

# Aktywność transkrypcyjna genów szlaków sygnalizacyjnych receptora VEGFR-2 w raku szyjki macicy wyznaczona techniką mikromacierzy oligonukleotydowych

## *Transcription activity of the signalling pathway genes of VEGFR-2 in cervical cancer determined with the oligonucleotide microarray technique*

Anna Banyś<sup>1</sup>, Joanna Orchel<sup>2</sup>, Urszula Mazurek<sup>2</sup>, Bogdan Michalski<sup>3</sup>, Agnieszka Droszol<sup>3</sup>, Violetta Skrzypulec<sup>3</sup>, Andrzej Jankowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Sosnowcu;

kierownik Katedry i Zakładu: dr hab. farm. Andrzej Jankowski

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Biologii Molekularnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Sosnowcu;

kierownik Katedry i Zakładu: dr hab. med. Urszula Mazurek, prof. ŚUM

<sup>3</sup>Katedra Zdrowia Kobiety, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach; kierownik Katedry: dr hab. med. Violetta Skrzypulec, prof. ŚUM

Przeгляд Menopauzalny 2009; 2: 72-75

### Streszczenie

Transformacja nowotworowa nie jest zazwyczaj następstwem uszkodzenia funkcji pojedynczego genu, lecz ich całych zespołów, kontrolujących liczne szlaki metaboliczne i regulacyjne w komórce. Celem pracy było wytypowanie genów kodujących białka ścieżek sygnałowych receptora VEGFR-2 spełniającego osiową funkcję w angiogenezie nowotworowej, których aktywność transkrypcyjna istotnie różni się w wycinkach płaskonabłonkowego raka szyjki macicy od wycinków ocenionych histopatologicznie jako prawidłowe. Profil ekspresji genów wyznaczono metodą mikromacierzy oligonukleotydowych HGU 133 A (Affymetrix), umożliwiającą analizę 22283 mRNA, spośród których wyselekcjonowano 128 transkryptów uczestniczących w ścieżkach sygnałowych aktywowanych przez VEGFR-2. Po normalizacji wyników w programie RMA Express, typowano trzema metodami geny różnicujące wycinki szyjki macicy. Otrzymane wyniki, niezależnie od metody analizy, wykazały, że do genów różnicujących wycinki szyjki macicy od raka płaskonabłonkowego należą VEGFA i Spk1.

**Słowa kluczowe:** VEGFR-2, mikromacierze, Affymetrix, rak szyjki macicy

### Summary

Neoplastic transformation is a consequence of multiple rather than single gene dysfunction. Whole sets of genes controlling various metabolic and regulatory pathways of a cell are involved. The aim of the study was to indicate the genes for proteins of the signalling pathways for VEGFR-2, as playing a main role in neoplastic angiogenesis; their transcription activity significantly differs in biopsy samples from histologically normal epithelium and squamous cell cervix. The gene expression profile was assigned using oligonucleotide microarrays of HU 133A (by Affymetrix), enabling analysis of 22283 mRNA transcripts, of which 128 were selected for the study, as taking part in VEGFR-2-activated signalling pathways. After normalization of the results with RMA Express software, three different methods were applied to identify the differentiating genes for squamous cell carcinoma. According to the results, irrespective of the applied method, VEGFA and Spk1 are specific genes differentiating.

**Key words:** VEGFR-2, microarrays, Affymetrix, cervical cancer

### Wstęp

Już na początku XX w. zaobserwowano, że wzrost nowotworu wiąże się ze zwiększeniem liczby naczyń krwionośnych w obrębie guza [1]. Folkman w 1971 r. po-

stawił ważną do dziś hipotezę, która mówi, że liczba naczyń krwionośnych w pierwotnej zmianie jest wskaźnikiem prognostycznym rozwoju choroby nowotworowej i jest związana z potencjałem przerzutowania [2].

Adres do korespondencji:

dr med. **Joanna Orchel**, Katedra i Zakład Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Narczyzów 1, 41-200 Sosnowiec, tel. +48 32 364 10 26, faks +48 32 364 10 20, e-mail: orchelia@sum.edu.pl

Główną cytokiną zapoczątkowującą angiogenezę jest naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (*vascular endothelial growth factor* – VEGF), obecnie uważany za kluczowy czynnik regulujący fizjologiczny i patologiczny proces powstawania nowych naczyń krwionośnych [1]. Biologiczne działanie VEGF ujawnia się po połączeniu z receptorami rodziny VEGFR. Wśród nich kluczową rolę odgrywa VEGFR-2, zwany też KDR. Sygnał mitogenny przenoszony na drodze VEGF – VEGFR-2 spełnia osiową funkcję w angiogenezie nowotworowej, jakkolwiek badania eksperymentalne wykazują zróżnicowane rozmieszczenie tego sygnału w tkance nowotworowej [3].

