

Ekspresja genów receptorów melatoninowych i genów związanych z regulacją ich aktywności w gruczolakoraku endometrium

Expression of melatonin receptors genes and genes associated with regulation of their activity in endometrial cancer

Andrzej Witek¹, Agnieszka Jęda¹, Michał Baliś¹, Joanna Orchel², Bartosz Sikora², Aleksandra Skubis², Justyna Szota-Czyż², Tomasz Janikowski², Urszula Mazurek²

¹ Katedra i Klinika Ginekologii i Położnictwa, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice, Polska

² Katedra i Zakład Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice, Polska

Streszczenie

Cel pracy: Celem pracy była ocena aktywności transkrypcyjnej genów kodujących receptory melatoninowe oraz genów zaangażowanych w ich regulację w gruczolakoraku endometrium pod kątem poszukiwania molekularnych markerów diagnostycznych i prognostycznych tego nowotworu.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiły wycinki gruczolakoraka endometrium typu endometrioidalnego w stopniu histologicznego zróżnicowania G1, G2, G3 oraz endometrium prawidłowego. Badania molekularne wykonano u 37 kobiet. Po izolacji RNA z tkanek techniką mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133A (Affymetrix) spośród 22 283 ID mRNA wyznaczono profil stężenia mRNA genów związanych z aktywnością receptorów melatoninowych. Metodą qRT-PCR oceniono zmiany aktywności transkrypcyjnej genów receptorów melatoninowych w wycinkach gruczolakoraka w porównaniu do endometrium prawidłowego.

Wyniki: Analiza transkryptomów metodą mikromacierzy ekspresyjnych (Affymetrix) pozwoliła na wytypowanie 18 ID mRNA dla genów związanych z aktywnością receptorów melatoninowych różnicujących raka endometrium od kontroli, przy założeniu, że wartość $p < 0,05$ oraz $FC(\log_2) > 1,5$. Wśród genów specyficznie różnicujących raka są: w stopniu G2- ASMTL, GNA11, PER2, PTGDS oraz w stopnia G3- GNA12, GNA11. Wyciszenie genu kodującego białko RGS4, regulujące czas i nasilenie przekazywania sygnału przy udziale białka G (negatywnego regulatora) obserwowano we wszystkich wycinkach raka, niezależnie od stopnia zróżnicowania histologicznego.

Adres do korespondencji:

Agnieszka Jęda
Katedra i Klinika Ginekologii i Położnictwa, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice
Polska, Katowice, ul. Medyków 14
Tel./fax.: +48 32 7894731-752
e-mail: ajeda@mp.pl

Otrzymano: 07.09.2014
Zaakceptowano do druku: 14.12.2014

Andrzej Witek, et al. Ekspresja genów receptorów melatoninowych i genów związanych z regulacją ich aktywności w gruczolakoraku endometrium.

Wnioski: Profil stężenia mRNA genów uczestniczących w regulacji aktywności biologicznej receptorów melatoninowych zależy od stopnia zróżnicowania histologicznego gruczolakoraka endometrium i może stanowić uzupełniający marker diagnostyczny i prognostyczny raka endometrium. Istotnie statystycznie obniżenie ekspresji genów zaangażowanych w proces biosyntezy melatoniny (ASMTL) oraz genów kodujących białka związane z transdukcją sygnału receptorów melatoninowych (GNA11, GNA12, RTGS4, HTR2B i GNRH2), mogą stanowić obiecujące ogniwo w podjęciu nowych terapeutycznych rozwiązań w leczeniu gruczolakoraka endometrium.

Słowa kluczowe: **melatonina / receptory melatoninowe / gruczolakorak endometrium / nowotwory estrogenozależne / estrogeny /**

Abstract

Objectives: The aim of the study was to evaluate transcription activity of melatonin receptors and genes associated with regulation of their activity in endometrial adenocarcinoma to identify probable diagnostic and prognostic molecular markers.

Material and methods: The material included endometrial adenocarcinoma tissue samples of histopathological grades G1, G2, G3, and normal endometrium. The molecular analysis was performed on 37 patient samples. Total RNA was extracted and used for the microarray HG-U133A analysis. Among 22 283 ID mRNA, only entities of genes associated with regulation of melatonin receptors activity were selected. qRT-PCR was employed for validation, what allowed to compare melatonin receptor genes activation in endometrial cancer tissues to the normal endometrium.

Results: The results of the microarray experiments showed that only 18 ID mRNA were differential in endometrial cancer samples as compared to the control at $p\text{-value} < 0.05$ and $FC(\log_2) > 1.5$. These genes were identified as differentially expressed in grade G2- ASMTL, GNA11, PER2, PTGDS and in grade G3- GNAI2, GNA11. Silencing of RGS4 encoding RGP4, which regulates signal transmission by G protein, was observed in all cancer groups, independently of the histopathological grade.

Conclusions: The profile expression of genes associated with regulation of melatonin receptors activity was different and dependent on the histopathological grade of endometrial cancer and can be an additional diagnostic and prognostic marker. Statistically significant was the down-regulation of melatonin biosynthesis genes (ASMTL) and melatonin signal transmitters (GNA11, GNA12, RTGS)

Key words: **melatonin / melatonin receptors / endometrial adenocarcinoma / estrogen-dependent malignancies / estrogens /**

Wstęp

Rola estrogenów, jako znaczącego czynnika w etiologii gruczolakoraka endometrium, jest znana od wielu lat [1]. Ta zależność między estrogenami, których działanie nie zostało zrównoważone progestagenami a rakiem endometrium jest najpełniej udokumentowana [1]. Estrogeny pełnią istotną rolę w kancerogenezie poprzez zwiększenie proliferacji komórek (pośredni efekt kancerogeny) i mutagenne działanie samych estrogenów (bezpośredni efekt kancerogeny). Wiedza o molekularnych mechanizmach kontroli sygnalizacji estrogenowej pogłębiła się dzięki nowoczesnym technikom badawczym, ale nadal pozostaje kwestią otwartą.

