

Received: 2008.01.07
Accepted: 2008.07.20
Published: 2008.08.18

Biologia molekularna i diagnostyka raka endometrium*

Molecular biology of endometrial carcinoma

Aleksandra Klemba¹, Wojciech Kukwa², Ewa Bartnik^{1,5}, Tomasz Krawczyk⁴,
Anna Ścińska², Paweł Golik¹, Anna M. Czarnecka^{1,4**}

¹ Instytut Genetyki i Biotechnologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

² Klinika Otolaryngologii Oddziału Stomatologii AM, Szpital Czerniakowski, w Warszawie

³ Zakład Patomorfologii Klinicznej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

⁴ Studium Medycyny Molekularnej, Akademii Medycznej w Warszawie

⁵ Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie

Streszczenie

Rak endometrium (błony śluzowej trzonu macicy) jest najczęściej rozpoznawanym nowotworem ginekologicznym w krajach rozwiniętych. Od prawie 20 lat prowadzone są badania nad podłożem molekularnym choroby. Choć wiele już wiadomo, mało jest markerów molekularnych pozwalających na określenie ryzyka wystąpienia choroby, jej diagnozowanie i monitorowanie leczenia. Obecnie nowe perspektywy w walce z rakiem otwiera biologia mitochondriów. Rola tych organeli i mutacji ich genomu (mtDNA) opisano w kilku typach nowotworów i wciąż się identyfikuje nowe zmiany. Znajduje się je również w nowotworach endometrium, choć ich dokładną rolę w transformacji komórki jeszcze nie poznano. Część procesów, w które zaangażowane są mitochondria jest dokładnie opisana i udokumentowana. Do procesów takich należy transport elektronów czy apoptoza, wiele jednak wymaga dalszych badań. W wielu badaniach stosowano metody genetyki wprost, pobierano do badania tkankę od pacjentki z diagnozą określonego typu nowotworu, następnie szukano zmian w metabolizmie lub mutacji mtDNA i dzięki temu przypisano określone, charakterystyczne dla nich zestawy zaburzeń i mutacji. W pracy opisano zmiany molekularne charakterystyczne dla nowotworów endometrium, ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnej roli mitochondriów w procesie ich powstawania. Poznanie szczegółów molekularnej patogenezy procesu nowotworowego u pacjentek z rakiem błony śluzowej trzonu macicy może pozwolić na opracowanie bardziej skutecznych badań przesiewowych i/lub zwiększyć odsetek wcześniej wykrywanych przypadków.

Słowa kluczowe: rak endometrium • gruczolakorak błony śluzowej trzonu macicy • biologia raka • markery molekularne • mitochondria • mutacje mtDNA

Summary

Endometrial carcinoma is among the most frequently diagnosed gynecological malignancies in highly developed countries. Research has been conducted for 20 years to define the molecular pathology of this disease and much is already known, but adequate prognostic, diagnostic, and monitoring markers are still missing. Recently, mitochondrial research opened a new perspec-

* Częściowo finansowane z projektu N401 2327 33 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

** W okresie opracowania tekstu była stypendystką Studium Medycyny Molekularnej Akademii Medycznej w Warszawie oraz FEBS Collaborative Experimental Scholarship for Central & Eastern Europe, Fulbright Junior Research Grant i The Kosciuszko Foundation Scholarship.

tive. The participation of abnormalities of those organelles and mutations of the mitochondrial genome has been defined in some types of cancer and is still under investigation. MtDNA mutations are also found in endometrial adenocarcinoma, although their impact on cell physiology has not been determined so far. Some processes involving mitochondria are widely known and described in numerous papers. These include electron transport and apoptosis, but others await further research. A forward genetics approach has been used in a wide spectrum of projects in which cancer tissue samples were collected from subjects with defined diagnoses and metabolic abnormalities and mtDNA mutations were checked. Thanks to this approach, characteristic patterns of mitochondrial disruption have been assigned to specific types of cancer. This review focuses on the molecular characteristics of endometrial adenocarcinoma with special focus on mitochondrial abnormalities. Research on cancer molecular pathology in endometrial adenocarcinoma may lead to the development of specific screening and/or diagnostic markers.

Key words: endometrial carcinoma • endometrial adenocarcinoma • cancer biology • molecular markers • mitochondria • mtDNA mutations

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=868191>

Word count: 3910

Tables: 4

Figures: –

References: 66

Adres autora: dr n.med. Wojciech Kukwa, Klinika Otolaryngologii Oddziału Stomatologii AM, Szpital Czerniakowski, ul. Stepińska 19/25, 00-739 Warszawa; e-mail: wkukwa@yahoo.pl

WPROWADZENIE

Proces transformacji nowotworowej jest jednym z najintensywniej badanych we współczesnej nauce. Choroba nowotworowa zaczyna się zwykle od zmian w pojedynczej komórce. W wyniku procesu transformacji nabywa ona cechy, które umożliwiają nieograniczoną proliferację niezależną od otrzymywanych czynników wzrostu, uniknięcie apoptozy i inhibicji kontaktowej oraz zdolność do migracji w organizmie i tworzenie przerzutów. Zmiany te są spowodowane głównie kolejnymi mutacjami w ważnych dla komórki genach: genach supresorowych, onkogenach i genach naprawy DNA [4]. Mimo ogólnego podobieństwa, każdy nowotwór ma swoją własną specyfikę, dlatego też ważne jest poznanie podłoża molekularnego określonego typu choroby.