Badania molekularne nowotworów polegały zazwyczaj na poszukiwaniu zmian w pojedynczych genach lub ich niewielkich grupach i pozwoliły na znaczny postęp w biologii nowotworów. Jednak – poza nielicznymi wyjątkami – nie przyniosły przełomowych wyników. Związane jest to z obserwacją, że nowotworzenie nie jest zwykle następstwem uszkodzenia funkcji pojedynczego genu, lecz całych ich zespołów, kontrolujących liczne szlaki metaboliczne i regulacyjne w komórce. Jednoczesne badanie funkcji dużej liczby genów jest obecnie możliwe dzięki technologii mikromacierzy DNA [4], która pozwala zrozumieć molekularne mechanizmy złożonego wielopostaciowego procesu powstawania nowotworu. Metoda ta umożliwia analizę ekspresji tysięcy genów jednocześnie w jednym nowotworze [4, 5].

## Cel pracy

Celem pracy było wytypowanie genów kodujących białka ścieżek sygnałowych receptora VEGFR-2, których aktywność transkrypcyjna różnicuje wycinki raka szyjki macicy od wycinków ocenionych histopatologicznie jako prawidłowe.

## Materiał i metody

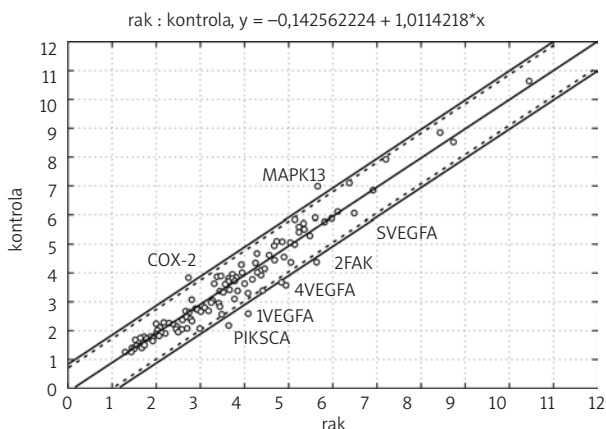
Materiał do badań molekularnych stanowiły wycinki raka płaskonabłonkowego szyjki macicy oraz wycinki tkankowe pobrane z szyjek macicy, w których nie stwierdzono histopatologicznie zmian nowotworowych. U 8 pacjentek wykonano analizę transkryptomu techniką mikromacierzy oligonukleotydowych z zastosowaniem płytek EGU 133A (Affymetrix). Materiał do badań stanowiło RNA wyekstrahowane przy użyciu odczynnika Trizol™, zgodnie z instrukcją producenta, a następnie oczyszczone przez trawienie DN-azą I (deoksyrybonukleazą I) na kolumnach zestawu RNasy Mini Kit firmy Qiagen. Około 8 µg całkowitego RNA wykorzystano do syntezy dwuniciowego cDNA (Gibco BRL SuperScript Choince system). W kolejnym etapie zsyntetyzowano cRNA, który wcześniej wyznakowano biotyną (reakcja transkrypcji *in vitro*, Enzo kit). Biotynylowany cRNA poddano procesowi fragmentacji oraz hybrydyzacji z mikro-

macierzą Test3 oraz HG-U133A i znakowania kompleksem streptawidyna–fikoerytryna. Intensywność fluorescencji została zanalizowana przy użyciu skanera Gene-Array Scanner G2500A. Ilość oraz jakość całkowitego RNA, cDNA i cRNA oceniono techniką elektroforezy w 1,2-procentowym żelu agarozowym. Analizę otrzymanych wyników po normalizacji w programie RMA Express przeprowadzono, wykorzystując programy Micro Array Suite 5.0 i Data Mining Tool (Affymetrix) i SAM (*significance analysis of microarrays*).

