

## SMAD4 GENE ANALYSIS IN PATIENTS WITH EARLY ONSET COLORECTAL CANCER: A PILOT STUDY

A. NIKOLIC<sup>1,\*</sup>, J. DESPOTOVIC<sup>2</sup>,  
T. BABIC<sup>1</sup>, J. ANTIC<sup>2</sup>, S. MARKOVIC<sup>3</sup>,  
Z. KRIVOKAPIC<sup>4,5,6</sup>, D. RADOJKOVIC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444A, Belgrade, Serbia

<sup>2</sup> Institute of Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, Clinical Center of Serbia, Dr Subotica 13, Belgrade, Serbia

<sup>3</sup> Center for Gastroenterology and Hepatology, University Clinical Center Zvezdara, Dimitrija Tucovica 161, Belgrade, Serbia

<sup>4</sup> Faculty of Medicine, University of Belgrade, Dr Subotica 8, Belgrade, Serbia

<sup>5</sup> First Surgical Clinic, Clinical Center of Serbia, Dr Koste Todorovica 6, Belgrade, Serbia

<sup>6</sup> Serbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, Belgrade, Serbia

E-mail: aleksni@imgge.bg.ac.rs\*, jovanadespotovic@imgge.bg.ac.rs, tamara@imgge.bg.ac.rs, jaki.antic@yahoo.com, srdjanmarkovic@yahoo.com, krivokapiczoran@gmail.com, dada@imgge.bg.ac.rs

*In colorectal cancer (CRC), inactivation of SMAD4 occurs early in the disease development and SMAD4 represents one of key driver genes in progression and metastasis. Loss of SMAD4 protein expression is a relatively common feature of sporadic colorectal cancers, and it was observed to be even more frequent in tumors of patients with early onset disease and also more frequent in microsatellite stable tumors. Pathogenic variants in the SMAD4 gene are usually missense or nonsense mutations, and they are more frequent in the C-terminal domain. The aim of this study was to perform genetic analysis of SMAD4 C-terminal domain in colorectal cancer patients with early onset disease and microsatellite stable tumors. This pilot study was conducted with a purpose of investigating if such genetic screening strategy would be useful for diagnostic purposes in this specific subgroup of CRC patients. The study was conducted in a selected set of DNA samples extracted from the tumors of CRC patients who had less than 50 years at the time of diagnosis. Genetic analysis of C-terminal domain has encompassed analysis of exons 9, 10, 11 and 12 of the SMAD4 gene by PCR and direct DNA sequencing. Among the twenty analyzed tumor DNAs, one sample was found to harbor a SMAD4 variant: NC\_000018.9:g.48591918C>T; (NM\_005359.5: c.1081C>T; Arg361Cys). The variant was discovered in exon 9, affecting the codon 361, which*

*represents a mutational hot spot within the SMAD4 gene. This variant was discovered in homozygous state in the tumor of a 47-years old female with T3 stage carcinoma of the right colon. Considering the incidence and functional consequences of SMAD4 exon 9 variants, the screening of this region could be a useful low cost strategy for the genetic analysis of colorectal tumors from patients with early onset disease, as well as for susceptibility testing.*

**Key words:** colorectal cancer, early onset disease, genetic testing, pathogenic variant, SMAD4

### АНАЛІЗ ГЕНУ SMAD4 У ПАЦІЄНТІВ З РАННІМ ПОЧАТКОМ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКУ: ПІЛОТНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

У випадку колоректального раку (КРР) деактивація SMAD4 проходить на ранньому етапі розвитку захворювання і SMAD4 є одним з ключових драйверних генів його розвитку та метастазів. Втрата експресії білка SMAD4 – це досить поширена риса спорадичного колоректального раку, яка навіть частіше спостерігається в пухлинах пацієнтів з раннім розвитком захворювання, а також в пухлинах з мікросателітною стабільністю. Патогенетичні варіанти в гені SMAD4 є зазвичай міссенс- чи нонсенс-мутаціями, які часто трапляються в С-термінальному домені. Мета цього дослідження полягала у проведенні генетичного аналізу SMAD4 С-термінального домену у пацієнтів з колоректальним раком з раннім початком захворювання та пухлинами з мікросателітною стабільністю. Це пілотне дослідження було проведене з метою вивчення того, чи буде корисною така стратегія генетичного скринінгу для діагностики цієї особливої підгрупи пацієнтів з КРР. Дослідження проводили з вибраним набором зразків ДНК, виділених з пухлин пацієнтів з КРР, яким було менше 50 років на час встановлення діагнозу. Генетичний аналіз С-термінального домену включав в себе аналіз екзонів 9, 10, 11 і 12 гену SMAD4 за допомогою ПЛР та прямого секвенування ДНК. Було виявлено, що серед двадцяти проаналізованих ДНК пухлин один зразок містив варіант SMAD4: NC\_000018.9:g.48591918C>T; (NM\_005359.5: c.1081C>T; Arg361Cys). Цей варіант було виявлено в екзоні 9, що впливає на кодон 361, який є гарячою точкою для мутацій всередині гену SMAD4. Варіант було виявлено в гомозиготному стані у пухлині 47-річної жінки з карциномою висхідної ободової кишки на стадії Т3. Зважаючи на частоту і функціональні наслідки варіантів екзону 9 SMAD4, скринінг цієї області може бути корисною дешевою стратегією проведення генетичного аналізу пухлин колоректального раку у пацієнтів з раннім початком захворювання, а також тестування схильності до нього.