Szacuje się, iż w krajach Unii Europejskiej w 2015 r. choroby nowotworowe będą przyczyną około 1 250 000 zgonów, czyli prawie 130 000 więcej niż w 2000 r. (co stanowi około 11% wzrost) [46]. Gruczolakorak błony śluzowej trzonu macicy (dalej nazywany skrótowo rakiem endometrium) jest najczęściej występującym rakiem ginekologicznym na świecie. Szacuje się, iż rocznie zapada na niego prawie 142 000 kobiet [1]. Najwięcej przypadków rozpoznaje się między 55 a 59 rokiem życia. Według Polskiego Krajowego Rejestru Nowotworów w 2004 r. raka endometrium wykryto u 4 193 pacjentek, co czyni go trzecim pod względem zachorowalności nowotworem u kobiet w naszym kraju. W tym samym czasie rak endometrium był przyczyną zgonu 794 kobiet, głównie między 70 a 74 rokiem życia [63].

Obraz kliniczny nowotworu endometrium

Wyróżnia się dwa typy raka endometrium [6]:

– typ I – endometrioidalny i

– typ II – nieendometrioidalny.

Typ I jest to rak estrogenozależny, którego stadium przedrakowe charakteryzuje się atypową hiperplazją endometrium. Chorują na niego głównie kobiety w okresie okołomenopauzalnym, mające nadwagę i objawy hiperestrogenizmu, jako że etiopatogeneza tego nowotworu jest związana z nadmiernym działaniem estrogenów. Do tego typu zalicza się większość diagnozowanych nowotworów (około 80%). Zwykle dobrze prognozuje (określaną jako odsetek przeżyć 5-letnich). Typ II zazwyczaj jest związany z atrofią endometrium, brakiem wyżej wymienionych zaburzeń i gorszym rokowaniem [6,45].

Stopień klinicznego zaawansowania raka endometrium ocenia się najczęściej na podstawie klasyfikacji opracowanej przez International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) – tzw. staging. Klasyfikacja ta określa stadium choroby na podstawie badania preparatu chirurgicznego. Podobną do niej jest klasyfikacja TNM (T – wielkość guza, N – zajęcie węzłów chłonnych, M – odległe przerzuty) opracowana przez International Union Against Cancer (UICC) [14]. Drugim parametrem jest tzw. grading, czyli stopień zróżnicowania histopatologicznego nowotworu: G1 (wysoko zróżnicowany), G2 (umiarkowanie zróżnicowany), G3 (słabo zróżnicowany) [14].

Czynniki wpływające na ryzyko wystąpienia nowotworu endometrium

Przyczyną większości zachorowań na raka endometrium jest przedłużona ekspozycja na estrogeny niezrównoważona działaniem progesteronu (tabela 1). U kobiet w wieku premenopauzalnym najistotniejszym czynnikiem ryzyka jest obniżony poziom progesteronu, podczas gdy u kobiet

Tabela 1. Czynniki wpływające na ryzyko rozwoju raka endometrium (wg [1], zmodyfikowano)

Czynniki wpływające na ryzyko rozwoju raka endometrium	
zwiększają	zmniejszają
nadmierna ekspozycja na estrogeny	doustna antykoncepcja hormonalna
wiek	wielorództwo
nadwaga/otyłość	aktywność fizyczna
brak dzieci/bezplodność	palenie papierosów
PCO	
leczenie tamoksyfenem	
zespół Lynch II w rodzinie	
nieprawidłowa HTZ	

po menopauzie jest nim podwyższony poziom estrogenów. Przyczyną nierównowagi endokrynologicznej może też być nieprawidłowo prowadzona hormonalna terapia zastępcza (HTZ). Hiperestrogenizm w wieku pomenopauzalnym jest spowodowany głównie nadwagą (po menopauzie podstawowym źródłem estrogeny jest przemiana androgenów w tkance tłuszczowej). U młodszych kobiet nadwaga sprzyja nieregularnym, bezowulacyjnym cyklom; obniżonemu poziomowi progesteronu, wcześniejszej pierwszej miesiączce i opóźnionej menopauzie, a co za tym idzie przedłużonej ekspozycji na estrogeny. BMI (indeks masy ciała) powyżej 25 kg/m² podwaja ryzyko zachorowania, a BMI powyżej 30 kg/m² zwiększa je nawet trzykrotnie [1]. Szacuje się, iż nadwaga może mieć udział w rozwoju prawie połowy przypadków raka endometrium w Europie i USA [12]. Ryzyko zachorowania na raka endometrium wzrasta z wiekiem. Brak potomstwa, zwłaszcza związany z bezplodnością także sprzyja rozwojowi choroby. Kobiety cierpiące na zespół policystycznych jajników (PCO) są również w grupie podwyższonego ryzyka zachorowania, podobnie jak chore na raka piersi, zwłaszcza leczone tamoksyfenem (na rynku są już leki nowej generacji, które mogą nawet odwrócić jego działanie na endometrium) [37]. Kobiety, w których rodzinie rozpoznano zespół Lynch II, są również zagrożone rozwojem tego nowotworu [1].