## Wyniki

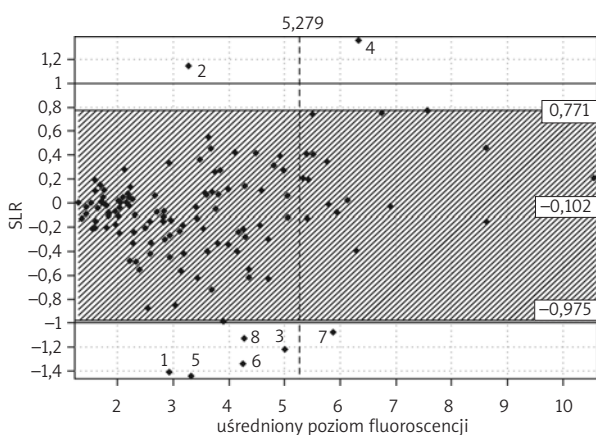
Na podstawie danych literaturowych oraz bazy NCBI i Affymetrix do analizy wyodrębniono 128 genów kodujących białka ścieżek sygnałowych receptora VEGFR-2. Wyznaczenie genów różnicujących kontrolę od raka szyjki macicy dokonano po normalizacji wyników w programie RMA Express za pomocą analizy regresji liniowej. Na podstawie wartości parametru *score* opartego na teście t-Studenta, wyznaczonego w programie SAM, sprawdzono, czy różnice w aktywności transkrypcyjnej 128 analizowanych genów pomiędzy grupą kontrolną a badaną są statystycznie istotne. Matrycowe RNA, dla których wartość *p* była mniejsza od 0,01, uznano za różnicujące wycinki raka szyjki macicy. W ten sposób wykazano, że w raku szyjki macicy w porównaniu z kontrolą istotnie różni się aktywność transkrypcyjna genów kodujących czynnik transkrypcyjny 4NFATC1, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (1VEGFA), kinazę sfingozyny 1 (Spk1) oraz kinazę białkową FAK (1FAK). Transkrypty różnicujące wycinki raka szyjki macicy od kontroli wyznaczono również na podstawie modelu regresji liniowej z 95-procentowym obszarem prognozy (ryc. 1.). W analizie tej wyróżniono dwa kryteria wyboru mRNA różnicujących: kryterium statystyczne zaznaczone liniami przerywanymi wyznaczające 95-procentowy obszar prognozy, wewnątrz którego zgodnie z przyjętym założeniem nie obserwowano transkryptów różnicujących wycinki, oraz kryterium biologiczne oznaczone liniami ciągłymi wskazującymi wartość 1, czyli dwukrotny wzrost lub obniżenie poziomu stężenia transkryptu. Za mRNA różnicujące wycinki zostały uznane tylko te, które lokalizowane były poza obszarem kryterium biologicznego (ryc. 1.). Rak szyjki macicy charakteryzuje wysoka aktywność transkrypcyjna genu kodującego podjednostkę katalityczną  $\alpha$  kinazy fosfatydyloinozytolu PIK3CA, genów kodujących naczyniowo-śródbłonkowe czynniki wzrostu A: 1VEGFA, 3VEGFA i 4VEGFA oraz genów kodujących kinazę sfingozyny 1 Spk1 i kinazę białkową 2FAK. Ekspresja genów kodujących cyklooksigenazę 2 COX-2 oraz kinazę MAP (MAPK13) w porównaniu z kontrolą w raku szyjki macicy ulega natomiast wyciszeniu.

Typowanie genów różnicujących tkanki prawidłowe (kontrolę) od raka szyjki macicy przeprowadzono także



**Ryc. 1.** Geny różnicujące kontrolę od raka szyjki macicy wybrane na podstawie analizy regresji liniowej

Linie ciągłe charakteryzują 95-procentowy obszar prognozy, wewnątrz którego analizowane geny nie mają wartości różnicującej wycinki szyjki macicy, natomiast linie przerywane oznaczają dwukrotny wzrost lub obniżenie ekspresji. Na osi pionowej znajdują się  $\log_2$  z wartości fluorescencji transkryptów w próbie kontrolnej (kontrola), natomiast na osi poziomej znajdują się  $\log_2$  z wartości fluorescencji w raku szyjki macicy (rak)



