

Zmniejszona ekspresja genu osteonektyny i fibronektyny w nowotworach *endometrium* – markery rozwoju i przebiegu choroby

Decreased osteonectin and fibronectin gene expression in endometrial cancer as a prognostic marker

Futyma Konrad^{1,2}, Kubiowski Tomasz¹, Różyńska Krystyna³, Zdunek Małgorzata⁴, Kotarski Jan⁵, Rechberger Tomasz², Wojciewski Jacek¹

¹ Katedra Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

² II Katedra i Klinika Ginekologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

³ Samodzielna Pracownia Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁴ Katedra i Zakład Patomorfologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁵ I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Streszczenie

Cel pracy: Celem pracy było zbadanie profilu ekspresji genów kodujących białka macierzy zewnątrzkomórkowej w nowotworach *endometrium* przy pomocy techniki makromacierzy.

Materiał i metody: Ocenie poddano tkanki pobrane w trakcie zabiegu operacyjnego od 40 pacjentek operowanych z powodu raka trzonu macicy oraz 9 pacjentek z powodu mięśniaków. Z uzyskanego materiału tkankowego izolowano RNA, które poddano reakcji odwrotnej transkrypcji. Następnie otrzymane komplementarne DNA (cDNA) znakowano izotopowo oraz użyto do reakcji PCR. Przygotowanie membran oraz proces hybrydyzacji znakowanego cDNA przeprowadzono zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu makromacierzy. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy pomocy sztucznej sieci neuronowej.

Wyniki: W analizie statystycznej otrzymanych wyników porównywano stopień ekspresji genów białek macierzy zewnątrzkomórkowej w tkankach nowotworowych w stosunku do poziomu ekspresji tych genów w prawidłowym *endometrium*. Istotność statystyczną wykazano dla ekspresji genu fibronektyny oraz osteonektyny i w obu przypadkach była ona istotnie statystycznie niższa dla tkanek nowotworowych (odpowiednio $p=0,009$, $p=0,0003$). Dodatkowo wykazano, że ekspresja tych genów malała wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania klinicznego i histologicznego choroby jednak dla tych zależności nie wykazano istotności statystycznej.

Wnioski: Zmniejszenie ekspresji genu osteonektyny i fibronektyny w nowotworach *endometrium* w porównaniu do tkanek prawidłowych wydaje się promować rozwój choroby. Poziom ekspresji tych genów może stanowić również dodatkowe narzędzie w określaniu stopnia zaawansowania choroby oraz przewidywania dalszego jej przebiegu.

Słowa kluczowe: rak trzonu macicy / macierze cDNA / fibronektyna / osteonektyna / białka macierzy zewnątrzkomórkowej /

Adres do korespondencji:

Konrad Futyma

II Katedra i Klinika Ginekologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

20-954 Lublin, ul. Jaczewskiego 8,

Tel: +4881 7244686

e-mail: futymakonrad@mp.pl

Otrzymano: 30.08.2009

Zaakceptowano do druku: 15.11.2009

Abstract

Objectives: The aim of this study was to investigate, by means of cDNA macroarrays, the expression profile of genes coding the ECM proteins in endometrial cancer.

Material and methods: Tissue specimens were collected during surgical procedures. 40 patients were operated due to endometrial cancer and 9 patients because of uterine myomas. RNA was isolated and reverse transcriptase reaction with radioisotope labeling of cDNA were performed. PCR reaction was performed with labeled cDNA. All steps of macroarray hybridization were done according to the protocol. Statistical analysis was done with different tests, including artificial neural network method.

Results: The level of ECM protein genes expression in normal endometrial tissue was compared to the expression of these genes in endometrial cancer specimens. Statistical significances were found only for fibronectin and osteonectin genes and for both genes decreased expression was observed in cancer tissues ($p=0.009$, $p=0.0003$, respectively). Moreover, fibronectin and osteonectin genes expression decreased along with increase of clinical staging and histological grading of the endometrial cancer but no statistical significance for this trend was found.

Conclusions: Decreased expression of fibronectin and osteonectin genes, when compared to normal endometrial tissue expression, in endometrial cancer may play an important role as a stimulus for disease development and, on the other hand, may be used as an additional marker for the progression of the disease.

