

# Profil ekspresji genów związanych z układem histaminergicznym wyznaczony techniką mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133A u kobiet z gruczolakorakiem endometrium

Expression profile of genes associated with the histaminergic system estimated by oligonucleotide microarray analysis HG-U133A in women with endometrial adenocarcinoma

Agnieszka Jęda<sup>1</sup>, Andrzej Witek<sup>1</sup>, Grażyna Janikowska<sup>2</sup>, Grzegorz Cwynar<sup>1</sup>, Tomasz Janikowski<sup>3</sup>, Małgorzata Ciałoń<sup>3</sup>, Joanna Orchel<sup>3</sup>, Urszula Mazurek<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Klinika Ginekologii i Położnictwa, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice, Polska

<sup>2</sup> Zakład Chemii Analitycznej, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice, Polska

<sup>3</sup> Katedra i Zakład Biologii Molekularnej, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice, Polska

## Streszczenie

**Wstęp:** Udział histaminy w patogenezie nowotworów stanowi kontrowersyjny temat, a dokładny mechanizm jej działania nie jest do końca poznany. Wysokie stężenie histaminy zostało stwierdzone w różnych nowotworach, takich jak czerniak, rak piersi, rak jelita grubego oraz w chłoniakach i białaczkach. Dotychczas brak jest danych dotyczących roli histaminy oraz ekspresji genów związanych z aktywnością biologiczną histaminy w gruczolakoraku endometrium.

**Cel pracy:** Celem pracy była analiza porównawcza profilu ekspresji genów związanych z układem histaminergicznym w wycinkach gruczolakoraka endometrium w odniesieniu do tkanek endometrium prawidłowego oraz wytypowanie genów, których aktywność transkrypcyjna istotnie różni się w stopniu G1, G2, G3 gruczolakoraka w porównaniu do grupy kontrolnej.

**Materiał i metody:** Ekstrakcję całkowitego RNA z 24 próbek endometrium przeprowadzono przy użyciu odczynnika TRIzol (Invitrogen). Technika mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133A (Affymetrix) wyznaczyła profil ekspresji 119 transkryptów związanych z układem histaminergicznym. Po normalizacji wyników w programie RMA Express geny różniące typowano na podstawie analizy statystycznej przeprowadzonej w programie Gene Spring 11.5 testem jednoczynnikowej ANOVA oraz testem U Manna-Whitneya.

## Adres do korespondencji:

Agnieszka Jęda  
Katedra i Klinika Ginekologii i Położnictwa, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach  
ul. Medyków 14, 40-752 Katowice, Polska  
tel./fax: +48 32 789 47 31  
email: ajeda@mp.pl

Otrzymano: 12.08.2013  
Zaakceptowano do druku: 30.10.2013

Agnieszka Jęda et al. Profil ekspresji genów związanych z układem histaminergicznym wyznaczony techniką mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133A..

**Wyniki:** Z grupy 119 transkryptów, dla 14 stwierdzono znamiennej statystycznie różnicę ekspresji w endometrioidalnym raku endometrium w porównaniu do prawidłowego endometrium ( $FC(\log_2) > 1,5$ ;  $p < 0,05$ ). Dalsza analiza doprowadziła do identyfikacji genów różnicujących wycinki gruczolakoraka endometrium w stopniu G1, G2 i G3 w porównaniu do grupy kontrolnej, które były specyficzne tylko dla jednej z analizowanej grup raka, a mianowicie dla stopnia G1 (CPA3), dla stopnia G2 (HNMT, LYN, DPT, ITPKB, RASA4, APP, RAB11FIP1, YWHAZ, VAMP8, RAB25) oraz dla stopnia G3 (HRH3).

**Wnioski:** Analiza otrzymanych wyników potwierdziła udział układu histaminergicznego w patogenezie gruczolakoraka endometrium. Zaobserwowane różnice ekspresji genów w zależności od stopnia histopatologicznego zróżnicowania gruczolakoraka mogą wskazywać na istotną rolę wyodrębnionych genów różnicujących w procesie nowotworzenia endometrium.

Słowa kluczowe: **gruczolakorak endometrium / histamina / mikromacierz oligonukleotydowa / receptor H3- histaminowy /**

## Abstract

**Introduction:** Influence of histamine on tumor development remains obscure. The exact mechanism of this action is not known. Different data indicate high concentrations of histamine in tumor tissues, such as malignant melanoma, breast cancer, colon carcinoma, lymphomas and leukemia. To the best of our knowledge, the literature offers no reports about the role of histamine and of differences between expression patterns of histamine-related genes in endometrial cancer.

**Aim:** The aim of the study was a comparative analysis of the gene expression profile involved with histaminergic system in endometrioid endometrial cancer in relation to histologically normal endometrium, and identification of differentiation genes whose transcriptional activity significantly differs in pathomorphological grades G1, G2, G3 of endometrial cancer as compared to the control group.

**Material and methods:** Total RNA was extracted from 24 endometrial probes using TRIzol reagent (Invitrogen). The expression profile of 119 transcripts associated with histaminergic system was assessed using oligonucleotide microarrays of HG-U133A (Affymetrix). After normalization of the results with RMA Express software, differentiation genes were mined by the use of one-way analysis ANOVA and U Mann-Whitney test carried out in Gene Spring 11.5 software.

**Results:** Among 119 transcripts, 14 expressed more than 1.5-fold change and were significant at  $p < 0,05$  in endometrioid endometrial cancer in relation to the normal endometrium. Further analysis led to the identification of differentially expressed genes in grades G1, G2 and G3 of endometrial adenocarcinoma as compared to the control group, which were specific for each of the studied groups in grade G1 (CPA3), in grade G2 (HNMT, LYN, DPT, ITPKB, RASA4, APP, RAB11FIP1, YWHAZ, VAMP8, RAB25) and in grade G3 (HRH3).

**Conclusions:** Our results confirmed the role of the histaminergic system in the pathogenesis of endometrial adenocarcinoma. The observed differences in the expression of those genes, depending on the grade of adenocarcinoma, may indicate an important role of the isolated differentiation genes in endometrial tumorigenesis.

