğum ve tekrarlayan gebelik kaybı gibi semptomlara sebep olabilen östrojen-progesteron bağımlı benign tümörlerdir [1]. Yüksek prevalanslarına rağmen leiomyomların hücresel ve moleküler düzeyde oluşum mekanizmaları hala net anlaşılamamıştır ancak günümüzdeki bilgiler doğrultusunda her bir myomun mutasyona uğramış bir myometrial düz kas kök hücresinden kaynaklandığı düşünülmektedir [2].

Somatik kök hücreler; dokularda bulunan, onarım ve yenilemede rol oynayan bir hücre grubudur [3, 4] ve bu hücre grubu bir tümöre ait olduğunda da aynı bölünme ve büyüme mekanizmasıyla ait olduğu dokunun devamlılığını sağlar [5, 6] Myometrium dokusu östrojen-progesteron ve büyüme faktörü bağımlı somatik kök hücreler içerir. Normal myometrium dokusu ve leiomyom karşılaştırıldığında, kök hücrelerinin oldukça düşük seviyelerde östrojen ve progesteron reseptörü eksprese ettikleri görülmüştür. Leiomyom kök hücreleri üzerindeki östrojen-progesteron ve büyüme faktörü etkisinin parakrin yolla olduğu gösterilmiştir [7, 8].

Sinyal iletimini içeren Wnt gen ailesi, Müller gelişiminde bir etkiye sahiptir. Bu genin ürünleri, beta-katenin vasıtasıyla uterusun doğum öncesi ve doğum sonrası gelişimini düzenler. Mülleran duktus mezenkimasından kaynaklanan miyojenik progenitor hücreler normalde düz kasa doğru farklılaşır, ancak beta-katenin yokluğunda adipositlere geçerek farklılaşma izlerler. Wnt/ β -katenin, hücre siklusu ve fibroz ile ilişkili protein ekspresyonunun modülasyonu yoluyla hücre çoğalmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını düşündürmüştür. Hücre siklusüne bağlı siklin D1, Cdk1 ve Cdk2

proteinlerinin azaltılmış seviyelerinin yanı sıra p-hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz, p-protein kinaz B ve transforme edici büyüme faktörü TGF- β sinyalizasyonunun azaltılmış aktivasyonları bildirilmiştir [9-11].

Bu çalışmada cerrahi sonrası patolojide leiomyom tanısı konmuş hasta grubu ile sağlıklı myometriyum dokusu içeren kontrol grubu arasında Wnt, β -katenin, TGF- β , siklin D1 genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

1. Hasta seçimi: Gaziantep Üniversitesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde Mayıs 2018-Nisan 2019 tarihleri arasında leiomyom ön tanısıyla ameliyat edilen ve post-operatif histopatolojik tanıları sonrası çalışma kriterlerine uyan 136 hasta çalışmaya dahil edildi. 136 hastanın 70 tanesi leiomyom tanısı netleşen, 66 tanesi histopatolojik olarak leiomyom izlenmeyen sağlam uterus dokusundan oluşan kontrol grubunu içermektedir. Cerrahi sırasında alınan parafine gömülü uterus doku örnekleri iki gruba ayrıldı (Grup 1: Leiomyoma grubu, Grup 2 : Kontrol grubu). Hastaların demografik özellikleri, ameliyat şekli ve histopatolojik tanıları kaydedildi. Hastalardan alınan onam formunun ve etik kurul onayının ardından doku örnekleri uygun koşullarda transfer edilerek çalışmanın deneysel aşamaları Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarında gerçekleştirildi.

2. Total RNA izolasyonu: 1 mL Trizol (Invitrogen, USA) içerisinde pipet ile homojenize edilen doku örneklerinden total RNA'lar, üreticinin protokolü doğrultusunda ekstrakte edildi. RNA'ların saflık ve nükleik asit konsantrasyonları spektrofotometrede ölçümleri NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE) ile yapıldı.

3. cDNA eldesi ve qRT PCR: Wnt, β -katenin, TGF-B ve Cyclin-1 genlerin ifade düzeylerinin incelenmesi için elde edilen RNA örneklerinden eşit miktarlarda kullanılarak "Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit" (Roche, Switzerland) kitiyle üretici firmanın protokolü izlenerek cDNA sentezi yapıldı. Gen ifade analizleri gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu SYBR Green metodu ile üretici firmanın protokolüne göre Biorad CFX Connect™ Real-Time PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. GAPDH internal kontrol olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan primer listesi Tablo 1'deki gibidir.