**Ryc. 2.** Geny różnicujące kontrolę od raka szyjki macicy wybrane na podstawie metody Blanda-Altmana

Zakresowane pole oznacza 95-procentowy obszar prognozy (kryterium statystyczne), wewnątrz którego geny nie mają wartości różnicowania wycinków szyjki macicy, natomiast czarne linie oznaczają dwukrotny wzrost lub obniżenie ekspresji (kryterium biologiczne). Za geny różnicujące zostały uznane tylko te, które były zlokalizowane poza obszarem prognozy kryterium statystycznego i biologicznego. Kolejne numery na wykresie oznaczają nazwy transkryptów: 1 – PIK3CA; 2 – COX; 3 – 2FAK; 4 – MAPK13; 5 – VEGFA; 6 – 4VEGFA; 7 – VEGFA; 8 – Spk1

metodą Blanda-Altmana, na podstawie której nadekspresję obserwowano dla genów PIK3CA, 2FAK, MAPK13, 1VEGFA, 4VEGFA, 3VEGFA, Spk1 i 1FAK. W przypadku COX-2 oraz MAPK13 w wycinkach raka obserwowano

natomiast wyciszenie aktywności transkrypcyjnej genu (ryc. 2.). W ostatnim etapie analizy wyników wyznaczono metodą SAM parametr *q-value* wskazujący procent prawdopodobieństwa przypadkowej obserwacji różnic aktywności transkrypcyjnej genów oraz parametr *score* wskazujący znamienność statystyczną obserwowanych wyników.

Z wybranej grupy genów kodujących białka szlaku sygnalizacyjnego receptora VEGFR-2 tylko 1VEGFA oraz Spk1 spełniają kryteria genów różnicujących grupę kontrolną od raka szyjki macicy (kryterium wyznaczone na podstawie krzywej regresji, programu SAM oraz metody Blanda-Altmana).

## Dyskusja

W wielu badaniach wykazano obecność korelacji pomiędzy stopniem unaczynienia, złośliwością guza oraz poziomem mRNA VEGF w różnych nowotworach. Zaobserwowano znamienne większe stężenie VEGF w regionach zwiększonego unaczynienia nowotworów złośliwych. Pacjenci ze zwiększonym stężeniem białka VEGF w surowicy rokowali gorzej w porównaniu z pacjentami z małym stężeniem.

Wykazano również, że nadekspresja VEGF hamuje różnicowanie i dojrzewanie komórek dendrytycznych i wpływa w ten sposób na osłabienie odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko rosnącemu guzowi [2]. Stwierdzono także, że VEGF wykazuje silne działanie cytoprotekcyjne w stosunku do komórek nowotworowych. Udowodniono to na podstawie doświadczeń, w których komórki nowotworowe poddano działaniu promieni rentgenowskich lub chemioterapeutyków. W obu przypadkach w hodowlach zawierających VEGF apoptozie uległo mniej komórek niż w hodowlach go pozabawionych [6].

W badaniach nad określaniem stężenia cytokin i innych markerów nowotworowych we krwi u chorych na raka szyjki macicy, Kotowicz i wsp. z Zakładu Markerów Nowotworowych Centrum Onkologii w Warszawie wykazali znamienne większe stężenie VEGF w analizowanej grupie chorych w porównaniu z grupą referencyjną [7].

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy są także zgodne z badaniami Michalskiego i wsp., którzy wyodrębnili 20 genów związanych z angiogenezą i uznali VEGF za kluczowy czynnik zaangażowany w proces rozwoju raka szyjki macicy [8].

Po analizie statystycznej (wszystkimi trzema metodami) danych uzyskanych z mikromacierzy oligonukleotydowych, zaobserwowano również znamienne wyższą ekspresję genu kodującego kinazę sfingozyny 1 (Spk1) w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną (tab. I). Taki wynik analizy jest zgodny z informacjami zamieszczonymi na <https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/showresults.affx>, gdzie Spk1 opisano jako