© A. NIKOLIC, J. DESPOTOVIC, T. BABIC, J. ANTIC, S. MARKOVIC, Z. KRIVOKAPIC, D. RADOJKOVIC, 2022

**Ключові слова:** колоректальний рак, ранній початок захворювання, генетичне тестування, патогенетичний варіант, SMAD4.

#### REFERENCES

- Bessa X, Alenda C, Paya A et al. (2011) Validation microsatellite path score in a population-based cohort of patients with colorectal cancer *J Clin Oncol* 29:3374–3380. doi: 10.1200/JCO.2010.34.3947
- Bonfiglio S, Vanni I, Rossella V et al. (2016) Performance comparison of two commercial human whole-exome capture systems on formalin-fixed paraffin-embedded lung adenocarcinoma samples *BMC Cancer* 16:692. doi: 10.1186/s12885-016-2720-4
- Chang YC, Chang JG, Liu TC et al. (2016) Mutation analysis of 13 driver genes of colorectal cancer-related pathways in Taiwanese patients *World J Gastroenterol* 22:2314–2325. doi: 10.3748/wjg.v22.i7.2314
- De Bosscher K, Hill CS, Nicol6s FJ. (2004) Molecular and functional consequences of Smad4 C-terminal missense mutations in colorectal tumour cells *Biochem J* 379:209–216. doi: 10.1042/BJ20031886
- Gallione CJ, Repetto GM, Legius E et al. (2004) A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet* 363:852–859. doi:10.1016/S0140-6736(04)15732-2
- Gallione CJ, Richards JA, Letteboer TG et al. (2006) SMAD4 mutations found in unselected HHT patients *J Med Genet* 43:793–797. doi: 10.1136/jmg.2006.041517
- Houlston R, Bevan S, Williams A et al. (1998) Mutations in DPC4 (SMAD4) cause juvenile polyposis syndrome, but only account for a minority of cases *Hum Mol Genet* 7:1907–1912. doi: 10.1093/hmg/7.12.1907
- Howe JR, Sayed MG, Ahmed AF et al. (2004) The prevalence of MADH4 and BMPR1A mutations in juvenile polyposis and absence of BMPR2, BMPR1B, and ACVR1 mutations *J Med Genet* 41:484–491. doi: 10.1136/jmg.2004.018598
- Huang D, Sun W, Zhou Y et al. (2018) Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis *Cancer Metastasis Rev* 37:173–187. doi: 10.1007/s10555-017-9726-5
- McCarthy AJ, Chetty R. (2018) Smad4/DPC4 *J Clin Pathol* 71:661–664. doi: 10.1136/jclinpath-2018-205095
- Miyaki M, Kuroki T. (2003) Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer *Biochem Biophys Res Commun* 306:799–804. doi: 10.1016/s0006-291x(03)01066-0
- Nikolic A, Kojic S, Knezevic S et al. (2011) Structural and functional analysis of SMAD4 gene promoter in malignant pancreatic and colorectal tissues: detection of two novel polymorphic nucleotide repeats *Cancer Epidemiol* 35:265–271. doi: 10.1016/j.canep.2010.10.002
- Perea J, García-Nebreda M, Hidalgo M et al. (2010) SMAD4 in early onset colorectal cancer *Colorectal Dis* 12:948. doi: 10.1111/j.1463-1318.2010.02296.x
- Royce SG, Alsop K, Haydon A et al. (2010) The role of SMAD4 in early-onset colorectal cancer *Colorectal Dis* 12:213–219. doi:10.1111/j.1463-1318.2009.01779.x
- Schwenter F, Faughnan ME, Gradinger AB et al. (2012) Juvenile polyposis, hereditary hemorrhagic telangiectasia, and early onset colorectal cancer in patients with SMAD4 mutation *J Gastroenterol* 47:795–804. doi:10.1007/s00535-012-0545-8
- Shi Y, Hata A, Lo RS et al. (1997) A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4 *Nature* 388:87–93. doi: 10.1038/40431
- Venook AP. (2017) Right-sided vs left-sided colorectal cancer *Clin Adv Hematol Oncol* 15:22–24
- Yang G, Yang X. (2010) Smad4-mediated TGF-beta signaling in tumorigenesis *Int J Biol Sci* 6:1–8. doi: 10.7150/ijbs.6.1
- Zhao M, Mishra L, Deng CX (2018) The role of TGF-β/SMAD4 signaling in cancer *Int J Biol Sci* 14:111–123. doi:10.7150/ijbs.23230

Received September 30, 2020

Received February 19, 2021

Accepted May 18, 2022