Tablo 1: Genlere ait primer dizileri.

Gen Adı	Primer Dizisi 5'-3'
WNT1-F	GCAAGTACAACATCGATTTTGG
WNT1-R	TCTTGGCGCATCTCAGAGAAC
Cyclin D1-F	TGCATGTTCTGGCCTCTAA
Cyclin D1-R	TCGGTGTAGATGCACAGCTT
TGF- β -F	CCCAGCATCTGCAAAGCTC
TGF- β -R	GTCAATGTACAGCTGCCGA
β -catenin-F	AAAATGGCAGTGCGTTTAG
β -catenin-R	TTTGAAGGCAGTCTGTCTGTA

Elde edilen sinyaller kontrol sinyallerine oranla normalize edilerek ve rölatif kantitesi hesaplandı. Rölatif kantite analizleri delta delta CT metodu kullanılarak yapıldı. Deneyler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

4. İstatistiksel Analiz: İstatistiksel analizler log-dönüştürülmüş veriler üzerinde "two-sided Student's t-test" ile yapılmıştır. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

Sonuçlar: Çalışmaya dahil edilen gruplar arasında yaş bakımından farklılık yoktu (p>0,05). Her iki grupta gravite ve parite sayıları açısından da anlamlı fark yoktu (p=0,06, p=0,08; sırayla). Her iki grupta sigara içen hasta sayısı toplamda 12 idi (8%) ve gruplar arasında sigara kullanımı açısından fark yoktu (p=0.08). Olguların %52.9'u myomektomi, %5.1'i laparoskopik total histerektomi, %42'si abdominal histerektomi ameliyatı oldu. Hastaların sosyodemografik özellikleri Tablo 2'de belirtilmiştir. Grup 1'de çıkarılan leiomyomların histopatolojik tanıları Tablo 3'de özetlenmiştir.

Tablo 2: Çalışmaya dahil edilen hastaların sosyodemografik özellikleri.

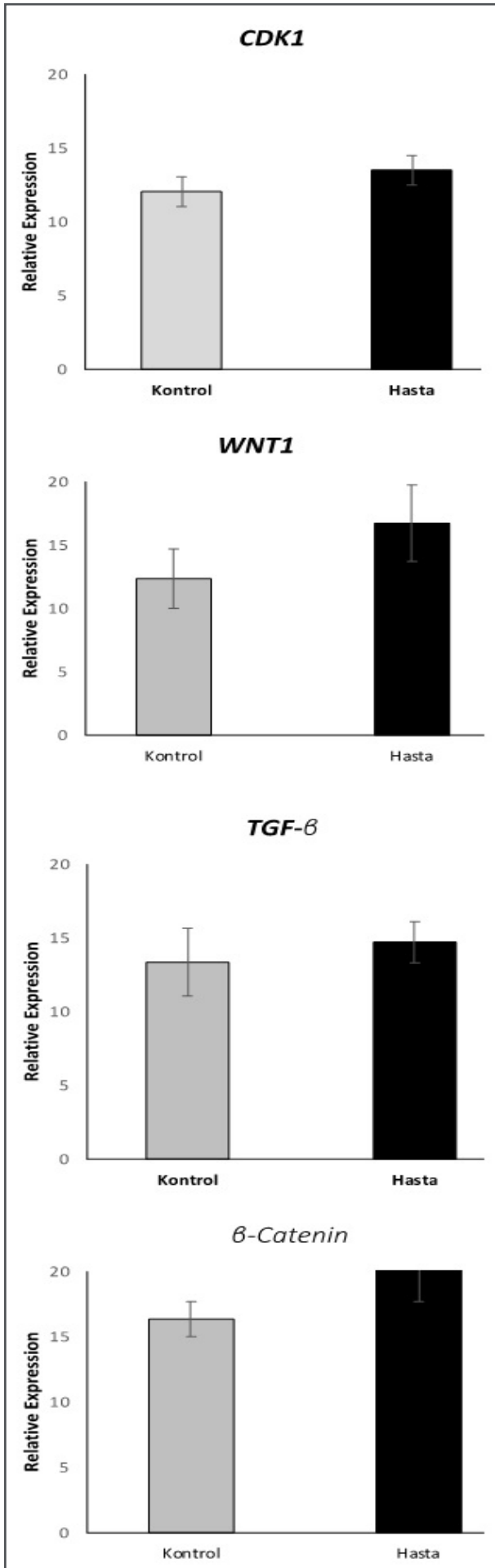
	Grup 1	Grup 2	Toplam	P değeri
Sayı (%)	70 (%51,5)	66 (%48,5)	136	0,12
Ortalama yaş	43,5±7.1	44,1±6,8	43,8±6,9	0,07
Ortalama Gravida	4,2±2	3,9±2	4,1±2	0,06
Ortalama Parite	3,8±2	2,8±1,6	3,3±1,8	0,08
Ca 125	27±3,1	28±2,8	27,5±2,8	0,27
Hemoglobin	10,1±2,4	10,5±2,1	10,3±2,5	0,07
Kronik hastalık varlığı *	4,1±2,1	3,8±2,3	3,9±2,2	0,23