Istnieją dane epidemiologiczne sugerujące, iż aktywność fizyczna może obniżać ryzyko wystąpienia nowotworu endometrium, a mechanizm tego zjawiska nie został jeszcze dokładnie zbadany. Przypuszcza się, iż aktywność fizyczna może wpływać na szlaki insulinozależne, poziom endogenych hormonów płciowych i utrzymywanie równowagi energetycznej. Dokładniejsze badania mówią o wpływie na stan zapalny, funkcje systemu immunologicznego, metabolizm estrogenów i szlaki przekazywania sygnałów w komórce [12]. Palenie papierosów zmniejsza ryzyko wystąpienia raka endometrium ze względu na swój ujemny wpływ na wytwarzanie i metabolizm estrogenów. Czynnikiem ochronnym jest też wielorództwo, gdyż ciąży to okres intensywnego wytwarzania progesteronu. Podobnie działają doustne środki antykoncepcyjne (preparaty dwuskładnikowe), które regulują gospodarkę hormonalną organizmu [1,35]. Wyżej wymienione czynniki dotyczą ryzyka rozwoju raka typu I. Analogiczne dane dla nowotworów nieestrogenozależnych nie są znane [38].

Czynniki prognostyczne nowotworu endometrium

Najważniejszym czynnikiem prognostycznym w przypadku nowotworu endometrium jest stadium zaawansowania klinicznego. Powszechnie stosowana klasyfikacja FIGO pozwala prognozować przeżycie: stopień pierwszy jest niemal w 100% wyleczalny, podczas gdy przeżycie 5-letnie zmniejsza się wraz z postępującym zaawansowaniem choroby. Prognoza zależna jest również od typu histologicznego raka. Chore z rozpoznanym typem I nowotworu mają lepsze rokowanie. Ważne jest też zróżnicowanie nowotworu: bardziej zróżnicowane lepiej rokują. Podobnie jest ze stanem receptorowym raka endometrium: obecność receptorów zarówno estrogeny jak i progesteronu jest dobrym czynnikiem prognostycznym [45].

Obecnie postuluje się jednak, iż wiarygodnym czynnikiem rokowniczym może być nieprawidłowa ekspresja genów supresorowych czy protoonkogenów, którą stwierdza się w raku endometrium. Prowadzonych jest wiele badań mających na celu ustalenie związku między zaburzeniem ekspresji a prognozą dotyczącą rozwoju choroby [45]. Podobnie mutacje i polimorfizmy mitochondrialnego DNA stwierdzone w raku endometrium mogą mieć wartość prognostyczną w tej chorobie [61].

GENY I BIAŁKA ZMIENIONE W RAKU ENDOMETRIUM

Dokładniejsze badania raka endometrium wykazały, iż dwa wyróżniane klinicznie typy tego nowotworu charakteryzują się również odmiennymi zmianami molekularnymi identyfikowanymi w nowotworach (tab. 2 i 3). Do białek, których ekspresja najczęściej ulega zaburzeniu należą: w typie I głównie PTEN, receptory progesteronowe i estrogenowe, β-katenina; w typie II głównie HER2/neu i p53. Do genów najczęściej zmutowanych w raku endometrium należą: w typie I *PTEN*, *KRAS*, w typie II *TP53*, *HER2/neu*. Podział ten nie jest ścisły, ponieważ wymienione zaburzenia obserwuje się we wszystkich rodzajach raka endometrium. Częstym zjawiskiem w raku endometrium typu I jest niestabilność mikrosatelitarna (MSI), a obserwowane zmiany niekiedy znacznie różnią się częstotliwością występowania w obrębie jednego typu nowotworu. Oprócz charakterystycznych zmian stwierdza się