W związku z danymi literaturowymi na temat właściwości antyproliferacyjnych melatoniny w liniach ludzkich komórek nowotworu piersi oraz w oparciu o wyniki eksperymentu wykazującego, że melatonina blokuje proliferację komórek MCF-7 indukowanych estrogenami powstała hipoteza, zgodnie z którą właściwości onkostatyczne melatoniny mają związek ze szlakiem odpowiedzi komórkowej na estrogeny [3]. Szereg publikacji wskazuje na prawdopodobne antyestrogenowe właściwości melatoniny i możliwość wykorzystania tego hormonu jako substancji hamującej proliferacyjne i inwazyjne predyspozycje komórek zależnych od hormonów [4].

Melatonina (5-metoksy-N-acetylotrypamina), podstawowy hormon wytwarzany głównie przez szyszynkę, jest nazywana wielofunkcyjnym „hormonem ciemności” [5]. Pełni rolę koordynatora rytmów biologicznych, przekazując organizmowi informację o porze dnia (rola biochemicznego zegara) i spodziewanej porze roku (rola biochemicznego kalendarza) [6]. Badania przeprowadzone na linii komórek neuronów podwzgórzowych GT1-7 wykazały, że melatonina reguluje ekspresję genu kodującego hormon GnRH [7]. Potwierdzono również silny związek melatoniny z układem płciowym poprzez obecność receptorów melatoninowych w komórkach gonad oraz występowanie receptorów estrogenowych w pinealocytach [2, 8].

Działanie melatoniny jest związane z bezpośrednim oddziaływaniem tego hormonu z błonowymi receptorami melatoninowymi, aktywacją receptorów jądrowych należących do podrodziny ROR/RZR (ang. *Retinoid Orphan Receptors/ Retinoid Z Receptors*) oraz na drodze niereceptorowej [9]. Zidentyfikowano dwa typy błonowych receptorów melatoniny MT1 i MT2, zaklasyfikowane do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G (nadrodzina GPCR). Wśród receptorów MT1 wyróżniono dodatkowo trzy podtypy receptorów: MT1A, MT1B i MT1C [10]. Za pośrednictwem podjednostki α białka G receptory MT1 hamują aktywność cykazy adenylowej, zmniejszają ilość wyprodukowanego w komórce cAMP i regulują aktywność wybranych kinaz

Andrzej Witek, et al. *Ekspresja genów receptorów melatoninowych i genów związanych z regulacją ich aktywności w gruczolakoraku endometrium.*

białkowych (PKC, PKA, MAPK). W konsekwencji dochodzi do zmiany poziomu ufosforylowania czynników transkrypcyjnych CREB (ang. *cAMP Response Element-Binding*) i ekspresji specyficznych genów kodujących białka biorące udział w procesie proliferacji, angiogenezy, różnicowania i migracji komórek. Poprzez te mechanizmy melatonina wywiera działanie hamujące proliferację komórek, a także bierze udział w regulacji ekspresji wielu genów, co leży u podstaw jej onkostatycznego działania [11].

Działanie melatoniny na szlak transdukcji sygnału estrogenów oraz rozwój nowotworów estrogenozależnych można wyjaśnić wskazując kilka mechanizmów: pośredni przez negatywną regulację osi podwzgórze-przysadka-gonady, co prowadzi do obniżenia poziomu krążących endogennych estrogenów, bezpośredni jako selektywny modulator receptorów estrogenowych (SERM ang. *Selective Estrogen Receptor Modulator*) lub jako selektywny modulator enzymów metabolizmu estrogenów (SEEM ang. *Selective Estrogen Enzyme Modulator*) [4]. W każdej z przedstawionych dróg działania melatoniny istnieją dowody wskazujące na wzajemne zależności szlaków sygnałowych melatoniny i estrogenów w nowotworach estrogenozależnych. Prawdopodobnie wzajemne oddziaływania pomiędzy drogami przekazu sygnału estrogenowego i melatoninowego opierają się na przeciwstawnej modulacji stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP oraz na wpływie melatoniny na wewnątrzkomórkowy kompleks kalmoduliny z wapniem (Ca²⁺/CaM) [12].

Obiecujące wyniki eksperymentów nad hormonozależnymi rakami stały się przesłanką do podjęcia badań nad rolą melatoniny w gruczolakoraku endometrium. Wiedza ta może zostać wykorzystana do skonstruowania leków o ukierunkowanych mechanizmach działających na określone szlaki metaboliczne komórek nowotworowych [13].

Cel pracy

Celem pracy była ocena aktywności transkrypcyjnej genów kodujących receptory melatoninowe oraz genów zaangażowanych w ich regulację w gruczolakoraku endometrium typu endometrioidalnego pod kątem poszukiwania molekularnych markerów diagnostycznych i prognostycznych tego nowotworu.

Materiały i metody

Badaniem objęto grupę 37 kobiet leczonych w Katedrze i Klinice Ginekologii i Położnictwa SUM w Katowicach, u których wykonano operacyjne usunięcie trzonu macicy ze względu na patologię tego narządu. Ocenie patomorfologicznej poddane zostały fragmenty endometrium nieleczonych hormonalnie kobiet, uzyskane w trakcie zabiegu. Do następnego etapu badań włączono chore, których wynik badania patomorfologicznego wykazywał prawidłowe endometrium bądź gruczolakoraka endometrium typu endometrioidalnego. Analizując stopień histologicznego zróżnicowania gruczolakoraka endometrium według kryterium proporcji ilości składnika litego niepłaskonabłonkowego do ilości struktur gruczołowych, stwierdzono 7 przypadków w stopniu G1, 11 w G2 i 5 w G3. Grupę porównawczą stanowiło 14 kobiet, u których stwierdzono prawidłowe endometrium w fazie proliferacyjnej. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (KNW/0022/KB1/87/12).