Key words: **endometrial adenocarcinoma / histamine / oligonucleotide microarray / histamine H3 receptor /**

## Wstęp

Trzon macicy to najczęstsza lokalizacja raka w obrębie żeńskich narządów płciowych. W Polsce w 2010 roku zarejestrowano 5125 zachorowań i 1042 zgonów z powodu raka trzonu macicy [1]. Wśród raków endometrium najczęstszy jest rak endometrioidalny (80-90%), czyli pierwotny gruczolakorak endometrium (*Endometrioid Endometrial Cancer*, EEC). Częstość występowania tego typu nowotworu wyraźnie wzrasta wraz z wiekiem. U kobiet w wieku pomenopauzalnym rejestruje się najwięcej zachorowań na gruczolakoraka endometrium. Poza faktem wzrostu liczby kobiet dożywających późnego wieku, zwiększona częstość tego nowotworu wiąże się ze wzrostem stosowania estrogenów w celu łagodzenia dolegliwości i następstw klimakterycznych [2].

Istotnym czynnikiem ryzyka gruczolakoraka endometrium jest także otyłość, często przebiegająca z cukrzycą i nadciśnieniem tętniczym. W związku z tym należy oczekiwać dalszego wzrostu liczby kobiet będących w grupie ryzyka, a więc także tych, które zachorują na raka endometrium.

W raku endometrium nie dysponujemy badaniem skriningowym, tak jak w diagnostyce raka sutka i raka szyjki macicy. Objawy kliniczne tego nowotworu są mało charakterystyczne i pojawiają się stosunkowo późno. Pomimo prowadzenia badań nad podłożem molekularnym choroby, mało jest markerów molekularnych pozwalających na określenie ryzyka choroby, jej diagnozowanie i monitorowanie leczenia.

Podstawą rozpoznania raka endometrium jest analiza histopatologiczna, w której kryteria są nieściśle i często wynikają

Agneszka Jęda et al. Profil ekspresji genów związanych z układem histaminergicznym wyznaczony techniką mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133A...

z subiektywnej interpretacji patologa. Nie wszystkie patomorfologiczne obrazy raka endometrium są diagnostycznie proste. Określenie stopnia histopatologicznego zróżnicowania raka endometrium (*G-grading*), który jest wykładnikiem jego agresywności biologicznej, stanowi ważny i czuły czynnik rokowniczy, wyznaczający sposób postępowania leczniczego. Z tą cechą nowotworu wiąże się szybszy rozwój choroby, wyższa skłonność do tworzenia przerzutów oraz czas całkowitego przeżycia [3]. W badaniu PORTEC (Post-Operative Radiotherapy in Endometrial Cancer) wykazano, że w przypadku nacieku mięśniówki powyżej 50% zmniejsza się znacząco odsetek 5-letnich przeżyć wraz z utratą dojrzałości guza: 91% w G1, 81% w G2, 58% w G3 [4].

Wiedza na temat mechanizmów leżących u podstaw procesu patogenezy gruczolaka endometrium jest wciąż niewystarczająca. Nowotworzenie jest złożonym i wieloetapowym procesem zależnym od wielu czynników. Zgodnie z aktualną koncepcją kancerogenezy proces transformacji nowotworowej nie jest zazwyczaj następstwem uszkodzenia funkcji pojedynczego genu, lecz ich całych zespołów kontrolujących liczne szlaki metaboliczne i regulacyjne w komórce [5].

Histamina jest aminą biogenną, która powstaje w reakcji katalizowanej przez dekarboksylazę histydyny (*HDC-histidine decarboxylase*) i obok innych amin biogennych: serotoniny, dopaminy, norepinefryny i epinefryny wywiera bardzo silne działanie biologiczne. Poza udziałem w reakcjach zapalnych, reguluje procesy fizjologiczne, pełni rolę neuroprzekaznika i ma znaczenie w chemotaksji leukocytów [6]. Reguluje wydzielanie kwasu solnego w żołądku. Histamina jako mediator ma istotny udział w reakcjach alergicznych. Jest środkiem wywołującym skurcz mięśni gładkich, także poza naczyniami krwionośnymi.

W latach 60. XX wieku powstała hipoteza dotycząca udziału histaminy w rozwoju nowotworów [7]. Liczne badania sugerują, że histamina może odgrywać rolę we wzroście tkanek, nasilając proliferację zarówno komórek prawidłowych jak i nowotworowych, chociaż dokładny mechanizm tego działania nie jest poznany [8]. Wysokie stężenie histaminy i zwiększoną aktywność *HDC* stwierdzono w różnych typach nowotworów: w tkankach ludzkiego raka okrężnicy, czerniaka, raka piersi oraz w białaczkach i chłoniakach [9, 10, 11, 12]. Za udziałem histaminy w rozwoju guzów przemawia fakt, że podanie nieodwracalnego inhibitora *HDC*  $\alpha$ -fluorometylohistydyny hamuje rozwój niektórych nowotworów [13]. Fraser i Simpson wykazali udział histaminy w procesie angiogenezy, co ma kluczowe znaczenie w progresji nowotworów [14]. Szczególnie jest podkreślana zdolność histaminy do zwiększania przepuszczalności naczyń, prowadząca do ucieczki białek, np. fibryny. Produkty degradacji fibryny wywierają działanie wzmagające angiogenezę. Sama histamina również wykazuje zdolność stymulowania proliferacji komórek śródbłona oraz indukowania tworzenia nowych naczyń [15].

Histamina wywiera działanie biologiczne poprzez stymulację swoistych, związanych z białkami G, błonowych receptorów histaminowych H1, H2, H3, H4 oraz wewnątrzkomórkowego receptora  $H_c$ , związanego z cytochromem P450 i cytochromem C [16]. Receptory histaminowe różnią się lokalizacją i efektami ich pobudzenia. Przypuszcza się, że receptory histaminowe mogą odgrywać rolę w promocji transformacji nowotworowej ze względu na możliwość aktywacji różnych enzymów [17]. Obecność receptora H3 i H4 została stwierdzona na komórkach raka przewodowego gruczołu piersiowego [18].

Układ histaminergiczny, to nie tylko histamina i receptory histaminowe, ale do tego układu zaliczamy także geny, które kodują białka związane z : transportem i metabolizmem histaminy oraz geny kodujące receptory histaminowe i białka uczestniczące w sygnalizacji komórkowej regulowanej przez histaminę. Analiza układu histaminergicznego na poziomie molekularnym może odpowiedzieć na kluczowe pytanie o rolę histaminy w patogenezie raka endometrium.