Key words: **endometrial cancer / cDNA macroarrays / fibronectin / osteonectin / extracellular matrix proteins /**

Wstęp

Postęp genetyki molekularnej związany z ukończeniem sekwencjonowania genomów organizmów żywych, w tym genomu człowieka (*Human Genome Project*), umożliwia prowadzenie kompleksowych analiz ekspresji różnych genów człowieka, zwłaszcza pod kątem ich udziału w procesach chorobowych. Główną techniką służącą analizie profilów genetycznych stały się tzw. mikro- i makromacierze, na których immobilizowane są sondy odpowiadające badanym transkryptom genów organizmu [1–3]. Technologiczne podstawy produkcji macierzy opisano w latach 80 i od tego czasu wachlarz ich zastosowania w diagnostyce chorób poszerza się [3–4]. Macierze DNA to zminiaturyzowany układ hybrydyzacyjny, na który składają się uporządkowane zestawy genów lub części ich fragmentów (tzw. sond molekularnych) w postaci oligonukleotydów lub sekwencji cDNA, unieruchomione na stałym podłożu. Miejsca hybrydyzacji ułożone są w ściśle określonym porządku umożliwiającym identyfikację produktów hybrydyzacji. Coraz częstsze zastosowanie tej metody badawczej jest dowodem, że oznaczanie profilu genetycznego choroby może być pomocne do określania podtypu guza oraz modelu jego zachowania w przebiegu choroby, co nie było możliwe przy wykorzystaniu badania pojedynczych parametrów czy diagnostyki histologicznej [5–7].

Zmiany ekspresji genów mają kluczowe znaczenie w transformacji nowotworowej zdrowych komórek organizmów żywych. Badanie odmienności szlaków metabolicznych wywołanych przez zmianę ekspresji genów, pozwala precyzyjnie określić mechanizmy prowadzące do onkogenezy.

Warunkiem niezbędnym do rozszerzenia się procesu nowotworowego jest nabycie przez komórki nowotworowe fenotypu inwazyjnego. Determinuje on zdolność do przemieszczania się, naciekania otaczających tkanek i tworzenia przerzutów w miejscach odległych od ogniska pierwotnego. W procesie progresji nowotworowej komórki muszą pokonać bariery w postaci błony podstawnej (*basement membrane* – BM), macierzy zewnątrzkomórkowej (*extracellular matrix* – ECM) i ściany naczyń krwionośnych [8, 9].

Jednym z ważniejszych składników macierzy zewnątrzkomórkowej jest fibronektyna, która pełni rolę spoiwa pomiędzy architektonicznym szkieletem tkanki i jej komórkami poprzez odpowiednie receptory powierzchniowe. Jest to proteina składająca się z dwóch łańcuchów o masie 270 kDa każdy, połączonych mostkiem dwusiarczkowym na jednym z końców [10]. Fibronektyna składa się z rdzenia utworzonego przez trzy mniejsze cząsteczki (I, II i III) tworzące strukturę pierwszorzędową, do której dołączają się inne elementy odpowiedzialne za oddziaływanie z heparyną, kolagenem oraz receptorami zlokalizowanymi na powierzchni komórek. Białko to pełni wiele funkcji związanych z odpowiedzią immunologiczną, gojeniem ran, włóknieniem, tworzeniem naczyń krwionośnych oraz embriogenezą [11, 12].

Innym ważnym białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej jest osteonektyna, glikoproteina o masie 43 kDa, znana również pod nazwą SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*), która należy do niekolagenowych składników macierzy zewnątrzkomórkowej i odpowiedzialna jest za procesy mineralizacji tkanek, dzięki zdolności do wiązania jonów wapnia. Moduluje ona interakcje zachodzące pomiędzy poszczególnymi elementami macierzy w procesie morfogenezy i różnicowania [13, 14]. Jest również czynnikiem wpływającym na dynamikę procesu degradacji składników błony podstawnej i mięszu tkanki łącznej poprzez stymulację metaloproteinaz [15]. Ponadto wpływa na kształt komórek śródbłonkowych i uczestniczy w procesach neoangiogenezy oraz transformacji nowotworowej [16, 17].

Dlatego też uważa się, że osteonektyna pełni kluczową rolę w tworzeniu nacieku nowotworowego i przerzutowaniu nowotworów [18]. Ekspresję osteonektyny obserwuje się głównie w tkankach, które podlegają ciągłej przemianie i dynamicznej odbudowie: m.in. w chrząstce, kości, śródbłonku przewodu pokarmowego i naczyń krwionośnych oraz skórze [19]. Znacznie zwiększoną ekspresję tego białka zaobserwowano w komórkach i tkankach zaangażowanych w procesy naprawcze związane z gojeniem się ran oraz w tkankach nowotworowych [20].

Inni badacze wykazali, że osteonektyna powoduje wzrost aktywności metaloproteinazy – 2 (MMP-2) w ludzkich tkankach nowotworowych zwiększając ich zdolność do naciekania

zdrowych tkanek oraz umożliwiając w ten sposób łatwiejszy rozrost intensywnie rozwijającej się sieci patologicznych naczyń krwionośnych [13, 21, 22]. Różnorodność funkcji jakie pełni to białko powoduje, że konieczne są dalsze badania w celu ustalenia jego przydatności w leczeniu chorób cywilizacyjnych, w tym nowotworów.

Rak trzonu macicy jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych występującym u kobiet i w Polsce, według Krajowego Rejestru Nowotworów, w 2006 roku na ten nowotwór zachorowało 4376 kobiet (<http://85.128.14.124/krm>). W związku z cywilizacyjnymi czynnikami ryzyka, predysponującymi do rozwoju tej choroby, zachorowalność na ten typ nowotworu systematycznie rośnie [23].