Po izolacji całkowitego RNA z wycinków endometrium, z zastosowaniem odczynników TRIZOL® (Invitrogen Life Tech-

nologies, Kalifornia, USA), zgodnie z protokołem producenta. RNA oczyszczano zestawem RNease-Free Dnase Set Mini Kit (Qiagen GmbH, Niemcy), a następnie ekstrakty całkowitego RNA poddawano ocenie ilościowej i jakościowej. Otrzymany RNA był matrycą do wyznaczenia transkryptomów, techniką mikromacierzy ekspresyjnych HG-U133A (Affymetrix Inc. Kalifornia, USA) zgodnie z instrukcją producenta i metodą qRT-PCR. Otrzymane wyniki eksperymentu macierzowego normalizowano w programie *RMA* (ang. *Robust Multichip Average*) opartym na przekształceniu logarymicznym wartości sygnału fluorescencji mRNA (log₂), a następnie w programie *Gene Spring 11.5* (Agilent Technologies, CA) wytypowano geny różnicujące wycinki gruczolakoraka endometrium w stopniu zróżnicowania histologicznego G1, G2 i G3 od kontroli, *rozpoczynając od analizy wariacji* jednoczynnikowym testem ANOVA (ang. *analysis of variance*) z poprawką Benjamini-Hochberg oraz testu wielokrotnych porównań *post-hoc* Tukeya również z poprawką Benjamini-Hochberg. Analizę eksperymentu macierzowego zakończono wygenerowaniem diagramu Venna wskazującego specyficzność mRNA w różnicowaniu wycinków gruczolakoraka od kontroli. Walidację eksperymentu macierzowego przeprowadzono metodą qRT-PCR (ang. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) dla mRNA receptorów melatoninowych MTNR1A i MTNR1B oraz kontroli endogennej – genu GAPDH (dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego). Reakcję prowadzono z zastosowaniem detektora sekwencji Opticon™ DNA Engine Sequence Detector (MJ Research, USA). Do analizy wykorzystano zestaw odczynników QuantiTect® Probe RT-PCR Kit (Qiagen Inc., Niemcy) oraz starterów TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA): Hs00195567 dla mRNA MTNR1A; Hs00173794 dla mRNA MTNR1B oraz Hs99999905 dla mRNA GAPDH. Wielkość otrzymanych amplimerów dla MTNR1A, MTNR1B i GAPDH wynosiła odpowiednio 69pz, 85pz i 122pz. Warunki termiczne qRT-PCR: 30 min, temp. 50°C, 10 min., temp. 95°C i 40 cykli (15 sek, temp. 94°C i 1 min, temp. 60°C) i 10 min, temp. 72°C. Względna aktywność transkrypcyjna badanych genów kodujących receptory dla melatoniny w odniesieniu do kontroli endogennej GAPDH była analizowana programem REST 2009 QIAGEN [14]. Program opiera się o algorytm opracowany przez Pfaffla (2002) (test statystyczny *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*®).

Wyniki

Część eksperymentalną pracy wykonano w 2 etapach. W pierwszym etapie przeprowadzono analizę porównawczą transkryptomów wyznaczonych metodą mikromacierzy ekspresyjnych (Affymetrix). Następnie przeprowadzono walidację eksperymentu macierzowego techniką qRT-PCR. Na podstawie bazy danych NetAffx™ spośród 22283 ID mRNA zlokalizowanych na mikromacierzy HG-U133A wytypowano 66 ID mRNA genów receptorów melatoninowych oraz mRNA genów związanych z regulacją aktywności receptorów melatoninowych.

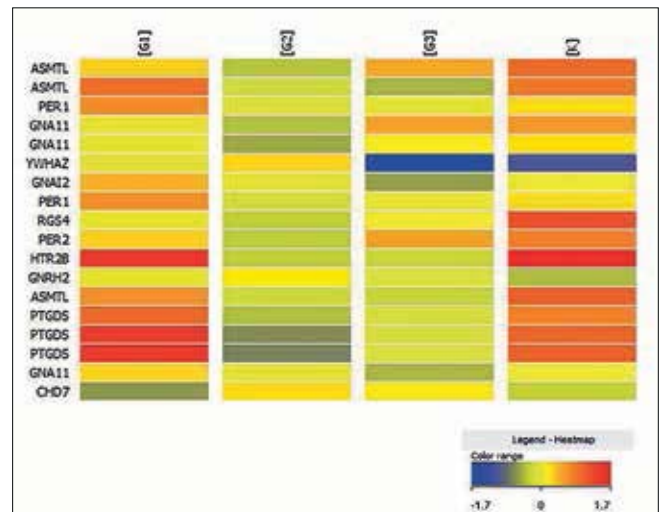
Po akceptacji mikromacierzy do analizy porównawczej, oceniono stopień zróżnicowania pomiędzy grupami transkryptomów gruczolakoraka endometrium w stopniu zróżnicowania histologicznego G1, G2 i G3 od kontroli. Znamienność statystyczną obserwowanych różnic między profilami stężeń mRNA oceniono na podstawie wyników testu jednoczynnikowego ANOVA (ang. *analysis of variance*) oraz testu wielokrotnych porównań

Andrzej Witek, et al. Ekspresja genów receptorów melatoninowych i genów związanych z regulacją ich aktywności w gruczolakoraku endometrium.