## Cel pracy

Celem pracy była analiza porównawcza profilu ekspresji genów związanych z układem histaminergicznym w wycinkach gruczolaka endometrium w odniesieniu do tkanek endometrium prawidłowego oraz wytypowanie genów, których aktywność transkrypcyjna istotnie różni się w stopniu G1, G2, G3 gruczolaka w porównaniu do grupy kontrolnej.

## Materiał i metody

Analizie poddano wycinki z gruczolaka endometrium (*Adenocarcinoma endometrioides*) oraz wycinki tkankowe pobrane z błony śluzowej trzonu macicy od pacjentek, u których nie stwierdzono zmian nowotworowych (K-kontrola).

Materiał do badań pobierany był na sali operacyjnej bezpośrednio po usunięciu trzonu macicy. Rozcięcie trzonu macicy w linii czołowej, od ujścia zewnętrznego kanału szyjki macicy do dna, umożliwiło uwidocznienie jamy macicy. Grupę badaną stanowiły pacjentki z rozpoznaniem endometrioidalnym rakiem endometrium (n=18). Grupę kontrolną (n=6) stanowiły pacjentki zakwalifikowane do leczenia operacyjnego ze względu na takie wskazania, jak: mięśniaki macicy, guzy przydatków oraz wypadanie narządu rodno. Średnia wieku kobiet z rozpoznaniem endometrium niezmiennego nowotworowo wynosiła 51,4 lata ( $\pm 7,8$ ), zakres 41 do 74 lat. W grupie z rozpoznaniem gruczolakiem endometrium średnia wieku wynosiła 60,4 roku ( $\pm 8,6$ ), chore te pozostawały w zakresie wieku od 47 do 80 lat. Zgodę na oznaczenie ekspresji genów w badanym materiale wydała Komisja Bioetyczna Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (KNW/022/KB1/66/13).

Analizę molekularną rozpoczęto od ekstrakcji całkowitego RNA z badanego materiału przy użyciu odczynnika TRIzol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), zgodnie z instrukcją producenta i oczyszczonego przez trawienie DNazą I (deoksyrybonukleazą I) na kolumnach zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Ocenę jakościową ekstraktów przeprowadzono metodą elektroforezy agarowej, a ilościowo techniką spektrofotometrii przy użyciu spektrofotometru Gene Quant II (Pharmacia Biotech, Cambridge, UK).

Około 8  $\mu$ g całkowitego RNA wykorzystano do syntezy dwuniciowego DNA przy użyciu zestawu Invitrogen SuperScript Choice System (Gibco BRL SuperScript Life Technologies). Stanowił on matrycę do syntezy biotynylowanego cRNA z zastosowaniem zestawu BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Life Science, NY). Wyznakowany biotyną cRNA oczyszczano na kolumnach RNeasy Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden Germany), poddano fragmentacji i hybrydyzacji z mikromacierzą Human Genome Arrays HG-U133A (Affymetrix, Santa Clara, CA). Zhybrydowany z mikromacierzą cRNA poddano znakowaniu kompleksem streptawidyna-fikoerytryna. Intensywność sygnałów fluorescencji na płycie odpowiadającą

Agnieszka Jęda et al. Profil ekspresji genów związanych z układem histaminergicznym wyznaczony techniką mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133A..

22283 mRNA odczytano przy użyciu skanera GeneArray Scanner G2500A (Agilent Technologies, CA).

W celu optymalizacji analizy porównawczej grup mikromacierzy przeprowadzono normalizację wyników w programie RMA Express, sprawdzono poprawność wykonania mikromacierzy na podstawie analizy współczynnika 3'/5', kontroli hybrydizacji mRNA z mikromacierzą oraz porównania stopnia rozproszenia sygnałów fluorescencji w grupach transkryptomów. Po zakwalifikowaniu mikromacierzy do dalszej analizy, na podstawie bazy danych NetAffx™ firmy Affymetrix oraz danych literaturowych wyszukano numery (tzw. ID) genów związanych z układem histaminergicznym obecne na płycie HG-U133A. Następnie na podstawie analiz statystycznych przeprowadzonych przy użyciu programu Gene Spring 11.5 (Agilent Technologies, CA) typowano geny różnicujące tkankę nowotworową od prawidłowej. Do oceny genów różnicujących użyto nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya. Za statystycznie istotne przyjmowano wyniki charakteryzujące się wartością  $p < 0.05$  oraz parametru FC ( $\log_2$ )  $> 1.5$  (ang. *fold change* – wskazujący  $\log_2$  wielokrotności różnicy sygnałów fluorescencji pomiędzy badanymi a kontrolnymi transkryptomami).

## Wyniki

Przeprowadzona normalizacja wyników w programie RMA Express przekształca otrzymane sygnały fluorescencji do wartości zlogarytmowanych ( $\log_2$ ) przy podstawie 2, co daje możliwość ich oceny i porównania profilu stężeń wszystkich transkryptów oznaczanych na 24 mikromacierzach HG-U133A oraz eliminuje różnice w intensywności fluorescencji pomiędzy analizowanymi mikromacierzami wynikającymi z różnego czasu przeprowadzenia eksperymentu, czy też różnic związanych z poziomem tła fluorescencji danej mikromacierzy. Spośród 22283 transkryptów, których aktywność transkrypcyjną można analizować z zastosowaniem mikromacierzy oligonukleotydowej HG-U133A wyselekcjonowano 119 ID genów związanych z układem histaminergicznym.