Genetyczne podstawy przyczyn rozwoju nowotworów *endometrium* są systematycznie badane i obecnie znanych jest kilka mutacji genów białek biorących udział w procesach komunikacji i tworzenia wiązań międzykomórkowych. W chwili obecnej za najczęściej zmutowany gen w nowotworach trzonu macicy uznawany jest PTEN, biorący udział w kontroli apoptozy i migracji komórek [24, 25]. W wielu badaniach ujawniono, że nawet do 83% nowotworów endometrioidalnych charakteryzuje się utratą ekspresji genu PTEN [26]. Kolejną pod względem częstości występowania jest mutacja w kodonie 12 protoonkogenu K-ras (*Kirsten rat sarkoma 2 viral oncogene homolog*), występującą w około 30% nowotworów I grupy. Mutacją, która występuje z podobną częstotliwością jest mutacja β -kateniny.

W większości przeprowadzonych i opublikowanych do tej pory pracach dotyczących ekspresji genów w nowotworach *endometrium*, koncentrowano się głównie na zmianie ekspresji pojedynczych genów [24, 27].

Istotnym składnikiem środowiska toczącej się choroby nowotworowej są białka macierzy zewnątrzkomórkowej i dlatego poszukuje się zależności mogących świadczyć o ich wpływie na powstawanie, rozwój i jej przebieg [10, 28].

Cel pracy

Celem podjętej pracy badawczej było zbadanie czy istnieją zależności pomiędzy zmianą ekspresji genów kodujących białka macierzy zewnątrzkomórkowej w tkankach prawidłowych w porównaniu do nowotworów *endometrium*, ich wzajemnego oddziaływania oraz odnalezienia korelacji ze stopniem zaawansowania procesu chorobowego przy pomocy techniki makromacierzy.

Materiał i metody

Materiał do badań uzyskano od 49 pacjentek leczonych w I Katedrze i Klinice Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii oraz w II Katedrze i Klinice Ginekologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Pacjentki leczone były operacyjnie w latach 2000-2005 z powodu nowotworu *endometrium* rozpoznanego w materiale histopatologicznym uzyskanym podczas zabiegu wyłyżeczkowania jamy macicy (40 pacjentek) oraz z powodów nienowotworowych (9 pacjentek). Próbkę materiału tkankowego zawierały wyłącznie fragmenty zdrowej lub zmienionej chorobowo błony śluzowej jamy macicy. W 14 przypadkach materiał wykorzystany do dalszych prac był mrożony a w pozostałych 35 materiał pobrany w trakcie zabiegu operacyjnego poddany był dalszej obróbce w ciągu 60 minut.

Izolację RNA przeprowadzono według protokołu wykorzystującego odczynnik TRI. Materiał tkankowy świeży lub mrożony w ilości 150mg homogenizowano przez 5 minut dodając 1,0ml odczynnika TRI na każde 100mg tkanki. Uzyskane RNA rozpuszczano w odpowiedniej ilości 0,1% roztworu dietylu kwasu pirowęglowego. Próbkę RNA przechowywano do dalszej obróbki w -80°C . Jakość każdego preparatu sprawdzano metodą elektroforezy na żelu agarozowym, a ilościowe oznaczenie RNA wykonano metodą spektrofotometryczną. Pomiar absorpcji wykonano przy długości fali 260nm. Trawienie DNA wykonywano przy użyciu odczynników z zestawu BD RiboQuant™ RPA System (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA).

Do reakcji znakowania przygotowywano roztwór Master Mix w składzie: 2 μl 5X Reaction buffer, 1 μl 10X DTP Mix (dla znakowania fosforem [α - P^{32}]dATP), 3,5 μl α - P^{32} dATP, 0,5 μl DTT 100mM. W oddzielnej probówce przygotowywano mieszaninę reakcyjną w składzie: 2 μl RNA, 1 μl CDS Primer Mix (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA), którą następnie mieszano i wirowano przez 1 minutę w 14000 obr/min. Próbkę z mieszaniną reakcyjną wstawiano do termocyklera PCR (Perkin Elmer, USA) zaprogramowanego według następującego schematu: 1. 70°C 2min., 2. 50°C 2min., 3. 50°C 30 sek., 4. 50°C 25min. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono dodając do próbek z Master Mix 1 μl odwrotnej transkryptazy (MMLV Reverse Transcriptase).

Następnie, dodawano przygotowany uprzednio Master Mix w ilości 8 μl do próbki z mieszaniną reakcyjną w trakcie 3 etapu reakcji i inkubowano przez kolejne 25 minut w 50°C . Następnie zatrzymywano reakcję znakowania dodaniem 1 μl dziesięciokrotnie stężonego odczynnika Termination Mix. Reakcję PCR przeprowadzono wykorzystując uzyskane wyznakowane izotopowo cDNA. Otrzymaną mieszaninę oczyszczano przy pomocy zestawu BD Atlas™ Nucleospin® Extraction Kit. Aktywność uzyskanej sondy sprawdzano używając licznika scyntylicyjnego.