Tabela 2. Białka o zmienionej ekspresji w raku endometrium

Lp.	Białko	Ekspresja	Typ raka	Grading	Staging	Przeżycie/prognoza	Uwagi	L.b. Ref.
Supresory								
1	PTEN	obniżona	PC, I i II	nb–	nb	nb	zaburzona (75%) w PC, 97% typ I (61% brak), 25% typ II zaburzenia ekspresji PTEN są wczesnym zdarzeniem w rozwoju r. e. typu I	53 [38]
2	PTEN	brak	I i II	1–3	I–IV	nb	brak korelacji pomiędzy zaburzoną ekspresją a typem, wiekiem, FIGO, grading/ brak w 40% i.s. G1 i G2 (gł. typ I) większa redukcja niż w G3 w zaawansowanych stadiach	92 [21]
3	PTEN	obniżona	I	1–3	I–IV	i.s. obniżona ekspresja koreluje z krótszym przeżyciem	i.s. obniżona w porównaniu do normalnego i hiperplazmatycznego	29 [16]
4	PTEN	obniżona	I	1–3	I–IV	nb	i.s. niższa w G1 w porównaniu do G3; i.s. mniejsza w próbkach ER+/PR+; brak związku ze stopniem	117 [25]
5	p53	nadekspresja	I i II	1–3	I–IV	i.s. koreluje/nie koreluje z przeżywalnością	skorelowana z wysokim G, typem II, wysokim stadium	139 [16]
6	p53	nadekspresja	I	Nb	I–IV	i.s. nadekspresja koreluje ze złą prognozą; i.s. istotnie częstsza nadekspresja przy nawrotach lub śmierci niż przy braku nawrotów (50% vs 14,7%)	nie częstsza w wyższych stadiach (III i IV)	221 [23]
7	p53	akumulacja	I i II	1–3	I–IV	i.s. pacjentki z akumulacją p53 w jądrze mniejsza szansa braku nawrotu choroby	brak korelacji między zaburzoną ekspresją a typem, wiekiem, FIGO, grading	92 [21]
8	p21WAF1/ CIP1	obecna	I	Nb	IA–IIIB	nb	i.s. korelacja obecności białek p21 i RUNX1/AML1 w IC: możliwa rola w inwazji mięśniówki	74 [44]
9	p16	obecność	I i II	1+2<3	I–IV	nb	pomocny w rozróżnieniu rodzajów raka/i.s. różnica pomiędzy typami	97 [47]
10	p27	obniżona	I	1–3	I–IV	brak wpływu	i.s. ekspresja obniżona w raku w porównaniu do normalnej tkanki	29 [16]
Onkogeny								
11	α-katenina	błonowa i jądrowa (2)	I i II	3	nb	nb	i.s. zwiększona w obrębie krańca nowotworu w porównaniu do części centralnej: możliwa rola w inwazji/typ I ekspresja błonowa, typ II ekspresja błonowa i jądrowa	93 [36]
12	α-katenina	obecność	no!	1–3	I–IV	nb	29 na 76 (38%)	76 [18]
13	HER2/neu	nadekspresja	II	Nb	I–IV	brak związku z przeżyciem	nadekspresja w 14 na 55 próbek (25%)	55 [29]
14	HER2/neu	obecność	I i II	1–3	I–IV	i.s. predyktor przeżycia: wysoka ekspresja śmierć w 62%, niska ekspresja – 12% zgonów;	i.s. wysoka ekspresja – dobra odpowiedź na terapię adiuwantami	76 [49]
15	HER2/neu	obecność	II	Nb	określony	i.s. dłuższe przeżycie przy braku nadekspresji	i.s. korelacja z neoangiogenezą, przerzutami i zaawansowanym stadium	68 [57]
16	HER2/neu	obecność	II	Nb	–IV	nb	nadekspresja obecna w 80% przypadków	10 [52]

Tabela 2. c.d. Białka o zmienionej ekspresji w raku endometrium

Lp.	Białko	Ekspresja	Typ raka	Grading	Staging	Przeżycie/prognoza	Uwagi	L.b. Ref.
Białka uczestniczące w naprawie DNA								
17	hMLH1	obecna/brak	I i II	1-3	I-IV	nb	obecna: typy I (65%), II (68%); i.s. przy braku ekspresji częstsze mutacje w genie BRAF	97 [17]
18	hMSH2	obecna/brak	I i II	1-3	I-IV	nb	obecna: typy I (96%), II (89%)	97 [17]
Receptory								
19	PRA	obecna	I	1>2>3	I, II>III, IV	↑ (95,6%)/96,4	i.s. częstsze w początkowych stadiach choroby	103 [50]
20	PRB	obecna	I	1>2>3	I, II>III, IV	↑ (71,1%)/84,3	i.s. częstsze w początkowych stadiach choroby	103 [50]
21	PR(og)	obecna	I i II	1+2>3	I-IV	koreluje z lepszą prognozą	wysoko zróżnicowane – >60%, nisko zróżnicowane 14,3%	47 [58]
22	PR	obecna	I i II	1+2>3	I-IV	nb	pomocny w rozróżnianiu typów/i.s. większa ekspresja w mało zróżnicowanych (83%>42%) stadiach	97 [47]
23	ER	obecna	I i II	1+2>3	I-IV	nb	pomocny w rozróżnianiu typów raka; G1+2(84%)>G3(50%)	97 [47]
24	ERβ2/βcx	obniżona	I	1,2	określona	nb	i.s. obniżona ekspresja w porównaniu do zdrowego endometrium, i.s. obniżona w G2 w porównaniu do G1	26 [10]
25	ER/PR	status	I i II	1,2,3	nb	i.s. ER+/PR+ dłuższe przeżycie w typie I (5 i 10-letnie), ER-/PR-krótsze przeżycie, ważniejsze PR od ER	i.s. im niższe G tym więcej obu rodzajów receptorów	111 [56]
26	GRP30	podwyższona	I i II	1<2+3	I-IV	zwiększona ekspresja = gorsza prognoza: niska ekspresja+I/II-> przeżycie 100% wysoka ekspresja+III/IV-> przeżycie 37,5%	i.s.: pozytywna korelacja z ekspresją EGFR negatywna z ekspresją PR	47 [58]
27	EGRF	obecność	II	Nb	I-IV	brak związku z prognozą i przeżyciem	stwierdzona w 45 na 55 próbek(82%)	55 [29]
Antygeny								
28	RCAS1	podwyższona	I i II	1_3	I-IV	może pomóc wykrywać nowotwór	i.s. podwyższone stężenie w surowicy w porównaniu do zdrowych kobiet	54 [59]
29	CD105	podwyższona	I i II	1-3	I-IV	i.s. podwyższona koreluje z krótszym przeżyciem		90 [15]
30	CA-125	obecna	I i II	1-3	I-IV	nb	i.s. korelacja ze zróżnicowaniem nowotworu, pomocna przy diagnostyce różnicowej	90 [39]
Metaloproteiny								
31	MMP-2	cytoplazma, błona	I i II	3	nb	nb	i.s. w typie I w porównaniu do II; typ II: i.s. zwiększona w komórkach zrębowych w porównaniu do rakowych i.s. zwiększona w obrębie krańca niż części centralnej	93 [36]
32	MMP-7	cytoplazma, błona	I i II	3	nb	nb	i.s. zmniejszona ekspresja w komórkach rakowych w porównaniu do zrębowych w obu typach	93 [36]
33	MMP-9	cytoplazma, błona	I i II	3	nb	nb	i.s. zmniejszona ekspresja w komórkach rakowych w porównaniu do zrębowych	93 [36]