W dalszej analizie wytypowano liczbę transkryptów różnicujących transkryptomy z badanymi wycinków dla poszczegól-

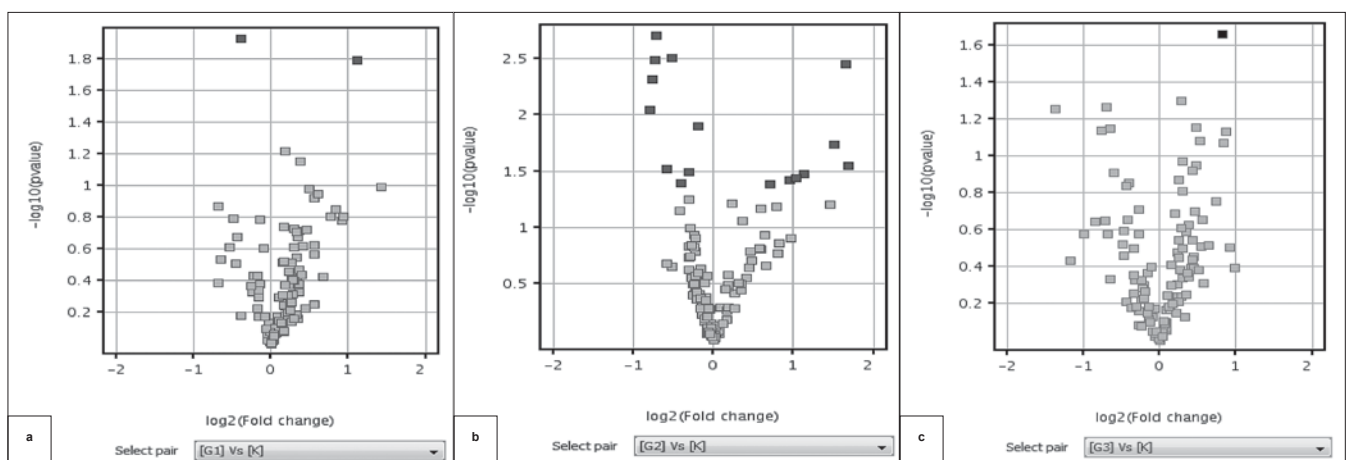
nych stopni dojrzałości gruczolakoraka endometrium i kontroli w zależności od wartości  $p$ , świadczącej o sile różnicowania i wartości wielokrotności zmian w stosunku do kontroli, do czego posłużyła analiza wykresu wulkanicznego przedstawiona na rycinie I. Zwiększając kryterium określające siłę różnicowania transkryptomów od  $p < 0,05$  do  $p < 0,005$  obserwowano stopniowe zmniejszenie liczby kopii mRNA różnicujących próby (Tabela I).

W dalszym etapie badań przeprowadzono porównanie transkryptów gruczolakoraka endometrium z kontrolą testem nieparametrycznym U Manna-Whitneya. Otrzymano istotne statystycznie wyniki dla 2, 16 i 1 mRNA różnicujących odpowiednio G1 vs K, G2 vs K i G3 vs K. (Tabela II).

W tabeli II przedstawiono transkrypty różnicujące poszczególne grupy przy założeniu, że wartość  $p$ -value  $< 0,05$  oraz parametr FC1.1. Zaznaczono kierunki obserwowanych zmian, a mianowicie wyciszenie genu, czyli redukcję sygnału fluorescencji oraz nadekspresję, czyli wzrost tego sygnału dla badanych transkryptów. Wizualizację zmian profilu ekspresji wytypowanych transkryptów w zależności od stopnia zróżnicowania histopatologicznego raka endometrium w stosunku do kontroli obrazują mapy „ciepła” (Rycina II), w których barwa żółta odpowiada średniej aktywności transkrypcyjnej genu. Aktywność większa od średniej zmienia się w kierunku barwy czerwonej, a aktywność mniejsza od średniej w kierunku barwy niebieskiej.

W kolejnym etapie analizy porównawczej poszukiwano odpowiedzi na pytanie, które z genów różnicujących wytypowane testem nieparametrycznym U Manna-Whitneya są charakterystyczne dla poszczególnych stopni histopatologicznego zróżnicowania raka endometrium. Na podstawie diagramu Venna wskazującego specyficzność wytypowanych mRNA stwierdzono, że zmiany ekspresji badanych transkryptów są charakterystyczne tylko dla jednego ze stopni patomorfologicznego zróżnicowania gruczolakoraka endometrium. (Rycina III).

Ostatecznie po dalszej analizie, z grupy 119 transkryptów dla 14 stwierdzono znamiennej statystycznie różnicę ekspresji mRNA przyjmując, że FC ( $\log_2$ )  $> 1,5$ , wartość  $p < 0,05$  w próbkach gruczolakoraka endometrium w porównaniu do prawidłowego endometrium.



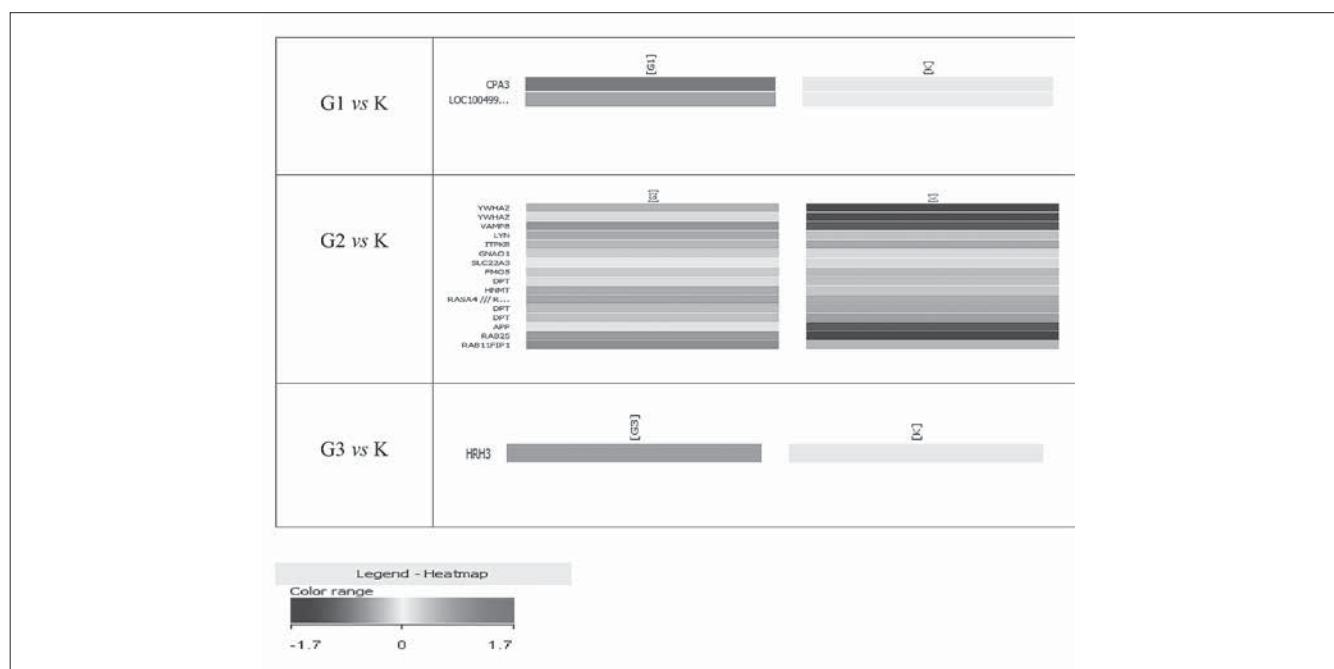
**Rycina 1.** Typowanie genów różnicujących – wykres wulkaniczny (na czerwono zaznaczono transkrypty różnicujące) dla analizy porównawczej, a) G1vs K, b) G2 vs K, c) G3vs K.