Do przeprowadzenia oznaczenia ekspresji genów wykorzystano nylonowe membrany o dodatnim ładunku powierzchniowym Atlas human cancer 1.2 array (cDNA Expression Array PT3547-3E; BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA; nr kat.: 7851-1).

Macierz zawiera punkty hybrydazyjne dla 1176 genów, z czego do grupy kodujących białka macierzy zewnątrzkomórkowej należy 31 genów. Reakcje hybrydazyjne przeprowadzono zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu. Odpowiednio przygotowane membrany, po hybrydazyjacji, przenoszono do kaset wyposażonych w BIOMAX TRANSCREEN HE w których znajdowała się klisza Kodak BioMax MS (KODAK, USA).

Czas ekspozycji kliszy fotograficznej uzależniony był od aktywności sondy i wahał się od 4 dni przy aktywności powyżej 2×10^3 do 7 dni przy aktywności 1×10^3 . Po wyjęciu kliszę wywoływano przy pomocy odczynników firmy Kodak (KODAK, USA). Następnie dane odczytywano przy pomocy oprogramowania AtlasImage™ (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA).

Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica Statsoft wersja 8.0. Rozkład w grupach sprawdzano testami Shapiro-Wilka, Kołmogorowa-Smirnowa i Lillieforsa. W przypadku rozkładu normalnego wykorzystano testy parametryczne t-Studenta dla prób niezależnych oraz test chi kwadrat.

Tabela I. Charakterystyka pacjentek pogrupowanych pod względem rozpoznania histopatologicznego.

Rozpoznanie histopatologiczne (n)	Wiek	Rodność	Wiek PM	Wiek menopauzy
<i>Adenocarcinoma endometriale</i> (n=40)	64,0 ± 10,16	2,3 ± 1,66	14,3 ± 1,22	51,2 ± 4,88
Prawidłowe <i>endometrium</i> (n=9)	50,1 ± 7,56*	2,0 ± 1,12	14,3 ± 1,66	47,6 ± 3,03**

PM – wystąpienie pierwszej miesiączki.

* istotnie statystycznie niższy wiek pacjentek w grupie z prawidłowym *endometrium* w porównaniu do pacjentek z chorobą nowotworową (p=0,0003).

** istotnie statystycznie niższy wiek wystąpienia menopauzy u pacjentek w grupie z prawidłowym *endometrium* w porównaniu do pacjentek z chorobą nowotworową (p=0,0058).

Tabela II. Analiza różnic w ekspresji genów pomiędzy tkankami nowotworowymi a prawidłowym endometrium obliczona przy pomocy testu U Manna-Whitneya (p<0,05).

GEN	TKANKA	MEDIANA	DOLNY KWARTYL	GÓRNY KWARTYL	ZAKRES		ANALIZA STATYSTYCZNA	
					MIN	MAX	U	p
F03B	nowotwór	0,07	0,00	0,15	0,00	0,43	79,0	0,009*
	norma	0,16	0,12	0,23	0,09	0,35		
F14A	nowotwór	0,00	0,00	0,12	0,00	0,34	41,0	0,0003*
	norma	0,20	0,16	0,35	0,10	0,38		

Tabela III. Statystyka opisowa badanego materiału według stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu (FIGO), test rang Kruskala-Wallisa (p<0,05).

GEN	FIGO	MEDIANA	DOLNY KWARTYL	GÓRNY KWARTYL	ZAKRES		ANALIZA STATYSTYCZNA	
					MIN	MAX	H	p
F03B	I	0,64	0,00	0,11	0,00	0,43	1,91	0,38
	II	0,14	0,10	0,19	0,00	0,34		
	III	0,00	0,00	0,17	0,00	0,34		
F14A	I	0,00	0,00	0,12	0,00	0,34	0,34	0,84
	II	0,00	0,00	0,12	0,00	0,19		
	III	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19		

Tabela IV. Statystyka opisowa badanego materiału według zróżnicowania histologicznego nowotworu (G), test rang Kruskala-Wallisa (p<0,05).

GEN	ZRÓŻ. HIST.	MEDIANA	DOLNY KWARTYL	GÓRNY KWARTYL	ZAKRES		ANALIZA STATYSTYCZNA	
					MIN	MAX	H	p
F03B	G1	0,07	0,00	0,15	0,00	0,43	3,17	0,21
	G2	0,07	0,00	0,15	0,00	0,43		
	G3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10		
F14A	G1	0,00	0,00	0,12	0,00	0,34	2,99	0,22
	G2	0,00	0,00	0,12	0,00	0,34		
	G3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		

W przypadku braku rozkładu normalnego stosowano testy nieparametryczne: U-Manna Whitneya i test rang Kruskala-Wallisa. $P < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotne. Ponadto przeprowadzono analizę wykorzystując sztuczne sieci neuronowe. Dzięki takiej analizie możliwe jest zbadanie, czy istnieją jakiegokolwiek powiązania pomiędzy zmianami ekspresji poszczególnych genów.