Tabela 2. c.d. Białka o zmienionej ekspresji w raku endometrium

Lp.	Białko	Ekspresja	Typ raka	Grading	Staging	Przeżycie/prognoza	Uwagi	L.b. Ref.
Białka związane z apoptozą								
34	survivina	podwyższona	I	1–3	I–IV	brak wpływu	i.s. podwyższona w stosunku do normalnego i hiperplazmatycznego endometrium	29 [16]
Cykl komórkowy								
35	14-3-3σ	obniżona, brak	I	1–3	I–IV	i.s. zanik ekspresji koreluje z przeżyciem i nawrotem choroby	wykryta w 78 na 103 (75,3%)	103 [22]
36	14-3-3σ	obniżona, brak	I	Nb	nb	nb	ekspresja w 26 na 46 (56,5%)	46 [34]
37	Cyklina A		I i II	1–3	I–IV	i.s. nadekspresja koreluje z przeżyciem (zła prognoza)	i.s. podwyższona w G2 i G3 w stosunku do G1	82 [55]
38	Cyklina D1	podwyższona	I i II	1–3	I–IV	brak związku	i.s. podwyższona ekspresja w stopniu III i IV w porównaniu do I i.s. podwyższona w G2 i G3 w stosunku do G1	82 [55]
Markery proliferacji								
40	Ki-67	obecność	I i II	1–3	I–IV	nb	koreluje ze staging, grading, i.s. zwiększona ekspresja w 24 na 82 (41%), i.s. większa w G3 (29%) niż G1 (11%)	81 [55]
Inne								
41	GLUT1	podwyższona	I i II	nb	określony	im większa ekspresja tym gorsza prognoza	wzrasta z malejącym zróżnicowaniem	65 [20]
42	GLUT8	podwyższona	I i II	nb	określony	im większa ekspresja tym gorsza prognoza	wzrasta z malejącym zróżnicowaniem	65 [20]

Oznaczenia: PTEN – homolog fosfatazy i tensyny; HER2/neu – receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2; hMLH – ludzki homolog mutL1; h-MSH2 – ludzki homolog Muts; PR – receptor progesteronowy; ER – receptor estrogenowy; GRP – receptor estrogenowy związany z białkiem G; MMP – metaloproteinaza; EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu; GLUT – transporter glukozy; typ raka: histologiczny, grading – zróżnicowanie (wg FIGO); staging – stopień (wg FIGO); PC – tkanka ze stadium przedrakowego (hiperplazmatyczne); nb – nie badany, i.s. – istotne statystycznie; ni.s. – nieistotne statystycznie.

także wiele innych nieprawidłowości w komórce, nie są one jednak gruntownie przebadane, dlatego dotychczas jako istotne markery można zaproponować:

1. Poziom ekspresji białka PTEN i mutacje w genie *PTEN*.
2. Obecność zaburzeń ekspresji p53 i mutacje genu kodującego *TP53*.
3. Atatus receptorów steroidowych ER i PR.
4. Obecność MSI.