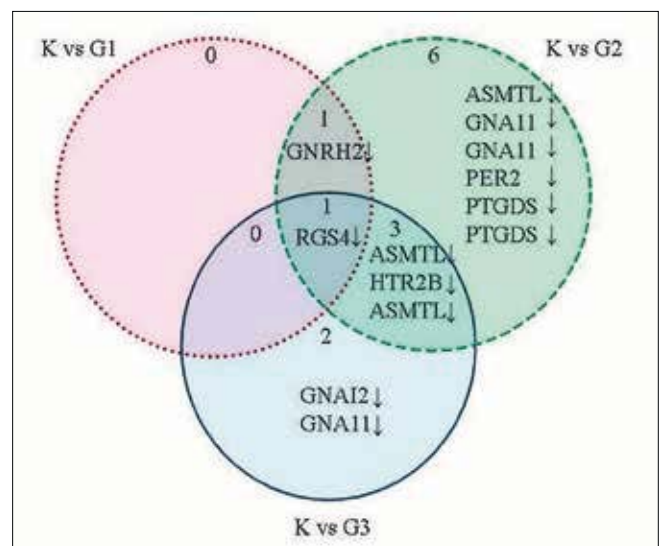
post-hoc Tukeya z poprawką Benjamini-Hochberg (Tabela I) oraz testu wielokrotnych porównań *post-hoc* Tukeya z poprawką Benjamini-Hochberg (Tabela II). Analiza wariancji testem ANOVA z poprawką Benjamini-Hochberg wskazuje, że z grupy 66 ID mRNA związanych z aktywnością receptorów melatoninowych 18 ID mRNA różnicuje porównywane grupy transkryptomów, przy założeniu, że $p < 0,05$ (Tabela I, Rycina 1). Wraz z zaostreniem kryteriów różnicowania grup transkryptomów poprzez obniżanie wartości parametru „p” od wartości $p < 0,02$ do $p < 0,001$ liczba ID mRNA różnicujących zmniejsza się od 17 ID mRNA do 3 ID mRNA (Tabela I).

Dla wytypowanych 18 ID mRNA ($p < 0,05$) w programie Gene Spring wygenerowano „mapy gorąca” obrazujące profil stężenia mRNA charakterystyczny dla każdej z porównywanych grup transkryptomów (Rycina 1). Barwa żółta odpowiada wartości średniej sygnałów fluorescencji mRNA. Natomiast wzrost poziomu mRNA w porównaniu do wartości średniej powoduje zmianę barwy w kierunku czerwieni, a zmniejszenie poziomu mRNA w kierunku barwy granatowej. Otrzymane wyniki wskazują, że profil stężenia mRNA receptorów melatoninowych i mRNA genów uczestniczących w ich aktywności biologicznej zależy od stopnia zróżnicowania histologicznego gruczolakoraka endometrium oraz, że w grupie genów związanych ze ścieżkami sygnałowymi receptorów melatoninowych dominuje tendencja wyciszania aktywności transkrypcyjnej wraz ze wzrostem zróżnicowania histologicznego raka.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę testem wielokrotnych porównań *post-hoc* Tukeya, który zwiększa precyzję analizy porównawczej wskazując liczbę reprezentatywnych ID mRNA różnicujących określoną grupę wycinków gruczolakoraka od kontroli (Tabela II). Otrzymane wyniki wskazują, że z grupy 18 ID mRNA różnicujących wycinki gruczolakoraka od kontroli, wyznaczonych jednoczynnikowym testem ANOVA przy wartości różnicującej $p < 0,05$, dla K vs G1 tylko 2 ID mRNA były statystycznie istotne (GNRH2 i RGS4). Dla K vs G2 – 11 ID mRNA, dla K vs G3- 6 ID mRNA (Tabela II). Poszukując odpowiedzi na pytanie czy wytypowane mRNA różnicujące gruczolakoraka endometrium od kontroli są specyficzne tylko dla jednej z porównywanych grup wycinków raka od kontroli, wygenerowano diagram Venna (ryc.2, tab.III). Otrzymane wyniki wskazują brak specyficznego mRNA różnicującego K vs G1. Natomiast z dwóch wytypowanych mRNA GNRH2 (ang. *Gonadotropin-releasing hormone 2*) różnicuje również wycinki K vs G2 oraz RGS4 (ang. *Regulator of G-Protein Signalling 4*) różnicuje gruczolakoraka endometrium od kontroli, niezależnie od stopnia zaawansowania (Tabela III, Rycina 2). Spośród 11 mRNA różnicujących G2 od kontroli – 6 ID mRNA jest specyficznych tylko dla K vs G2 (Tabela III, Rycina 2). Natomiast 3 mRNA różnicują również K vs G3 (Tabela III, Rycina 2). Są to HTR2B (ang. *5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B, G protein-coupled*) oraz dwie izoformy mRNA ASMTL (ang. *acetylserotonin O-methyltransferase-like*) (Tabela III). Liczba mRNA różnicujących gruczolakoraka endometrium od kontroli K vs G3 jest mniejsza w porównaniu do K vs G2 i wynosi 6 mRNA, w tym tylko 2 mRNA są specyficzne dla K vs G3. Są to geny kodujące białka G : GNA11 i GNA12 (*guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha*) rozpoczynające szlaki *transdukcji sygnału wewnątrzkomórkowego* po aktywacji receptorów melatoninowych (Tabela III).



Rycina 1. Mapy intensywności sygnałów fluorescencji (ang. heatmap) obrazujące stężenie 18 ID mRNA genów związanych z aktywnością melatoniny różnicujących gruczolakoraka endometrium w stopniu G1, G2 i G3 w porównaniu do kontroli K (kolor niebieski - najniższe wartości, kolor czerwony – najwyższe wartości sygnałów fluorescencji).



Rycina 2. Diagram Venna grupujący mRNA wytypowane testem *post-hoc* Tukeya z poprawką Benjamini-Hochberg – po teście jednoczynnikowym ANOVA w zależności od specyficzności różnicowania grup transkryptomów endometrium (dla $p < 0,05$): K vs G1 = 2 mRNA; K vs G2 = 11 mRNA; K vs G3 = 6 mRNA.

Objaśnienia: G1, G2, G3-stopnie histopatologicznego zróżnicowania gruczolakoraka endometrium; K- grupa kontrolna (endometrium prawidłowe); ID- numer identyfikacyjny sondy na mikromacierzy HG-U133A.