Wyniki

W tabeli I przedstawiono dane demograficzne pacjentek, od których pobrany został materiał tkankowy do badań.

W analizie statystycznej otrzymanych wyników, przy pomocy testu U Manna-Whitneya, porównywano stopień ekspresji genów białek macierzy zewnątrzkomórkowej w tkankach nowotworowych w stosunku do poziomu ekspresji tych genów w prawidłowym *endometrium*. Istotność statystyczną wykazano jedynie dla ekspresji genu fibronektyny (F03B) oraz osteonektyny (F14A) i w obu przypadkach była ona istotnie statystycznie niższa dla tkanek nowotworowych. (Tabela II).

Dodatkowo wykazano, że ekspresja tych genów malała wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania klinicznego i histologicznego choroby, jednak dla tych zależności nie wykazano istotności statystycznej. (Tabele III i IV).

Na podstawie analizy wykonanej przy pomocy sztucznej sieci neuronowej można określić wzajemne zależności jakie występują w grupie badanych genów. W poniższej tabeli przedstawiono istotne predyktory istnienia procesu złośliwego w uzyskanym modelu neuronowym sieci ANNI. (Tabela V).

Kolor czarny oznacza zbiór uczący (szkoleniowy, przypadki losowe z badanej grupy), natomiast kolor czerwony zbiór walidacyjny (testowy). Oznacza to, że sieć „uczy się” powiązań i wzajemnych oddziaływań pomiędzy ekspresją poszczególnych genów. Z tabeli tej wynika, że najistotniejszymi predyktorami istnienia procesu złośliwego w otrzymanym modelu okazały się: F14A – osteonektyna, F03B – fibronektyna, E11N 1 – kolagen, typ VI, alfa 1, F07A – laminina (beta 1), F08A – laminina (gamma 1).

Wykorzystanie tej sieci jako modelu prognostycznego pozwoliło skuteczniej, niż analiza pojedynczych parametrów, przewidywać charakter badanej zmiany. Ze względu na ograniczoną liczebność grupy należy jedynie przypuszczać, że te predyktory będą miały znaczenie w przewidywaniu rozwoju procesu złośliwego w badaniach na większym materiale.

Dyskusja

Rozwój choroby nowotworowej uwarunkowany jest szeregiem zmian zachodzących zarówno w komórkach nowotworowych jak i w ich najbliższym otoczeniu stanowiącym szkielet danej tkanki [29]. W procesie progresji choroby komórki nowotworowe muszą pokonać bariery w postaci błony podstawnej, macierzy zewnątrzkomórkowej i ściany naczyń krwionośnych [8, 9]. Dlatego też wydaje się, że białka macierzy zewnątrzkomórkowej pełnią szczególną rolę w rozwoju choroby [28, 30]. Macierz zewnątrzkomórkowa to złożona sieć białek pełniących różne funkcje: podporowe i stabilizujące, komunikacyjne oraz regulacyjne [31].

Badania pozwalające na dokładniejsze poznanie złożonych zależności na poziomie molekularnym mają kluczowe znaczenie w przewidywaniu rozwoju procesu nowotworowego.

Tabela V. Analiza wrażliwości modelu neuronowego ANNI.

	E11N	F03B	F07A	F08A	F14A
Miejsce	3	2	4	5	1
Błąd	0,32	0,32	0,29	0,2	0,33
Wskaźnik	25,1	25,4	22,5	15,5	25,9
Miejsce	4	2	7	10	3
Błąd	0,27	0,38	0,04	0,02	0,03
Wskaźnik	21,6	29,7	3,2	1,4	24,2

W prezentowanych badaniach wykazano zwiększoną ekspresję genu fibronektyny oraz osteonektyny w tkankach zdrowych w porównaniu do tkanek nowotworowych. W obu przypadkach aktywność tych genów była istotnie statystycznie wyższa w przypadku tkanek prawidłowych.

Dane dostępne w literaturze na temat ekspresji genu fibronektyny i jego roli w procesie transformacji nowotworowej nie są jednoznaczne. Wydaje się, że dzięki fibronektynie, komórki nowotworowe zwiększają swój potencjał rozrostowy oraz odporność na apoptozę indukowaną lekami przeciwnowotworowymi [32]. Większość dostępnego piśmiennictwa dotyczy jednak badań ekspresji genu tego białka w chorobach rozrostowych tkanki płucnej [33, 34].