* Diabetes mellitus, kronik kalp hastalığı, kronik böbrek hastalığı, kronik karaciğer hastalığı, otoimmün ya da romatolojik hastalıklardan herhangi birinin varlığı.

Tablo 3: Leiomyomların histopatolojik tanıları.

	Hasta sayısı	Yüzde (%)
Leiomyoma	66	94
Atipik leiomyoma	1	1,4
Sellüler leiomyoma	2	2,8
Yüksek mitotik aktiviteli leiomyoma	1	1,4

İncelenen doku örneklerinde Cyclin-1, TGF β ve Wnt, β -katenin gen düzeylerinde hastalarla sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında belirgin artış gözlemlendi (sırasıyla p değerleri; p<0.001, p<0.01, p<0.05) (Şekil 1).



Şekil 1: CDK1, TGF-β, WNT1, B-Catenin gen ekspresyon düzeylerinin leiomyom ve sağlam uterus dokusu olan hastalarda gösterimi (hasta-kontrol).

TARTIŞMA

Leiomyom oluşumu ve büyümesinde rol alan mekanizmalar hala netleşmemiştir. Bu iyi huylu tümörün gen ekspresyon profilini tanımlamak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda WNT/β-katenin yolunun östrojen ve progesterona bağımlı tümörögenез hücrelerini içeren kritik bir parakrin rolü olduğu gösterilmiştir [15]. Wnt/Beta-katenin yolağını etkileyen somatik mutasyonların uterin leiomyomlarda %85 oranında saptandığı ve bu yüzden bu yolağın leiomyom patogenezinde kritik rol oynayabileceği belirtilmiştir [12, 13] ancak bu mutasyonların myom ya da tümör oluşumundaki rollerinin aydınlatılmasında ileri çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır [14].

Çeşitli araştırmacılar, tümör içindeki hücre sel göçte anahtar faktör olan TGF-β izoformlarının varlığını uterin fibroidslerin patofizyolojisinde varlığını doğrulayarak, tümör büyümesini uyardığını ve tümör metabolizmasını arttırdığını göstermiştir [16]. Fibroid ile doğrudan temas halindeki uterusun düz kasında TGF-β ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı, uterin fibroidslerin büyümesini düzenlediği bildirilmiştir [17]. TGF-β sinyalinin de leiomyomda aktif olduğu ve patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir [18]. Wnt/Beta-katenin yolunu etkileyen TGF-β arasındaki ilişki ise henüz doğrulanmamıştır [19].

Hücrelerde G1 fazı için gerekli olan ve hücre döngüsü düzenleyici protein olan Siklin D1'in ekspresyon seviyelerinin yükselmesi, tümöröjenезi etkileyebilmektedir. Bu genin artan ekspresyonunun normal hücre döngüsü kontrolünü bozabildiği ve hücrelerde tümör oluşumuna neden olduğu bilinmektedir [20]. Başka bir çalışmada uterin leiomyosarkom hastalarının %90'ında siklin D1'i kodlayan CCND1 ve siklin D3'ü kodlayan CCND3 genlerinde defekt olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, bu yoldaki bir anormalliklerin kötü prognoz ile ilgili önemli bir faktör olduğu da bilinmektedir [21].

Bu çalışmanın amacı Wnt, β-katenin, TGF-β, Siklin D1'in gen ekspresyon seviyelerinin uterin leiomyom hücrelerinde saptanması ve uterin leiomyomlarda cerrahi işlemler dışındaki potansiyel terapötik seçeneklerin geliştirilmesine yardımcı olmaktır. Çalışmamızın bulgularına göre Wnt/Beta-katenin, Siklin D1 ve TGF-β'nin leiomyom oluşumu ve hücre çoğalmasının düzenlenmesinde kritik öneme sahip olduğu belirlenmiştir. İlerleyen zamanda bu kaskatın düzenlenmesi belki de leiomyomun cerrahisiz tedavisine önemli bir katkı sağlayacaktır. Bununla birlikte leiomyom oluşumu multifaktöriyel bir sistem zemininde gerçekleşmekte olup bu durumu tetikleyen diğer mekanizmaların da ortaya konulması gerekir.