Walidację eksperymentu macierzowego, przeprowadzono metodą qRT-PCR. Oceniano różnice w aktywności transkrypcyjnej genów kodujących receptory melatoniny MT1 podtyp A (MTNR1A) i B (MTNR1B) w wycinkach raka endometrium o różnym stopniu złośliwości (G1-G3) w odniesieniu do tkanek endometrium niezmiennego nowotworowo. Stwierdzono wzrost ekspresji genu dla receptora MTNR1B we wszystkich stopniach złośliwości gruczolakoraka, jednakże te zmiany nie wykazały istotnej znamienności statystycznej przy założeniu, że wartość $p < 0,05$.

Andrzej Witek, et al. *Ekspresja genów receptorów melatoninowych i genów związanych z regulacją ich aktywności w gruczolakoraku endometrium.*

Tabela I. Liczba ID mRNA związanych z aktywnością melatoniny różnicujących grupy transkryptomów gruczolakoraka endometrium od endometrium prawidłowego w zależności od kryterium siły różnicowania- wartości p wyznaczonej jednoczynnikowym testem ANOVA z korekcją Benjamini-Hochberg.

p		p<0,05	p<0,02	p<0,01	p<0,005	p<0,001
Liczba ID mRNA	66	18	17	11	8	3

Tabela II. Wynik testu wielokrotnych porównań post-hoc Tukeya wskazujący liczbę ID mRNA różnicujących porównywalne grupy transkryptomów. Kolorem szarym zaznaczono liczbę ID mRNA dla różnicowania grup transkryptomów.

Objaśnienia: G1, G2, G3-stopnie histopatologicznego różnicowania gruczolakoraka endometrium; K- grupa kontrolna (endometrium prawidłowe); ID- numer identyfikacyjny sondy na mikromacierzy HG-U133A.

Grupa transkryptomów	K	G1	G2	G3
K	18	2	11	6
G1	16	18	9	4
G2	7	9	18	5
G3	12	11	13	18

Tabela III. Legenda do diagramu Venna wskazującego specyficzność ID mRNA w różnicowaniu grup transkryptomów G1, G2 i G3 gruczolakoraka endometrium w odniesieniu do kontroli K wyznaczonych na podstawie wariacji ANOVA i testu post-hoc Tukeya z poprawką Benjamini-Hochberg.

Objaśnienia: G1, G2, G3 – stopnie histopatologicznego różnicowania gruczolakoraka endometrium; K – grupa kontrolna (endometrium prawidłowe); ID – numer identyfikacyjny zestawu sond na mikromacierzy komplementarnych do określonego mRNA; ↓ – obniżenie ekspresji.

Grupy porównywalnych transkryptomów	Liczba ID mRNA różnicujących	ID	Symbol genu	Poziom ekspresji
G1 vs K G2 vs K	1	208519_x_at	GNRH2 <i>Gonadotropin-releasing hormone 2</i>	↓
G1 vs K G2 vs K G3 vs K	1	204339_s_at	RGS4 <i>Regulator of G-Protein Signalling 4</i>	↓
G2 vs K	6	36553_at	ASMTL <i>acetylserotonin O-methyltransferase-like</i>	↓
		40562_at	GNA11 <i>guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11</i>	↓
		564_at	GNA11 <i>guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11</i>	↓
		205251_at	PER2 <i>period circadian clock2</i>	↓
		211748_x_at	PTGDS <i>prostaglandin D2 synthase 21kDa</i>	↓
		212187_x_at	PTGDS <i>prostaglandin D2 synthase 21kDa</i>	↓
G3 vs K	2	201040_at	GNAI2 <i>guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 12</i>	↓
		214679_x_at	GNA11 <i>guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11</i>	↓
G2 vs K G3 vs K	3	36554_at	ASMTL <i>acetylserotonin O-methyltransferase-like</i>	↓
		206638_at	HTR2B <i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B, G protein-coupled</i>	↓
		209394_at	ASMTL <i>acetylserotonin O-methyltransferase-like</i>	↓

Tabela IV. Porównanie aktywności transkrypcyjnej receptorów melatoninowych MTNR1A i MTNR1B w wycinkach gruczolakoraka endometrium w odniesieniu do kontroli, gdy wyniki są normalizowane względem GAPDH w programie REST.

Objaśnienia: X = G1, G2 lub G3 – stopnie histopatologicznego zróżnicowania gruczolakoraka endometrium; p – wartość wskazująca siłę różnicowania kopii mRNA; $R=2^{-\Delta\Delta CT}$ – znormalizowana wartość względnego poziomu ekspresji badanego genu względem GAPDH wyliczona w programie REST; ↓ – obniżenie ekspresji; ↑ – wzrost ekspresji.

Stopień zróżnicowania histopatologicznego (X)	Gen	$R=2^{-\Delta\Delta CT}$	p-value	Poziom ekspresji genu X vs K
G1	MTNR1A	1,5	0,89	↑
	MTNR1B	467	0,11	↑
G2	MTNR1A	25	0,37	↑
	MTNR1B	65	0,38	↑
G3	MTNR1A	0,039	0,79	↓
	MTNR1B	1,36	0,96	↑

Wzrost ekspresji receptora MTNR1A zaobserwowano w stopniu G1 i G2, natomiast w stopniu G3 znaczne obniżenie ekspresji i podobnie jak w przypadku zmian poziomu mRNA receptora MTNR1A obserwowane różnice nie były statystycznie istotne (Tabela IV). Wyniki badań otrzymane metodą qRT-PCR potwierdziły wyniki eksperymentu macierzowego.