Han i wsp. dowodzą, że fibronektyna powoduje znaczny wzrost proliferacji komórek raka płuc. Badali oni wpływ ekspresji genu fibronektyny na ekspresję genów odpowiedzialnych za regulację cyklu komórkowego: cykliny D1 oraz genu p21 – inhibitora kinaz zależnych od cyklin (CDKN1A – *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) w komórkach raka płuc. Wykazali, że fibronektyna zwiększała ekspresję cykliny D1 nawet dwukrotnie w porównaniu do próby kontrolnej, co zostało potwierdzone badaniem RT-PCR z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym. Dodatkowo zaobserwowali, że stężenie białka cykliny D1 w porównaniu do stężenia mRNA jest znacznie wyższe, co może sugerować regulowanie procesów posttranslacyjnych przez fibronektynę [33].

Z kolei Dai i wsp. badali wpływ progesteronu na komórki Hec50co (jest to słabo zróżnicowana linia komórkowa raka *endometrium*), do których przy pomocy wektorów adenowirusowych wprowadzili geny receptorów progesteronowych typu A i B [35]. Następnie zbadali zmiany fenotypowe indukowane progesteronem oraz zmiany w cyklu komórkowym zachodzące w komórkach Hec50co. Ocenili, że progesteron może mieć wpływ na ekspresję jedynie pięciu genów kodujących białka związane z macierzą zewnątrzkomórkową. W przypadku genu fibronektyny doszło do 2,8-krotnego zmniejszenia jego ekspresji poprzez receptory typu B. Może to mieć ogromne znaczenie w rozwijaniu zdolności do tworzenia przerzutów przez komórki raka *endometrium*.

Wyniki tych badań, korelują z wynikami prezentowanymi w naszej pracy. Ekspresja genu fibronektyny była istotnie statystycznie niższa w komórkach nowotworowych ($p=0,009$) w porównaniu do komórek prawidłowego *endometrium*. W związku z tym, że fibronektyna zwiększa potencjał rozrostowy komórek nowotworowych, na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że nowotwory w niższym stopniu zaawansowania histologicznego mają większą zdolność do naciekania otoczenia w porównaniu do nowotworów w stopniu G3. Wydaje się to sprzeczne z ogólnie przyjętą wiedzą, jednak trzeba wziąć pod uwagę, że zdolność do naciekania i przerzutowania regulowana jest również przez inne czynniki. Może to być również związane z molekularnym rozregulowaniem procesów genetycznych i metabolicznych w niskozróżnicowanych nowotworach.

Drugim genem, którego zwiększoną ekspresję zaobserwowano w prezentowanych badaniach, w tkankach zdrowych w porównaniu do tkanek nowotworowych, jest gen kodujący osteonektynę (SPARC). Jest to glikoproteina, której głównymi funkcjami w wielu tkankach jest udział w procesach dojrzewania, przebudowy, regulacji cyklu komórkowego oraz procesach naprawczych. W badaniach *in vitro* wykazano jej działanie antyadhezyjne i antyproliferacyjne [36].

Dodatkowo, osteonektyna wpływa na zmianę kształtu komórek, hamuje odpowiedź komórkową na stymulację czynnikami wzrostu oraz wpływa na homeostazę środowiska macierzy zewnątrzkomórkowej [15, 37]. W tkankach podlegających przemianie w trakcie procesu nowotworowego, kluczowe znaczenie dla jego przebiegu wydaje się mieć zdolność komórek do przylegania do podłoża oraz ich niepodlegająca kontroli proliferacja. W badaniach *in vitro* wykazano, że osteonektyna hamuje proliferację komórek śródbłonna naczyń krwionośnych, mięśni gładkich czy fibroblastów stymulowanych VEGF [37]. Badania na myszach pozbawionych genu osteonektyny potwierdziły wyniki otrzymane *in vitro*. Wykazano, że fibroblasty i komórki mięśni gładkich pobrane od tych zwierząt wykazywały się większą zdolnością do proliferacji w porównaniu do komórek otrzymanych od myszy z funkcjonującym genem osteonektyny [38]. Działanie antyadhezyjne osteonektyny polega na rozbijaniu kompleksów białkowych i reorganizacji włókien aktyny poprzez fosforylację tyrozyny w białkach związanych z adhezją [39].

W przypadku ekspresji osteonektyny u ludzi, zwiększoną ekspresję genu tego białka zaobserwowali inni badacze m. in.: w raku gruczołu piersiowego, okrężnicy oraz czerniaku [40, 41]. Zespół pod kierownictwem Massi opublikował wyniki dotyczące korelacji ekspresji osteonektyny z klinicznym przebiegiem inwazyjnego czerniaka skóry na podstawie badań immunohistochemicznych [14]. Badanie obejmowało 188 chorych z rozpoznany czerniakiem, którego głębokość naciekania nie przekraczała 0,75mm. Wykazali oni, że współczynnik osteonektyno-dodatnich komórek czerniaka dodatnio korelował z ryzykiem progresji choroby ($p=0,01$), ryzykiem wystąpienia przerzutów odległych ($p=0,005$) oraz umieralnością ($p=0,03$). Natomiast nie wykazano korelacji z innymi czynnikami takimi jak wiek, płeć czy lokalizacja zmiany. Zwiększone stężenie osteonektyny w komórkach czerniaka może wpływać na wzrost aktywności metaloproteinaz (kolagenazy, żelatynazy czy inhibitora aktywatora plazminogenu typu I (PAI-I), które działają destrukcyjnie na składniki błon podstawnych i strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej.