Objaśnienia: G1, G2, G3 – stopnie histopatologicznego zróżnicowania raka endometrium; K – grupa kontrolna (endometrium prawidłowe); FC – wartość wskazująca wielokrotność różnicy ( $\log_2$ ) sygnałów fluorescencji pomiędzy transkryptomami grup badanych G1, G2, G3 a kontrolą (K).

**Tabela I.** Liczba kopii mRNA różnicujących transkryptomy gruczolakoraka endometrium w stopniu G1, G2, G3 w porównaniu do endometrium prawidłowego (K) w zależności od wartości FC i p-value.

Grupy badane	Liczba kopii mRNA różnicujących transkryptomy					
	FC	Liczba kopii mRNA	p < 0,05	p < 0,02	p < 0,01	p < 0,005
G1 vs K	FC > 1,0	119	2	2	0	0
	FC > 1,1	79	2	2	0	0
	FC > 1,5	11	1	1	0	0
	FC > 2,0	2	1	1	0	0
G2 vs K	FC > 1,0	119	16	8	6	5
	FC > 1,1	78	16	8	6	5
	FC > 1,5	22	12	2	1	1
	FC > 2,0	6	5	1	1	1
G3 vs K	FC > 1,0	119	1	0	0	0
	FC > 1,1	87	1	0	0	0
	FC > 1,5	18	1	0	0	0
	FC > 2,0	2	0	0	0	0

**Objaśnienia:** G1, G2, G3 – stopnie histopatologicznego zróżnicowania raka endometrium; K- grupa kontrolna (endometrium prawidłowe); p - wartość wskazująca siłę różnicowania kopii mRNA; FC – (ang. *fold change*) wartość wskazująca wielokrotność różnicy ( $\log_2$ ) sygnałów fluorescencji pomiędzy transkryptomami grup badanych G1, G2, G3 a kontrolą (K).



**Rycina 2.** KMapy „ciepła” (ang. heatmap) obrazujące kierunek zmian ekspresji transkryptów w gruczolakoraku endometrium w stopniu histopatologicznego zróżnicowania G1, G2 i G3 w porównaniu do kontroli. (kolor żółty odpowiada wartości średniej sygnału fluorescencji na mikromacierzy, zmiana koloru w kierunku czerwieni – wzrost liczby kopii mRNA, w kierunku koloru niebieskiego – zmniejszenie liczby kopii mRNA).

Objaśnienia: G1, G2, G3 – stopnie histopatologicznego zróżnicowania raka endometrium; K- grupa kontrolna (endometrium prawidłowe).

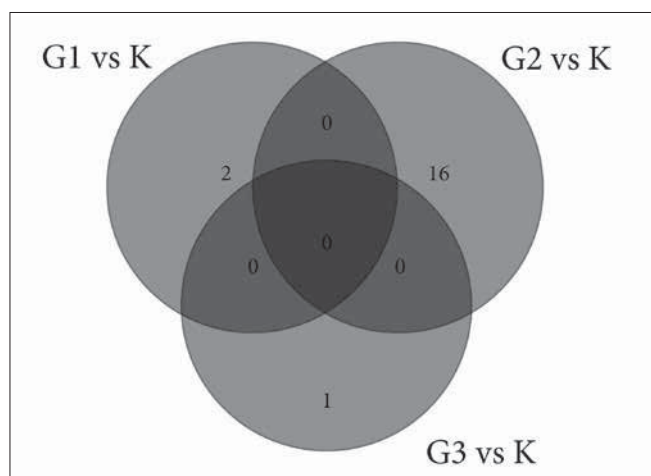


Agnieszka Jęda et al. Profil ekspresji genów związanych z układem histaminergicznym wyznaczony techniką mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133A...

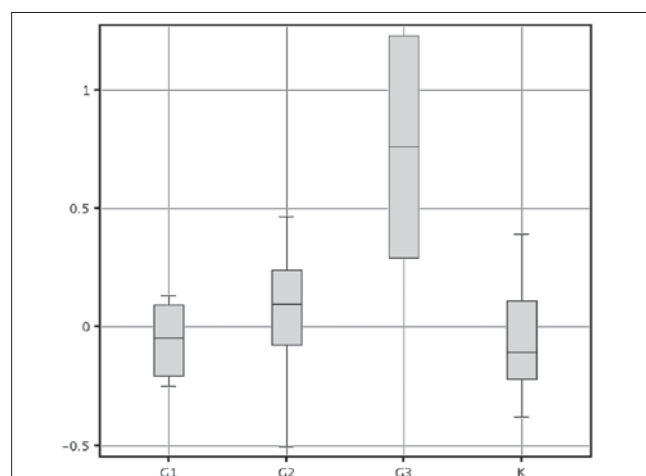
**Tabela II.** Transkrypty różniące gruczolakoraka endometrium w stopniu G1, G2, G3 od endometrium niezmiennego nowotworowo (K) dla  $p < 0.05$ ,  $FC > 1.1$ .