Dyskusja

Badanie zależności między onkostatycznym działaniem melatoniny a rozwojem nowotworów prowadzone są od lat 70. ubiegłego wieku [15]. Liczne eksperymenty w hodowlach komórkowych miały na celu wytlumaczenie antyproliferacyjnego wpływu melatoniny w komórkach nowotworowych. Istnienie związku między niską syntezą melatoniny przez szyszynkę a wystąpieniem zwiększonego ryzyka zapadalności na raka piersi po raz pierwszy zostało zasugerowane przez badaczy z National Cancer Institute w USA [16]. Hamujące działanie tego hormonu potwierdzono głównie w przypadku komórek raka piersi MCF-7, komórek raka okrężnicy HT-29, ludzkich komórek czerniaka M-6, mysich komórek wątroby HEPA1-6, komórek neuroblastomy SK-N-MC oraz komórek raka prostaty LNCaP [17]. Wiedza na temat wpływu melatoniny na rozwój guzów u człowieka jest ograniczona i niejednoznaczna. O roli tego hormonu w procesie kancerogenezy można wywnioskować pośrednio z danych wskazujących na obniżone stężenie melatoniny w różnych typach nowotworów, np. raku sutka, trzonu macicy, odbytnicy, gruczołu krokowego [18].

Pierwsze rozważania w sprawie udziału melatoniny w patogenezie raka endometrium podjął na początku lat 90. ubiegłego stulecia Sandyk i wsp. [19]. Badacze wskazali na związek obniżonego poziomu melatoniny w okresie okołomenopauzalnym oraz na częstsze występowanie rozrostu endometrium podczas pory jesienno-zimowej (okres obniżonej sekrecji melatoniny). W pracy podkreślono właściwości antyestrogenne melatoniny. W przypadku kobiet chorych na raka endometrium odnotowano sześciokrotnie niższy poziom melatoniny we krwi w porównaniu do grupy kontrolnej. Rozwój gruczolakoraka endometrium związany jest w dużej mierze z ekspozycją na działanie estrogenów.

Dlatego melatonina dzięki swoim właściwościom antyestrogenowym może być efektywnym czynnikiem antynowotworowym. Tym bardziej, że badania dokumentują fakt, iż podanie melatoniny obniża ekspresję mRNA ER- α , i estrogenozależną proliferację [20]. Melatonina działając przez receptor błonowy MT1, hamuje cyklazę adenylową, zmniejszając stężenie cAMP w komórce, co skutkuje zahamowaniem transkrypcji genów receptora estrogenowego ER α .

Antyestrogenowe właściwości melatoniny mogą być związane z kalmomoduliną, która jest modulatorem aktywności transkrypcyjnej receptora estrogenowego. Kalmomodulina oddziałuje z receptorem ER α , co stymuluje jego fosforylację i w ten sposób ułatwia wiązanie estrogenów i kompleksów estrogen-receptor do ERE (ang. *estrogen response element*) na DNA. Melatonina za pośrednictwem receptorów MT1 i związanych z nimi podjednostkami białka G reguluje wewnątrzkomórkowy poziom wapnia, uniemożliwiając prawidłowe funkcjonowanie kalmomoduliny, co prowadzi do hamowania estrogenowej drogi przekazu sygnału wewnątrz komórki [21].

Wyniki naszego badania wykazały zmienną ekspresję genów związanych z regulacją aktywności receptorów melatoninowych w gruczolakoraku endometrium. Interesujące jest to, że dla stopnia G2 genami różnicującym są geny, które wykazują obniżoną ekspresję w komórkach raka i są to GNA11 oraz ASMTL - gen kodujący enzym O-metylotransferazę acetyloserotoniny biorący udział w syntezie melatoniny. Zatem może to sugerować, że istnieje lokalna produkcja tego hormonu w obrębie trzonu macicy, a pośrednio może również potwierdzać potencjalny związek pomiędzy powstawaniem nowotworów hormonozależnych a działaniem melatoniny. Podstawą takiej interpretacji były prace wskazujące, że melatonina w organizmie człowieka wytwarzana jest poza szyszynką, w tkankach, które nie są gruczołami endokrynnymi, np. siatkówce i soczewce oka, gruczole Hardera, komórkach enterochromatofilnych jelita, komórkach przysadki i szpiku kostnego, komórkach układu immunologicznego, regulując funkcję tych tkanek oraz w komórkach przewodu pokarmowego [22, 23, 24]. W błonie śluzowej żołądka, w której jest syntetyzowana w ilościach znacznie przekraczających ilość melatoniny powsta-

Andrzej Witek, et al. *Ekspresja genów receptorów melatoninowych i genów związanych z regulacją ich aktywności w gruczolakoraku endometrium.*

jącej w szyszynce, wywiera działanie ochronne na żołądek [24]. Istotny też jest fakt, że spadek ilości komórek APUD produkujących m.in. melatoninę, jest związany z występowaniem raka okrężnicy [25]. Nie znaleźliśmy informacji, że melatonina jest również syntetyzowana w endometrium. Wyszliśmy z założenia, że zmniejszenie aktywności transkrypcyjnej genu ASMTL związanego z syntezą melatoniny, może sugerować spadek poziomu melatoniny. Podobnie zinterpretowaliśmy zmniejszenie poziomu mRNA GNA11 - zakładając, że zmniejszenie poziomu melatoniny może być powodem zmniejszenia aktywności transkrypcyjnej genu GNA 11 uczestniczącego w transdukcji sygnału receptora melatoninowego do wnętrza komórki.

Inne geny charakterystyczne dla stopnia G2 to geny: PER2 (ang. *period circadian clock 2*) pełniący funkcję regulatora procesu transkrypcji i PTGDS kodujący białka zaangażowane w biosyntezę oraz regulację prostaglandyn. Natomiast dla stopnia G3 stwierdzono obniżenie ekspresji genów GNA11 oraz GNA12, które modulują funkcję białka G i zdolność przyłączania GTP. Białko kodowane przez gen GNA11 wpływa na aktywację kinaz aktywowanych miogenami MAPK (ang. *Mitogen-activated protein kinase*). Genem, który różnicuje gruczolakoraka endometrium niezależnie od stopnia histopatologicznego zróżnicowania od endometrium niezmiennego nowotworowo jest gen RGS4. Odpowiada on za kodowanie proteiny wiążącej białko G, przez co uczestniczy w regulacji aktywności receptorów melatoninowych.