Z drugiej jednak strony Mok i wsp. wykazali, że zwiększona ekspresja białka osteonektyny może działać supresyjnie na rozwój komórek SKOV3 raka jajnika *in vitro* i *in vivo* [42]. Komórki pokrywające powierzchnię jajnika (*human ovarian surface epithelial* - HOSE) cechują się wysokim poziomem ekspresji osteonektyny, natomiast w komórkach raka jajnika ekspresja tego białka pozostaje na niskim poziomie. W doświadczeniu wykorzystali komórki linii komórkowej raka jajnika, do których transfekowali pełnej długości cDNA genu osteonektyny w wyniku czego zaobserwowali zmniejszone tempo wzrostu komórek nowotworowych oraz zmniejszoną zdolność tych komórek do tworzenia guzów nowotworowych u myszy pozbawionych odporności komórkowej. Ich wyniki świadczą o ważnej roli osteonektyny w regulacji procesów wzrostu i różnicowania komórek HOSE oraz sugerują, że to białko może pełnić rolę supresora rozwoju nowotworów jajnika.

Rodríguez-Jiménez i wsp. oceniali ekspresję genu osteonektyny w raku *endometrium* [43]. Stopień ekspresji genu badany był przy pomocy RT-PCR z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym. Stwierdzili oni, podobnie jak w naszym materiale, że w 98% przypadków tkanek nowotworowych wystąpiło istotne statystycznie zmniejszenie ekspresji w porównaniu do tkanek kontrolnych ($p<0,001$). Dodatkowo, w celu potwierdzenia tych wyników, badacze ocenili ekspresję mRNA osteonektyny w 10 tkankach nowotworowych oraz tkankach prawidłowego *endometrium* pobranych od tych samych pacjentek. Ekspresja genu osteonektyny była również mniejsza w komórkach nowotworowych w porównaniu do komórek prawidłowych pobranych od tych samych pacjentek. Autorzy wyjaśniają, że zmniejszenie ekspresji osteonektyny może być skutkiem hipermetylacji promotora tego genu w komórkach nowotworowych.

W związku z przytaczanymi w piśmiennictwie danymi na temat zwiększonej lub zmniejszonej ekspresji mRNA genu osteonektyny w nowotworach różnych tkanek i narządów interpretacja wyników i jednoznaczne ustalenie roli jaką pełni to białko nie jest możliwe.

Prezentowane w tej pracy wyniki dotyczące ekspresji mRNA genu osteonektyny potwierdzają wyniki badaczy, którzy wykazali zmniejszoną ekspresję tego genu w komórkach nowotworowych w porównaniu do komórek prawidłowego *endometrium*. Ponadto w miarę postępu zaawansowania klinicznego i histologicznego nowotworu ekspresja mRNA osteonektyny zmniejszała się jednak nie wykazano dla tej zależności istotności statystycznej.

Wnioski

Zmniejszenie ekspresji genu osteonektyny i fibronektyny w nowotworach *endometrium* w porównaniu do tkanek prawidłowych wydaje się promować rozwój choroby. Poziom ekspresji tych genów może stanowić również dodatkowe narzędzie w określaniu stopnia zaawansowania choroby oraz przewidywania dalszego jej przebiegu. Wykorzystanie sztucznych sieci neuronowych do analizy uzyskanych danych istotnie zwiększa czułość i specyficzność badania wpływu zmian ekspresji genów na procesy wewnątrzkomórkowe.

Podziękowania

Doświadczenia przeprowadzono w ramach grantu KBN nr: 3P05E07123.

Zmniejszona ekspresja genu osteonektyny i fibronektyny w nowotworach *endometrium*...