Badane grupy	ID	Symbol genu	p	FC	Zmiana ekspresji	Chromosom
G1 vs K	215009_s_at	LOC100499177	0.01176	1.31859	redukcja	4q21.22
	205624_at	CPA3	0.01627	2.16675	wzrost	3q24
G2 vs K	205421_at	SLC22A3	0.01235	1.14952	redukcja	6q25.3
	204763_s_at	GNAO1	0.03172	1.24273	redukcja	16q13
	207977_s_at	DPT	0.03978	1.32585	redukcja	1q12-q23
	205776_at	FMO5	0.00310	1.43798	redukcja	1q21.1
	211732_x_at	HNMT	0.02977	1.50287	redukcja	2q22.1
	202625_at	LYN	0.04104	1.62461	redukcja	8q13
	213071_at	DPT	0.00193	1.64899	redukcja	1q12-q23
	203723_at	ITPKB	0.00320	1.66066	redukcja	1q42.13
	213071_at	DPT	0.00482	1.70833	redukcja	1q12-q23
	212707_s_at	RASAP4	0.00901	1.74652	redukcja	7q22
	214953_s_at	APP	0.03762	1.93153	wzrost	21q21.3
	219681_s_at	RAB11FIP1	0.03583	2.03632	wzrost	8p11.22
	200640_at	YWHAZ	0.03349	2.18694	wzrost	8q23.1
	202546_at	VAMP8	0.01804	2.83102	wzrost	2p12-p11.2
	218186_at	RAB25	0.00347	3.13212	wzrost	1q22
	200638_s_at	YWHAZ	0.02831	3.20707	wzrost	8q23.1
G3 vs K	221663_x_at	HRH3	0.02179	1.76103	wzrost	20q13.33

**Objaśnienia:** G1, G2, G3 – stopnie histopatologicznego zróżnicowania raka endometrium; K- grupa kontrolna (endometrium prawidłowe); ID - numer identyfikacyjny sondy na mikromacierzy HG-U133A; p - wartość wskazująca siłę różnicowania kopii mRNA; FC – (ang. *fold change*) wartość wskazująca wielokrotność różnicy ( $\log_2$ ) sygnałów fluorescencji pomiędzy transkryptomami grup badanych G1, G2, G3 a kontrolą (K) oraz kierunek obserwowanej zmiany: redukcja - spadek sygnału fluorescencji lub wzrost - zwiększenie sygnału fluorescencji dla danych transkryptów.



**Rycina 3.** Diagram Venna wskazuje brak podobnego profilu ekspresji transkryptów związanych z układem histaminergicznym pomiędzy grupami G1 vs K, G2 vs K oraz G3 vs K. Objasnienia: G1, G2, G3 – stopnie histopatologicznego zróżnicowania raka endometrium; K – grupa kontrolna (endometrium prawidłowe).



**Rycina 4.** Porównanie znormalizowanych wartości intensywności fluorescencji z mikromacierzy HG-U133A dla genu receptora histaminowego (HRH3) w wycinkach gruczolakoraka endometrium w stopniu G1, G2 i G3 oraz endometrium niezmiennym nowotworowo (K).

Agnieszka Jęda et al. Profil ekspresji genów związanych z układem histaminergicznym wyznaczony techniką mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133A...

Wykazano, że transkryptami różnicującymi gruczolakoraka endometrium są geny: dla stopnia G1 (*CPA3*), dla G2 (*HNMT*, *LYN*, *DPT*, *ITPKB*, *RASA4*, *APP*, *RAB11FIP1*, *YWHAZ*, *VAMP8*, *RAB25*) oraz dla G3 (*HRH3*). (Tabela III).

Dla niektórych genów firma Affymetrix oferuje więcej niż jedną sondę na płycie HG-U133A mającą punkty uchwytu w kilku miejscach tej samej sekwencji mRNA. Taka sytuacja ma miejsce dla genu *YWHAZ* i *DPT*. Dodatkowo wraz ze wzrostem dojrzałości histopatologicznej raka endometrium obserwowano wzrost aktywności transkrypcyjnej genu *HRH3* (Rycina IV), lecz znamienność statystyczną obserwowanej różnicy wykazano jedynie dla stopnia histopatologicznego zróżnicowania G3 raka endometrium ( $p=0,02$ ,  $FC=1,76$ )

## Dyskusja

Badanie profilu ekspresji genów z użyciem techniki mikromacierzy oligonukleotydowych pozwala na jednoczesną ocenę dużej ilości genów i określenie ich profilu ekspresji typowego dla danego nowotworu. Największą rolę w badaniach nad biologią molekularną nowotworów odgrywa identyfikacja markerów genetycznych, jakich można użyć do precyzyjnego ustalenia rozpoznania, a następnie możliwości prognozowania przebiegu choroby na podstawie ustalonego profilu genów. Obecnie niewątpliwym ograniczeniem tej techniki badawczej jest koszt mikromacierzy.

Wyniki niniejszego badania wskazują, że profil ekspresji genów związanych z aktywnością histaminy oceniony metodą mikromacierzy ekspresyjnych jest różny w gruczolakoraku endometrium w porównaniu z niezmiennym nowotworowo endometrium. Technika mikromacierzy pozwoliła na otrzymanie nieporównywalnej z innymi metodami informacji na temat ekspresji genów układu histaminergicznego w badanym materiale. Dane uzyskane tą metodą badawczą pozwoliły dokonać oceny, czy transkrypcja danego genu przebiega intensywnie, a więc czy był on aktywny, czy też doszło do zahamowania jego aktywności. Według naszej wiedzy, jest to pierwsze badanie dotyczące aktywności transkrypcyjnej genów związanych z układem histaminergicznym w gruczolakoraku endometrium. Zwiększone stężenie histaminy w tkankach raka endometrium dotychczas opisali w swojej pracy Chanda i wsp. [19].

Analiza otrzymanych wyników potwierdziła udział genów związanych z układem histaminergicznym w patogenezie endometrioidalnego raka endometrium. Ze względu na brak rozkładu normalnego bezpośrednich wyników stosowanych do analizy statystycznej genów różnicujących raka endometrium od prób histopatologicznie określonych jako prawidłowe zastosowano nieparametryczny test U Manna-Whitneya. Jednak ze względu na rozkład normalny w przypadku wyników znormalizowanych posłużono się również testem jednoczynnikowej analizy wariancji do porównania wyodrębnionych genów w poszczególnych grupach (G vs K).

Zaobserwowane różnice ekspresji genów w stopniu G1, G2 i G3 gruczolakoraka endometrium mogą wskazywać na istotną rolę wyodrębnionych genów różnicujących w progresji nowotworu. Rak endometrium w stopniu G1 charakteryzuje wysoka aktywność transkrypcyjna genu kodującego karboksypeptydazę A3 (*CPA3*). W stopniu G2 stwierdzono nadekspresję genu *APP*, *RAB11FIP1*, *YWHAZ*, *VAMP8*, *RAB25*. W przypadku *HNMT*, *LYN*, *DPT*, *ITPKB*, *RASA4* w wycinkach gruczolakoraka endo-

metrium w stopniu G2 zaobserwowano obniżenie aktywności transkrypcyjnej wymienionych genów.