**Tab. I.** Geny różnicujące raka szyjki macicy od kontroli (oraz gen kandydujący do genu różnicującego) wyznaczone trzema metodami: Blanda-Altmana, modelu regresji liniowej oraz SAM (*significance analysis of microarrays*)

| Nr genu | ID     | Uśredniony poziom fluorescencji | SLR  | Bland Altman | Krzywa regresji | SAM |   |
|---------|--------|---------------------------------|------|--------------|-----------------|-----|---|
| 1       | PIK3CA | 204369_at                       | 2,93 | -1,14        | +               | +   | - |
| 2       | COX-2  | 204748_at                       | 3,28 | 1,15         | +               | +   | - |
| 3       | 2FAK   | 208820_at                       | 5,01 | -1,22        | +               | +   | - |
| 4       | MAPK13 | 210058_at                       | 6,33 | 1,36         | +               | +   | - |
| 5       | 1VEGFA | 210513_s_at                     | 3,33 | -1,44        | +               | +   | + |
| 6       | 4VEGFA | 211527_x_at                     | 4,25 | -1,34        | +               | +   | - |
| 7       | 3VEGFA | 212171_x_at                     | 5,87 | -1,08        | +               | +   | - |
| 8       | Spk1   | 219257_s_at                     | 4,28 | -1,13        | +               | +   | + |
| 9*      | 1FAK   | 207821_s_at                     | 3,9  | -0,987       | +               | -   | + |

9\* – gen kandydujący

(+) analizowany gen ma wartość różnicującą wycinki szyjki macicy (-) brak wartości różnicującej.

SLR – logarytm różnicy średnich wartości sygnału fluorescencji poszczególnych transkryptów w wycinkach kontrolnych w porównaniu z odpowiadającymi im transkryptami w wycinkach raka szyjki macicy (signal log ratio)

czynnik wykazujący działanie antyapoptotyczne, pobudzające migrację oraz proliferację komórek śródbłonka. Ponadto informacje te potwierdzają badania wykonane na uniwersytecie w Kalifornii [9, 10].

## Wnioski

Analizowane zmiany aktywności transkrypcyjnej genów kodujących białka mitogennych szlaków sygnałowych aktywowanych przez receptor dla VEGF prowadzą do wyodrębnienia genów różnicujących raka szyjki macicy od grupy kontrolnej. Za geny różnicujące można uznać jedynie transkrypty: 1VEGFA oraz Spk1, ponieważ tylko te geny zostały wskazane jako różnicujące przy użyciu regresji liniowej. Spostrzeżenie to potwierdza także analiza za pomocą programu SAM oraz metody Blanda-Altmana, wskazująca na istotne różnice w aktywności transkrypcyjnej tych genów w kontroli i raku szyjki macicy.

## Piśmiennictwo

- Łojko A, Komarnicki M. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu a angiogeneza w chorobach nowotworowych. *Współcz Onkol* 2004; 8: 1-4.
- Swidzińska E, Naumnik W, Chyczewska E. Angiogeneza i neoangiogeneza – znaczenie w raku płuca i innych nowotworach. *Pneumonol Alergol Pol* 2006; 74: 414-20.
- Michalski B, Kuśmiercz D, Poręba R i wsp. Aktywność transkrypcyjna i formy alternatywnego składania mRNA genów receptorów Flt-1, Flk-1 w ocenie ryzyka progresji zmian śródbłonkowych i raka szyjki macicy. *Współcz Onkol* 2003; 7: 80-8.
- Kordek R, Bednarek A. Mikromacierze DNA w badaniach raka piersi. *Onkol Prakt Klin* 2005; 1: 10-7.

- Warowna A. Zastosowanie mikromacierzy w raku płuca. *lekarzonkolog.pl* 2006.07.17. URL: <http://www.lekarzonkolog.pl/mod/archiwum/6735>.
- Jurczyszyn A, Wolska-Smoleń T, Skotnicki A, Szpiczak mnogi – rola angiogenezy i zastosowanie talidomidu. *Przegl Lek* 2003; 60: 542-7.
- Kotowicz B, Kowalska M, Fukisiewicz M, Kamińska J. Kliniczne znaczenie komplementarnych oznaczeń standardowych markerów nowotworowych i wybranych cytokin w surowicy krwi chorych na raka szyjki macicy. *Współcz Onkol* 2006; 6: 292-6.
- Zieliński T, Michalski B, Urbański K i wsp. Poszukiwanie angiogennych genów różnicujących w raku szyjki macicy z wykorzystaniem techniki mikromacierzy oligonukleotydowych. *Ginekol Onkol* 2006; 1: 25-7.
- Wu W, Shu X, Hovsepian H, et al. VEGF receptor expression and signaling in human bladder tumors. *Oncogene* 2003; 22: 3361-70.
- Shu X, Wu W, Mosteller RD, Broek D. Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Molecul Cell Biol* 2002; 22: 7758-68.