Ponadto badania wskazują, iż wiele innych molekuł (np.: GRP30, CD105, 14-3-3σ, GLUT1, GLUT8) może być wiarygodnymi czynnikami diagnostycznymi i prognostycznymi. Istnieje jednak potrzeba systematycznych badań, tak by dokładnie móc skorelować parametry kliniczne ze zmianami molekularnymi, ponieważ na podstawie niewielu badań można wyciągnąć prawidłowe wnioski. Określenie typu, staging, grading wydaje się standardem, jednak te parametry nie są analizowane we wszystkich badaniach molekularnych, w których dodatkowo analizowana populacja jest reprezentatywna dla chorych (nieliczna populacja). Wiarygodną analizę komplikuje dodatkowo to, iż badania z różnych ośrodków są częstokroć nieporównywalne (techniki, odczynniki). Dobrym rozwiązaniem wydaje się ujednoczenie/ustanowie-

nie standardów badań, które obowiązywałyby wszystkich badaczy zajmujących się rakiem endometrium. Taka systematyzacja wprowadziłaby porządek, umożliwiła porównywanie badań i być może pozwoliłaby na poznanie mechanizmów mających największy udział w powstawaniu tej choroby. Umożliwiłoby to wyciąganie wniosków aplikacyjnych dla rutynowych procedur medycznych.

ROLA ZABURZEŃ MITOCHONDRIALNYCH W RAKU ENDOMETRIUM

Zainteresowanie rolą mitochondriów w nowotworach rozpoczęło się w połowie ubiegłego wieku, kiedy Otto Warburg stwierdził, iż komórki nowotworowe wytwarzają energię w procesie glikolizy, a nie fosforylacji oksydacyjnej [62]. Odkrycie to (z pewnym opóźnieniem) pociągnęło za sobą lawinę badań mających na celu ustalenie rzeczywistej roli tych fascynujących organelli w procesie nowotworzenia. Od tamtej pory mutacje mtDNA wykryto w różnego rodzaju nowotworach [13]. Podczas, gdy wykazano udział mutacji mtDNA w powstawaniu pewnych typów nowotworów (np. prostaty [43]), w innych udział ten pozostaje niepewny [65]. Część naukowców poddaje w wątpliwość dotychczas otrzymane wyniki, sugerując, iż wiele z nich jest wynikiem błędów proceduralnych [51]. Bardzo mocno podkreślają oni

Tabela 3. Geny zmutowane w raku endometrium

Lp.	Gen zmutowany/ marker	Rodzaj mutacji/ zmiany	Typ raka	Grading	Staging	Przeżycie/prognoza	Uwagi	L.b. Ref.
Supresory								
1	<i>PTEN</i>	no, LOH	PC i I	1-3	1-4	nb	mutacje genu <i>PTEN</i> w stanach przedrakowych mogą być predyktorem kancerogenezy (55% mutacji w PC i 83% w typie I)	59 [38]
2	<i>PTEN</i>	non, del, ins, punktowe	I i II	1-3	IA-IVB	nb	34,3% próbek zawierało różnego rodzaju mutacje, 21 na 24 w typie I	70 [48]
3	<i>PTEN</i>	fs, mis, non	I i II	1-3		nb	brak korelacji między grading, staging; częstsze w typie I niż w II	38 [8]
4	<i>TP53</i>	punktowe	I i II	1-3	I-IV	nb	I (12%) i II (68%)	97 [17]
Onkogeny								
5	<i>BRAF</i>	punktowe	I i II	1-3	I-IV	nb	brak mutacji w tkance zdrowej, brak korelacji ze stopniem, i.s. częściej przy braku ekspresji hMLH1 mutacje w 21% przypadków	97 [17]
6	β - <i>katenina</i>	punktowe, LOH	nb	1-3	I-IV	nb	mutacje znaleziono w 10 na 76 próbek (13,2%)	76 [18]
7	<i>HER2/neu</i>	amplifikacja	II	nb	I-IV	brak wpływu na prognozę/przeżycie	wykryta w 11 na 55 przypadkach (20%)	55 [29]
8	<i>KRAS</i>	punktowe	PC, I i II	1-3	I-IV	posiadanie mutacji → dobra prognoza	mutacje wykryte: 14 na 89 (16%) PC, 15 na 84 (18%) - 12 typ I, 3 typ II	173 [53]
9	<i>KRAS</i>	punktowa	I i II	określono	I-IV	brak związku z prognozą	mutacje wykryto w 12 próbkach 10 typu I i 2 typu II	112 [9]
10	<i>KRAS</i>	punktowe	I i II	1-3	I-IV	nb	stwierdzono w 18 na 97 (19%) próbek	97 [17]
MSI								
11	<i>BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250</i>	MSI	I i II	1-3	I-IV	i.s. MSI+ predyktorem braku nawrotu choroby i przeżycia mimo choroby; i.s. w stadiach zaawansowanych koreluje z dłuższym przeżyciem; korelacja między MSI a staging	i.s. MSI częstsze w typie I (94%) niż II (23%), i.s. MSI częściej w zaawansowanych stadiach choroby (>IB); i.s. MSI częściej przy inwazji mięśniówki niż bez (92% v 78%)	473 [5]
12	<i>BAT26, BAT40, D10S187, D18S55, D18S258</i>	RER(MSI)	I i II	1-3	I-IV	brak korelacji z prognozą/przeżyciem	RER+ obecny w 45% przypadków	259 [32]

Oznaczenia: *PTEN* – phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, *TP53* – tumor protein p53, *HER2/neu* – human epidermal growth factor receptor 2; typ raka: histologiczny, grading – zróżnicowanie (wg FIGO), staging – stopień (wg FIGO); L.b. – liczba badanych, nb – nie badano, i.s. – istotne statystycznie, rodzaje mutacji: LOH – utrata heterozygotyczności, non – nonsense, mis – missense, fs – frameshift.

potrzebę ustanowienia wysokich standardów we wszelkich eksperymentach mających styczność z mtDNA [66].