Karboksypeptydaza 3 indukuje mechanizm hiperacetylacji histonów w komórkach raka prostaty [20]. Liczne badania wskazują na rolę białek rodziny Rab w procesie kancerogenezy. Jest to duża rodzina błonowych białek biorących udział w regulacji polaryzacji błony komórkowej komórek nabłonkowych. Nierozerwalnie z inwazyjnością nowotworów nabłonkowych jest związana utrata polaryzacji pojedynczych warstw nabłonka i przyjęcia zachowań migracyjnych komórek, które prowadzą do lokalnie inwazyjnej choroby i przerzutów. Agresywność raka jajnika wiąże się z nadekspresją białek Rab25 [21]. Cheng i wsp. przedstawili wyniki badania, w którym wzrost ekspresji Rab25 korelował ze wzrostem agresywności raka piersi [22].

W obydwu analizach statystycznych danych uzyskanych z mikromacierzy oligonukleotydowych uzyskano także potwierdzenie, że wraz ze wzrostem stopnia histopatologicznego zróżnicowania raka endometrium występuje wzrost aktywności transkrypcyjnej genu *HRH3* (ryc. IV), lecz istotnie statystyczną znamieność obserwowanej różnicy wykazano jedynie dla stopnia G3 (tab. II). Szelaż wykazał udział receptorów H3 –histaminowych w procesach proliferacji komórek nowotworowych [23]. Wzrost ekspresji receptora H3 stwierdzono w raku przewodowym gruczołu piersiowego, co korelowało z inwazyjnością raka i obecnością zmian przerzutowych [24].

Receptor H3-histaminowy należy do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G. Aktywacja receptorów H3 hamuje sygnalizację wewnątrzkomórkową receptorów H1 i H2. Wykazano, że aktywacja receptora H3 prowadzi do zmniejszenia stężenia cAMP w cytoplazmie prowadząc do zablokowania transmisji sygnału z receptora H2 związanego z tym szlakiem. Dodatkowo receptor ten wpływa na fosfolipazę A2, kinazę 3 fosfatydyloinozytolu (PI3K) uniemożliwiając aktywację ekspresji genów przez szlak związany z  $IP_3$ . Na tej podstawie wykazano, że aktywacja receptora H3 ma pośredni wpływ na obniżenie wyrzutu wewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$  i związanej z nim sygnalizacji [25]. W ten sposób dochodzi do zwiększenia znaczenia niekanonicznej sygnalizacji związanej z rodziną białek szlaku Wnt. Powodując zmianę stężenia wewnątrzkomórkowych jonów  $Ca^{2+}$  i aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF-AT dalej stymuluje zmianę ekspresję genów związanych z apoptozą, stanem zapalnym, proliferacją [26].

Dodatkowo receptor H3 funkcjonuje na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego jako autoreceptor, regulując stymulowane uwalnianie i syntezę histaminy oraz jako heteroreceptor regulujący stymulowane uwalnianie innych neuroprzekazników m.in. noradrenaliny, serotoniny czy acetylocholino. W konsekwencji receptor H3 bierze udział w modulacji aktywności układu serotonergicznego, cholinergicznego, noradrenergicznego i dopaminergicznego [25].

Wiedza uzyskana z badań molekularnych nie tylko prowadzi do poznania mechanizmów karcinogenezy, ale także jest niezwykle przydatna w konstruowaniu nowych leków o ściśle ukierunkowanych mechanizmach działających na określone szlaki metaboliczne. W badaniach nad rakiem endometrium obiecujące wyniki daje terapia z zastosowaniem temsirolimusu, zwłaszcza w skojarzeniu z chemioterapią oraz bevacizumabem razem z cyklofosfamidem. Jednak ta terapia celowana powoduje istotne ryzyko powikłań sercowo-naczyniowych [27]. Dlatego duże na-

Agnieszka Jęda et al. Profil ekspresji genów związanych z układem histaminergicznym wyznaczony techniką mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133A...

dzieje wiąże się z poznaniem molekularnej charakterystyki raka endometrium, tworzenia testów stwierdzających zmiany ekspresji danych genów i poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych.

Wyniki tego badania są pierwszym potwierdzającym obecność receptora H3-histaminowego na komórkach gruczolakoraka endometrium, co może sugerować rolę tego receptora w regulacji proliferacji tego nowotworu. Przedstawione dane prezentują z pewnością tylko część mechanizmów zaangażowanych w proces progresji gruczolakoraka endometrium, a niniejsze doniesienie ma charakter badań wstępnych. Potrzebne są dalsze badania w celu dokładnego określenia roli receptora H-3 histaminowego w progresji tego nowotworu, aby miały wartość diagnostyczną i prognostyczną w postępowaniu klinicznym oraz mogły stanowić cel terapeutyczny w personalizacji leczenia.

## Wnioski

Zaobserwowane różnice ekspresji genów związanych z układem histaminergicznym w badanej grupie kobiet z gruczolakorakiem endometrium w stopniu histopatologicznego zróżnicowania G1, G2 i G3 w porównaniu z endometrium ocenionym histopatologicznie jako niezmiennione nowotworowo mogą wskazywać na istotną rolę wyodrębnionych genów różnicujących w patogenezie tego nowotworu. Spośród genów związanych z aktywnością histaminy zwraca uwagę wzrost aktywności transkrypcyjnej receptora histaminowego H3 wraz ze stopniem histopatologicznej dojrzałości raka, co może sugerować rolę receptora H3 w progresji raka endometrium.