SONUÇ

Wnt, β-katenin, TGF-β, Siklin D1 değerlerinin uterin leiomyom hastalarında yükseldiği ve prognostik bir faktör olarak kullanılabilmesi bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak bu parametrelerin erken evre uterin leiomyom hastalarında arasında gösterimi ve bu genlerdeki değişimlerin etkilediği

yolak çalışmalarının net olarak ortaya konabilmesi için geniş kapsamlı yeni çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2018/055).

KAYNAKLAR

1. Styer, A.K. and B.R. Rueda, *The Epidemiology and Genetics of Uterine Leiomyoma. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2016. 34: p. 3-12.
2. De La Cruz, M.S. and E.M. Buchanan, *Uterine Fibroids: Diagnosis and Treatment. Am Fam Physician*, 2017. 95(2): p. 100-107.
3. Szotek, P.P., et al., *Adult mouse myometrial label-retaining cells divide in response to gonadotropin stimulation. Stem Cells*, 2007. 25(5): p. 1317-25.
4. Schwab, K.E., P. Hutchinson, and C.E. Gargett, *Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. Hum Reprod*, 2008. 23(4): p. 934-43.
5. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells*, 1978. 4(1-2): p. 7-25.
6. Jordan, C.T., M.L. Guzman, and M. Noble, *Cancer stem cells. N Engl J Med*, 2006. 355(12): p. 1253-61.
7. Mas, A., et al., *Identification and characterization of the human leiomyoma side population as putative tumor-initiating cells. Fertil Steril*, 2012. 98(3): p. 741-751.e6.
8. Ono, M., et al., *Role of stem cells in human uterine leiomyoma growth. PLoS One*, 2012. 7(5): p. e36935.
9. Gupta, S., J. Jose, and I. Manyonda, *Clinical presentation of fibroids. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2008. 22(4): p. 615-26.
10. Mäkinen, N., et al., *MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. Science*, 2011. 334(6053): p. 252-5.
11. Al-Hendy, A., et al., *Silencing Med12 Gene Reduces Proliferation of Human Leiomyoma Cells Mediated via Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. Endocrinology*, 2017. 158(3): p. 592-603.
12. Markowski, D.N., et al., *MED12 mutations in uterine fibroids--their relationship to cytogenetic subgroups. Int J Cancer*, 2012. 131(7): p. 1528-36.
13. Markowski, D.N., et al., *Uterine fibroids: do we deal with more than one disease? Int J Gynecol Pathol*, 2014. 33(6): p. 568-72.
14. Kim, S., et al., *Mediator is a transducer of Wnt/ β -catenin signaling. J Biol Chem*, 2006. 281(20): p. 14066-75.
15. Ono, M., et al., *Paracrine activation of WNT/ β -catenin pathway in uterine leiomyoma stem cells promotes tumor growth. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(42): p. 17053-8.
16. Lee, B.S. and R.A. Nowak, *Human leiomyoma smooth muscle cells show increased expression of transforming growth factor-beta 3 (TGF beta 3) and altered responses to the antiproliferative effects of TGF beta. J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(2): p. 913-20.
17. Arici, A. and I. Sozen, *Expression, menstrual cycle-dependent activation, and bimodal mitogenic effect of transforming growth factor-beta1 in human myometrium and leiomyoma. Am J Obstet Gynecol*, 2003. 188(1): p. 76-83.
18. Norian, J.M., et al., *Transforming growth factor beta3 regulates the versican variants in the extracellular matrix-rich uterine leiomyomas. Reprod Sci*, 2009. 16(12): p. 1153-64.
19. Mäkinen, N., et al., *MED12 exon 2 mutations are common in uterine leiomyomas from South African patients. Oncotarget*, 2011. 2(12): p. 966-9.
20. Sherr, C.J., *Cancer cell cycles. Science*, 1996. 274(5293): p. 1672-7.
21. Yang, J., et al., *Genetic aberrations in soft tissue leiomyosarcoma. Cancer Lett*, 2009. 275(1): p. 1-8.