Piśmiennictwo

1. Blohm D, Guiseppi-Elie A. New developments in microarray technology. *Curr Opin Biotechnol.* 2001, 12, 41-47.
2. Ishii M, Hashimoto S, Tsutsumi S, [et al.]. Direct comparison of GeneChip and SAGE on the quantitative accuracy in transcript profiling analysis. *Genomics.* 2000, 68, 136-143.
3. Ewis A, Zhelev Z, Bakalova R, [et al.]. A history of microarrays in biomedicine. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005, 5, 315-328.
4. Braunschweig T, Chung J, Hewitt S. Tissue microarrays: bridging the gap between research and the clinic. *Expert Rev Proteomics.* 2005, 2, 325-336.
5. Alizadeh A, Eisen M, Davis R, [et al.]. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* 2000, 403, 503-511.
6. Alon U, Barkai N, Notterman D, [et al.]. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, 96, 6745-6750.
7. Perou C, Sørlie T, Eisen M, [et al.]. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000, 406, 747-752.
8. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2, 161-174.
9. Duffy M, Maguire M, Hill A, [et al.]. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* 2000, 2, 252-257.
10. Rhodes J, Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med.* 2007, 11, 176-205.
11. George E, Baldwin H, Hynes R. Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells. *Blood.* 1997, 90, 3073-3081.
12. Pankov R, Yamada K. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 2002, 115, 3861-3863.
13. Motamed K, Sage E. SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway. *J Cell Biochem.* 1998, 70, 543-552.
14. Massi D, Franchi A, Borgognoni L, [et al.]. Osteonectin expression correlates with clinical outcome in thin cutaneous malignant melanomas. *Hum Pathol.* 1999, 30, 339-344.
15. Tremble P, Lane T, Sage E, [et al.]. SPARC, a secreted protein associate with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol.* 1993, 121, 1433-1444.
16. Kamihagi K, Katayama M, Ouchi R, [et al.]. Osteonectin/SPARC regulates cellular secretion rates of fibronectin and laminin extracellular matrix proteins. *Biochem Biophys Res Comm.* 1994, 15, 423-428.
17. Goldblum S, Ding X, Funk S, [et al.]. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) regulates endothelial cell shape and barrier function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994, 91, 3448-3452.
18. Porte H, Chastre E, Prevot S, [et al.]. Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes. *Int J Cancer.* 1995, 64, 70-75.
19. Brekken R, Sage E. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol.* 2001, 19, 816-827.
20. Porter P, Sage E, Lane T, [et al.]. Distribution of SPARC in normal and neoplastic tissue. *J Histochem Cytochem.* 1995, 43, 791-800.
21. Gilles C, Bassuk J, Pulyaeva H, [et al.]. SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 1998, 58, 5529-5536.
22. Jacob K, Webber M, Benayahu D, [et al.]. Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone. *Cancer Res.* 1999, 59, 4453-4457.
23. Goodman M, Hankin J, Wilkens L, [et al.]. Diet, body size, physical activity, and the risk of endometrial cancer. *Cancer Res.* 1997, 57, 5077-5085.
24. Lax S. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch.* 2004, 444, 213-223.
25. Liu F. Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2007, 46, 26-32.
26. Mutter G, Lin M, Fitzgerald J, [et al.]. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000, 92, 924-930.
27. Semczuk A. Assessment of the pRB-1 pathway alterations in endometrioid-type human endometrial carcinomas. *Ginekol Pol.* 2005, 76, 420-422.
28. McCawley L, Matrisian L. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today.* 2000, 6, 149-156.
29. Liotta L. Tumor invasion and metastases—role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res.* 1986, 46, 1-7.
30. Nabeshima K, Inoue T, Shimao Y, [et al.]. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int.* 2002, 52, 255-264.
31. Hehlhans S, Haase M, Cordes N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anti-cancer strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2007, 1775, 163-180.
32. Rintoul R, Sethi T. Extracellular matrix regulation of drug resistance in small-cell lung cancer. *Clin Sci.* 2002, 102, 417-424.
33. Han S, Sidell N, Roman J. Fibronectin stimulates human lung carcinoma cell proliferation by suppressing p21 gene expression via signals involving Erk and Rho kinase. *Cancer Lett.* 2005, 219, 71-81.
34. Ritzenthaler J, Han S, Roman J. Stimulation of lung carcinoma cell growth by fibronectin-integrin signalling. *Mol Biosyst.* 2008, 4, 1160-1169.
35. Dai D, Wolf D, Litman E, [et al.]. Progesterone inhibits human endometrial cancer cell growth and invasiveness: down-regulation of cellular adhesion molecules through progesterone B receptors. *Cancer Res.* 2002, 62, 881-886.
36. Yan Q, Sage E. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem.* 1999, 47, 1495-1506.
37. Raines E, Lane T, Inuela-Arispe M, [et al.]. The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992, 89, 1281-1285.
38. Bradshaw A, Francki A, Motamed K, [et al.]. Primary mesenchymal cells isolated from SPARC-null mice exhibit altered morphology and rates of proliferation. *Mol Biol Cell.* 1999, 10, 1569-1579.
39. Young B, Wang P, Goldblum S. The counteradhesive protein SPARC regulates an endothelial paracellular pathway through protein tyrosine phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 251, 320-327.
40. Bellahcene A, Castronovo V. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *Am J Pathol.* 1995, 146, 95-100.
41. Ledda F, Bravo A, Adris S, [et al.]. The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol.* 1997, 108, 210-214.
42. Mok S, Chan W, Wong K, [et al.]. SPARC, an extracellular matrix protein with tumor-suppressing activity in human ovarian epithelial cells. *Oncogene.* 1996, 12, 1895-1901.
43. Rodríguez-Jiménez F, Caldés T, Iñiesta P, [et al.]. Overexpression of SPARC protein contrasts with its transcriptional silencing by aberrant hypermethylation of SPARC CpG-rich region in endometrial carcinoma. *Oncol Rep.* 2007, 17, 1301-1307.