*Praca finansowana w ramach zadań służących rozwojowi uczestników studiów doktoranckich Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (KNW-1-076/D/1/0, KNW-1-016/D/2/0)*

## Oświadczenie autorów

1. Agnieszka Jęda – autor koncepcji i założeń pracy, zebranie materiału, analiza i interpretacja wyników, wykonywanie badań laboratoryjnych, opracowanie wyników badań, przechowywanie dokumentacji, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa, uzyskanie funduszy na realizację badań laboratoryjnych - autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Andrzej Witek – współautor tekstu pracy, analiza i interpretacja wyników, korekta, ostateczna weryfikacja i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.
3. Grażyna Janikowska – współautor tekstu pracy, analizy i interpretacji wyników, korekta i aktualizacja literatury.
4. Grzegorz Cwynar – zebranie materiału, przechowywanie dokumentacji.
5. Tomasz Janikowski – wykonanie badań laboratoryjnych, opracowanie wyników badań.
6. Małgorzata Ciałoń – wykonanie badań laboratoryjnych, opracowanie wyników badań.
7. Joanna Orchel – wykonanie badań laboratoryjnych, opracowanie wyników badań.
8. Urszula Mazurek – współautor tekstu pracy, analiza i interpretacja wyników, korekta, ostateczna weryfikacja i akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu.

## Źródło finansowania:

Praca finansowana w ramach zadań służących rozwojowi uczestników studiów doktoranckich Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (KNW-1-076/D/1/0, KNW-1-016/D/2/0).

## Konflikt interesów:

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

## Piśmiennictwo

1. Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce 2010 roku. *Krajowy Rejestr Nowotworów* 2012.
2. Prelevic GM, Jacobs HS. New developments in postmenopausal hormone replacement therapy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1997, 9, 207-212.
3. Markowska J, Pawłowska M. Czynniki prognostyczne i markery nowotworowe w raku endometrium. W: Zarys ginekologii onkologicznej. Red. Markowska J, Mądry R. Poznań: Termedia. 2012, 61-73.
4. Creutzberg CL, van Putten WL, Warlan-Rodenhuise CC, [et al.]. Outcome of high risk stage IC, grade 3, compared with stage I endometrial cancer patients. The Postoperative Radiation Therapy in Endometrial Cancer Trial. *J Clin Oncol*. 2004, 22, 1234-1241.
5. Banyś A, Orchel J, Mazurek U, [et al.]. Aktywność transkrypcyjna genów szlaków sygnalizacyjnych receptora VEGFR-2 w raku szyjki macicy wyznaczona techniką mikromacierzy oligonukleotydowych. *Przeegl Menopauz*. 2009, 2, 72-75.
6. Shahid M, Tripathi T, Sobia F, [et al.]. Histamine, histamine receptors and their role in immunomodulation: an updated systemic review. *Opin Immunol J*. 2009, 2, 9-41.
7. Kahlson G, Rosengren E. New approaches to the physiology of histamine. *Annu Rev Physiol*. 1965, 48: 155-96.
8. Blaya B, Nicolau-Galmes F, Jangi SM, [et al.]. Histamine and histamine receptor antagonists in cancer biology. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2010, 9, 146-157.
9. Cianchi F, Cortesini C, Schiavone N, [et al.]. The role of cyclooxygenase-2 in mediating the effects of histamine on cell proliferation and vascular endothelial growth factor production in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005, 11, 6807-6815.
10. Pos Z, Wiener Z, Poczta P, [et al.]. Histamine suppresses fibulin-5 and insulin-like growth factor-II receptor expression in melanoma. *Cancer Res*. 2008, 68, 1997-2005.
11. von Mach-Szczyński J, Stanosz S, Sieja K, Stanosz M. Metabolism of histamine in tissues of primary ductal breast cancer. *Metabolism*. 2009, 58 (6), 867-870.
12. Yang LP, Perry CM. Histamine dihydrochloride: in the management of acute myeloid leukaemia. *Drugs*. 2011, 71 (1), 109-122.
13. Bartholeyns J, Bouclier M. Involvement of histamine in growth of mouse and rat tumors: antitumoral properties of monofluoromethylhistidine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of histidine decarboxylase. *Cancer Res*. 1984, 44, 639-645.
14. Fraser RA, Simpson JG. Role of mast cells in experimental tumour angiogenesis. *Ciba Foundation Symposium 100*. London: Pitman. 1983, 120-131.
15. Ribatti D, Vacca A, Nico B, [et al.]. The role of mast cells in tumor angiogenesis. *Br J Haematol*. 2001, 115, 1443-1439.
16. Stark H. Histamine receptors. *Biotrend Rev*. 2007, 11, 1-9.
17. Medina VA, Rivera ES. Histamine receptors and cancer pharmacology. *Br J Pharmacol*. 2010, 161, 755-767.
18. Medina VA, Croci M, Crescenti E, [et al.]. The role of histamine in human mammary carcinogenesis: H3 and H4 receptors as potential therapeutic targets for breast cancer treatment. *Cancer Biol Ther*. 2008, 7 (1), 28-35.
19. Chang R, Ganguly AK. Diamine-oxidase activity and tissue di- and poly-amine contents of human ovarian, cervical, and endometrial carcinoma. *Cancer Lett*. 1995, 89, 23-28.
20. Huang H, Reed CP, Zhang JS, [et al.]. Carboxypeptidase A3 (CPA3) : a novel gene highly induced by histone deacetylase inhibitors during differentiation of prostate epithelial cancer cells. *Cancer Res*. 1999, 59, 2981-2988.
21. Chia WJ, Tang BL. Emerging roles for Rab family GTPases in human cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2009, 1795 (2), 110-116.
22. Cheng JM, Volk L, Janaki DK, [et al.]. Tumor suppressor function of Rab25 in triple-negative breast cancer. *Int J Cancer*. 2010, 126 (12), 2799-2812.
23. Szeląg A. Role of histamine H3- receptors in the proliferation of neoplastic cells in vitro. *Med Sci Monit*. 1998, 4, 747-755.
24. Medina VA, Cricco G, Nuñez M, [et al.]. Histamine-mediated signaling process in human malignant mammary cells. *Cancer Biol Ther*. 2006, 5, 1462-1471.
25. Bongers G, Bakker RA, Leurs R. Molecular aspects of the histamine H3 receptors. *Biochem Pharmacol*. 2007, 73, 1195-1204.
26. Hutchins BI, Li L, Kallil K. Wnt/calcium signaling mediates axon growth and guidance in the developing corpus callosum. *Dev Neurobiol*. 2011, 71 (4), 269-283.
27. Grosman-Dziewieszek P, Dziegiel P, Zabel M. Zaburzenia ekspresji genów w raku endometrium jako cel terapii. *Ginekol Pol*. 2011, 82, 276-280.