Tlenowa glikoliza komórek nowotworowych

Już w latach 50. XX w. Warburg zauważył, iż w komórkach nowotworowych zaburzony jest proces oddychania, a jedną z podstawowych cech nowotworów jest nadmierne wytwarzanie kwasu mlekowego, będące wynikiem kom-

pensacyjnego wzrostu stężenia glikolizy [62]. Stwierdzenie tego faktu dało podstawy do rozważania udziału mitochondriów (a raczej ich patologii) w procesie nowotworzenia. Dzięki pozytonowej emisyjnej tomografii komputerowej (używając fluorodeoksyglukozy) okazało się, iż fenotyp glikolityczny jest charakterystyczny dla większości nowotworów [19]. Szczegółowe badania metabolizmu komórek rakowych wykazały, iż w przypadku raka wątroby znacząco zmienia się stosunek ekspresjowanych heksokinaz: zamiast

charakterystycznej dla hepatocytów glukokinazy (heksokinazy IV), większość puli enzymu (nawet do 70%) stanowi heksokinaza II. Okazało się, iż ekspresja tego enzymu może być regulowana (pozytywnie) przez wiele czynników m.in.: glukozę, insulinę, glukagon, cAMP, demetylację promotora, zmutowane *TP53* czy hipoksję (HIF-1), a jak wiadomo te dwa ostatnie są charakterystyczne dla wielu komórek nowotworowych [19,33,40]. Heksokinaza II wykazuje znacznie większe powinowactwo do glukozy niż heksokinaza IV i w przeciwieństwie do niej jest wrażliwa na inhibicję glukozy-6-fosforanem (G-6-P). Po fosforylacji enzymu (heksokinazy II) przez kinazę AKT (która bierze udział w przekazywaniu sygnałów od różnych onkogenów), może on wiązać się do białka zewnętrznej błony mitochondrialnej VDAC (napęciowozależny anionowy kanał jonowy biorący udział w transporcie ATP-zależnym). Rezultatem tego zdarzenia jest ułatwienie szybkiej fosforylacji glukozy do glukozy-6-fosforanu, a także uniewrażliwienie enzymu na hamowanie przez G-6-P, co obserwujemy jako przełączenie metabolizmu z tlenowego na glikolityczny, który umożliwia wzrost komórkom nowotworowym w warunkach braku tlenu. Drugim następstwem wiązania się z VDAC jest stabilizacja mPTP i inhibicja apoptozy przez blokowanie proapoptotycznej działalności Bax i Bak [7,40].

Mutacje mtDNA w nowotworach

Mitochondria będące niezwykle istotną strukturą komórki eukariotycznej niosą swój własny genom (mtDNA) tak często uszkodzony w komórkach raka. Liczy on 16569 pz [2] i koduje 13 białek będących składnikami kompleksów łańcucha oddechowego, 22 tRNA, 2 rRNA – 12S i 16S. Kodowane białka to: 7 z 46 podjednostek kompleksu I (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6); jedną z 11 podjednostek kompleksu III (cytochrom b); trzy z 13 podjednostek kompleksu IV (CO I, II, III) i dwie z 16 podjednostek syntazy ATP (ATP 6 i 8) [60]. W mtDNA znajduje się też region kontrolny o długości około 1000 pz. Obecne w nim są: promotor transkrypcji nici ciężkiej H (P_H); promotor nici lekkiej (P_L); miejsce wiążące mitochondrialny czynnik transkrypcyjny (mtTFA); 3 konserwowane bloki (CSB I-III), początek replikacji nici ciężkiej i sekwencja terminacyjna (TAS) [7].

Częstszą mutację mtDNA stwierdzono w wielu rodzajach nowotworów, m.in.: pęcherza moczowego, mózgu, piersi, jelita grubego, głowy i szyi, płuc, jajnika, prostaty, tarczycy czy endometrium [7]. Wszelkiego rodzaju mutacje wykrywa się średnio w 30–35% spośród nich [24]. Samo zwiększenie liczby mutacji mtDNA, nie mówi nic o ich roli w nowotworzeniu, jeżeli jednak weźmie się pod uwagę udział mitochondriów w tak ważnych procesach jak oddychanie komórkowe, apoptoza czy wytwarzanie RFT (reaktywne formy tlenu), istnieją podstawy by sądzić, że ich rola w procesie transformacji nowotworowej jest bardzo ważna [13]. Powstaje trudne zadanie połączenia funkcjonalnego mutacji mtDNA z fenotypem nowotworowym [3]. Dotychczasowe badania funkcjonalne na myszach bezgrasiczych wykazują, iż zmiana w obrębie mtDNA (i idąca za tym wzrost RFT) może się przyczynić do powstania nowotworu [43].