Badania eksperymentalne nad rakiem endometrium wykazały obecność receptorów melatoninowych zarówno 1A, jak i 1B w endometrium [26]. Wykorzystując reakcje qRT-PCR do oceny ekspresji receptorów melatoninowych w różnych stopniach patologicznej złośliwości raka endometrium w naszym badaniu został potwierdzony wzrost aktywności transkrypcyjnej receptorów melatoninowych 1A i 1B korelujący ze wzrostem gradingu, ale zmiany te nie były istotne statystycznie. Wyniki naszego badania mogą sugerować, że wzrost ekspresji receptorów melatoninowych może być reakcją obronną organizmu przed progresją nowotworu. Dane z piśmiennictwa pokazują, że w komórkach raka gruczołu piersiowego zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy stopniem złośliwości i wzrostem ekspresji receptorów MTNR1A i MTNR1B [27]. W linii komórkowej Ishikawa raka endometrium zidentyfikowano mRNA właśnie dla receptora melatoninowego MT1, co koresponduje z naszymi wynikami w komórkach pochodzących z ludzkiego endometrium [23]. Jest to istotne, ponieważ aktywacja receptorów melatoninowych może obniżać ekspresję genów wrażliwych na działanie estrogenów. Podanie melatoniny w fizjologicznym stężeniu 10^{-9} M może powodować obniżenie ekspresji mRNA ER- α , dzięki czemu hormon ten może znosić proliferacyjne działanie estradiolu [26]. Zatrzymanie lokalnej produkcji estrogenów w przypadku nowotworów hormonozależnych może stać się istotne w ich leczeniu.

Melatonina hamuje zarówno aktywność, jak i ekspresję mRNA aromatazy – enzymu przekształcającego prekursor androgenowe w estrogeny [28]. Badania przeprowadzone przez Gonzales i wsp. potwierdzają teorię zaangażowania receptorów melatoninowych MT1 w proces hamowania aromatazy przez melatoninę [29]. Melatonina, obniżając poziom cAMP, za pośrednictwem receptorów MT1 może jednocześnie indukować zmiany w ekspresji aromatazy w tkance nowotworowej, ponieważ ekspresja genu kodującego aromatazę jest zależna od cAMP.

Zjawisko to jest szczególnie istotne w przypadku estrogenozależnych nowotworów prowadząc do zatrzymania samonapędzającej się syntezy estrogenów, a tym samym może skutecznie zapobiegać niepożądaną proliferacji.

Dane dotyczące ekspresji receptorów MT1 oraz genów związanych z regulacją aktywności receptorów melatoninowych w gruczolakoraku endometrium mogą stanowić wstęp do dalszych eksperymentów oraz lepszego poznania ich roli w patogenezie tego nowotworu. Mechanizmy, przez które melatonina hamuje proliferację estrogenozależną, nie są ostatecznie wyjaśnione. Z danych literaturowych wynika, że głównym pośrednikiem w onkostatycznym działaniu melatoniny jest receptor MT1 i właśnie ten receptor był głównym przedmiotem naszego badania. Ocena ekspresji genów kodujących receptory melatoninowe oraz genów towarzyszących biosyntezie i metabolizmowi melatoniny może posłużyć do prognozowania rozwoju nowotworu oraz oceny molekularnej zmian zachodzących w komórkach w trakcie procesu kancerogenezy.

Wnioski

Profil ekspresji genów związanych z aktywnością melatoniny zależy od stopnia zróżnicowania histopatologicznego raka endometrium i może stanowić uzupełniający marker diagnostyczny i prognostyczny raka endometrium. W pracy wykazano istotne obniżenie ekspresji genów zaangażowanych w proces biosyntezy melatoniny (ASMTL) oraz genów kodujących białka związane z transdukcją sygnału receptorów melatoninowych (GNA11, GNA12, RTGS4, HTR2B i GNRH2). Wyniki badania mogą stanowić obiecujące ogniwo w podjęciu nowych terapeutycznych rozwiązań w leczeniu gruczolakoraka endometrium z wykorzystaniem onkostatycznego działania melatoniny.

Oświadczenie autorów:

1. Andrzej Witek – autor koncepcji i założeń pracy, współautor tekstu pracy, analiza i interpretacja wyników, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu, uzyskanie funduszy na realizację badań.
2. Agnieszka Jęda – współautor tekstu pracy, zebranie materiału, analiza i interpretacja wyników badań, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
3. Michał Baliś – zebranie materiału badawczego, przygotowanie piśmiennictwa.
4. Joanna Orchel – współautor tekstu pracy, wykonanie badań molekularnych, opracowanie wyników badań, przechowywanie dokumentacji.
5. Aleksandra Skubis – wykonanie badań molekularnych, opracowanie wyników badań.
6. Bartosz Sikora – wykonanie badań molekularnych, opracowanie wyników badań.
7. Justyna Szota-Czyż – wykonanie badań molekularnych, opracowanie wyników badań.
8. Tomasz Janikowski – wykonanie badań molekularnych, opracowanie wyników badań.
9. Urszula Mazurek – wykonanie badań molekularnych, analiza i opracowanie wyników badań, korekta manuskryptu.

Źródło finansowania:

Praca finansowana ze środków badań statutowych Kliniki Ginekologii i Położnictwa Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach – umowa nr: KNW-1-141/P/2/0.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Andrzej Witek, et al. *Ekspresja genów receptorów melatoninowych i genów związanych z regulacją ich aktywności w gruczolakoraku endometrium.*

K O M U N I K A T

Piśmiennictwo

- Rumianowski B, Laszczyńska M, Brodowska A, [et al.]. Polimorfizm genetyczny kluczowych enzymów szlaku biosyntezy estrogenów u kobiet. *Post Biol Kom.* 2010, 37 (2), 307-322.
- Ito K, Utsunomiya H, Yaegashi N, Sasano H. Biological roles of estrogen and progesterone in human endometrial carcinoma- new developments in potential endocrine therapy for endometrial cancer. *Endocrine J.* 2007, 54 (5), 667-679.
- Hill SM, Spriggs LL, Simon MA, [et al.]. The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer Lett.* 1992, 64 (3), 249-256.
- Cos S, Gonzales A, Martinez-Campa C, [et al.]. Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator. *Curr Cancer Drug Targets.* 2008, 8, 691-702.
- Jabłońska K, Zemła A, Dziegiel P. Rola melatoniny w nowotworach gruczołu piersiowego, jajnika oraz endometrium. *Post Biol Kom.* 2011, 38 (1), 177-194.
- Nowak JZ, Zawilska JB. Melatonina jako koordynator rytmów biologicznych: regulacja biosyntezy, działania fizjologiczne i znaczenie terapeutyczne. *Lęk i Depresja.* 1996, 1, 189-211.
- Roy D, Belsham DD. Melatonin receptor activation regulates GnRH gene expression and secretion in GT1-7 GnRH neurons. Signal transduction mechanisms. *J Biol Chem.* 2002, 277 (1), 251-258.
- Sanchez JJ, Abreu P, Gonzales-Hernandez T, [et al.]. Estrogen modulation of adrenoceptor responsiveness in the female rat pineal gland: differential expression of intracellular estrogen receptors. *J Pineal Res.* 2004, 37 (1), 26-35.
- Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, [et al.]. Melatonin, environmental light and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008, 108 (3), 339-350.
- Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, [et al.]. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol.* 2008, 85, 335-353.
- Di Bella G, Mascia F, Gualano L, Di Bella L. Melatonin anticancer effects: review. *Int J Mol Sci.* 2013, 14 (2), 2410-2430.
- Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ, Tan DX, [et al.]. Basic mechanisms involved in the anticancer effects of melatonin. *Curr Med Chem.* 2010, 17, 4462-4481.
- Grosman-Dziszewski P, Dziegiel P, Zabel M. Zaburzenia ekspresji genów w raku endometrium jako cel terapii. *Ginekol Pol.* 2011, 82, 276-280.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30 (9), e3.
- Bukowska A. Rola melatoniny w procesach antynowotworowych-potencjalne mechanizmy. *Medycyna Pracy.* 2011, 62 (4), 425-434.
- Cohen M, Lippman M, Chabner B. Pineal gland and breast cancer. *Lancet.* 1978, 2 (8104), 1381-1382.
- Danielczyk K, Dziegiel P. MT1 melatonin receptors and their role in the oncogenic action of melatonin. *Post Hig Med Dosw.* 2009, 63, 425-434.
- Chwetałiuk E. Melatonina u ssaków- związek o wielu funkcjach. *Kosmos.* 2008, 57, 93-102.
- Sandyk R, Anastasiadis PG, Anninos PA, Tsagas N. Is the pineal gland involved in the pathogenesis of endometrial carcinoma. *Int J Neurosci.* 1992, 62, 89-96.
- Kiefer T, Ram PT, Yuan L, Hill SM. Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2002, 71, 37-45.
- del Rio B, Garcia-Pedrero JM, Martinez-Campa C, [et al.]. Melatonin: an endogenous specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J Biol Chem.* 2004, 279, 38294-38302.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, [et al.]. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta.* 1999, 1472, 206-214.
- Alarma-Estrany P, Pintor J. Melatonin receptors in the eye, location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacol Ther.* 2007, 113, 507-522.
- Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, [et al.]. Mediator protekcji żołądkowej i gojenia wrzodów - ich rola patofizjologiczna i pomiary Gastroenterologia Polska. 2010, 17 (3), 244-251.
- Zawilska JB, Nowak JZ. Rytmika okołodobowa i zegar biologiczny. *Sen.* 2002, 2 (4), 127-136.
- Watanabe M, Kobayashi Y, Takahashi N, [et al.]. Expression of melatonin receptor (MT1) and interaction between melatonin and estrogen in endometrial cancer cell line. *J Obstet Gynecol Res.* 2008, 34, 567-573.
- Grabińska K, Wróbel M, Mykała-Cieśla J, Wichary H. Przegląd doniesień na temat wpływu melatoniny na patogenezę i terapię raka piersi. *Ann Acad Med Siles.* 2010, 64, 58-69.
- Martinez-Campa C, Gonzales A, Mediavilla MD, [et al.]. Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenase expression and activity in breast cancer cells. *Br J Cancer.* 2009, 101, 1613-1619.
- Gonzales A, Martinez-Campa C, Mediavilla MD, [et al.]. Effects of MT1 melatonin receptor overexpression on the aromatase-suppressive effects of melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2007, 17: 947-953.

International Society of Ultrasound
in Obstetrics & GynecologyEuropean Association
of Perinatal MedicineUltrasound Section of Polish
Society of Gynecology**International Society of Ultrasound
in Obstetrics & Gynecology – ISUOG****European Association of Perinatal Medicine**

oraz

Sekcja USG PTGzapraszają
w dniach **14-16. 05. 2015**

na kurs

**ULTRASOUND
AND CLINICAL DECISIONS**

(prezentacja przypadków „live”, tłumaczenie symultaniczne)

**Pre-kurs w dniu 14.05.2015
ULTRASONOGRAFIA GINEKOLOGICZNA****Wykładowcy:**

Członkowie ISUOG z całej Europy

Kierownik Kursu:MARIUSZ DUBIEL (ISUOG – Polska)
MAREK PIETRYGA (ISUOG – Polska)**Miejsce obrad:**

Toruń, Hotel Bulwar, ul. Bulwar Filadelfijski

Zgłoszenia:**www.regomed.pl**

tel. 663 064 000

**Uczestnicy Kursu otrzymają certyfikat uczestnictwa
International Society of Ultrasound in Obstetrics & Gynecology
– ISUOG**

oraz

30 punktów edukacyjnych USG PTG