Mutacje mtDNA mogą zachodzić w komórkach linii płciowej bądź w komórkach somatycznych [60]. Pojedyncza mu-

tacja nie ma szkodliwego działania, ponieważ w mitochondrium znajduje się wiele kopii mtDNA. Stan, w którym w komórce znajduje się więcej niż jeden rodzaj mtDNA nazywamy heteroplazmią. Do ujawnienia się określonego fenotypu potrzebny jest określony procent zmutowanych cząsteczek mtDNA. W wyniku wielokrotnych podziałów zmutowanych i prawidłowych mtDNA może nastąpić segregacja w kierunku prawidłowej homoplazmii bądź homoplazmatycznej mutacji. Badania wykazują, iż większość mutacji w nowotworach jest homoplazmatyczna. Jedną z hipotez tłumaczy to zjawisko przewagą replikacyjną zmutowanych mitochondriów nad prawidłowymi. Inna traktuje to zjawisko jako losowe, które towarzyszy podziałom komórek nabłonkowych (tu czynnikiem selekcyjnym są mutacje jądrowe) [43]. W przypadku komórek z zaburzonymi procesami oddechowymi stwierdzono, iż mają więcej mitochondriów i wiele mutacji mtDNA w takich komórkach jest homoplazmatycznych. Jak do tego dochodzi? Mitochondria utleniają NADH (powstałe w czasie utleniania substratów energetycznych) w wyniku czego powstaje H_2O i ATP. Zaburzenia procesu fosforylacji oksydacyjnej prowadzą do zmniejszonego wytwarzania ATP, a tym samym zmniejszy się stosunek NADH/NAD⁺, co powoduje, iż środowisko komórki staje się bardziej zredukowane. Poziom zredukowania może być monitorowany przez różnego rodzaju czynniki transkrypcyjne, takie jak np. czynnik wiążący REBOX, który wiążąc się do 5' cis-elementów genów kodujących białka związane z bioenergetyką i biogenezą mitochondriów, aktywuje ich replikację. Zatem uszkodzenia mtDNA mogą same indukować powielanie zmutowanego mtDNA. Jest prawdopodobne, iż ten mechanizm dotyczy również komórek nowotworowych [11].

Ogólnie mutacje mtDNA w nowotworach możemy podzielić na 2 klasy:

- uszkadzające łańcuch oddechowy – powodują wzrost RFT i w efekcie stymulują proliferację komórek nowotworowych,
- adaptacyjne – pomagają komórkom nowotworowym przystosować się do beztlenowego środowiska [60].

Mutacje mitochondrialne biorące udział w nowotworzeniu mogą dotyczyć zarówno komórek linii płciowej (mówi się tu głównie o ich roli predysponującej do nowotworu), jak i komórek somatycznych (zwykle mutacja pojawia się w określonym rodzaju tkanki w okresie postmitotycznym). W komórkach linii płciowej dwa polimorfizmy do tej pory zostały połączone z większym ryzykiem zachorowania na nowotwory. Mowa tu o mutacji w genie *ND3*, gdzie zamiast guaniny w miejscu 10398 znajduje się adenina. Jej obecność zwiększa ryzyko wystąpienia inwazyjnego raka piersi u Afroamerykanek, ale nie u kobiet rasy kaukaskiej [60]. Analiza populacyjna wykazała, iż mutacje w komórkach linii płciowej genu *COI* występują istotnie częściej u mężczyzn z rakiem prostaty niż bez. Co ciekawe, mutacje tego genu są dość częstym polimorfizmem wśród europejskiego mtDNA, co można wytłumaczyć tym, iż kobiety – nie chorując na raka prostaty – są nosicielkami owych wariantów mtDNA [43]. Mutacje zaś w komórkach somatycznych zostały stwierdzone w wielu rakach. Dotyczą one w wielu przypadkach rejonu kontrolnego [65].

Mutacje mtDNA mogą być umiejscowione w pętli D lub w obszarze kodującym białka łańcucha transportu elektro-

nów. Pętla D – region kontrolujący transkrypcję i replikację mtDNA – jawi się jako gorące miejsce mutacji w komórkach nowotworowych. Obejmuje ona dwa regiony superzmiennie – HV1 (16024-16383) i HV2 (57-333). Są one częstym miejscem zmian w nowotworach [65]. Obecność zwiększonej liczby mutacji w pętli D potwierdzono w wielu rodzajach nowotworów m.in.: wątroby, żołądka, trzonu i szyjki macicy, jajników, prostaty, jelita grubego i innych. Częstość owych mutacji różni się w zależności od typu raka – od 2% w przypadku raka żołądka do 90% w raku prostaty [41]. Zmiany w regionie promotorowym mogą zmieniać powinowactwo zarówno do induktorów, jak i modyfikatorów związanych z replikacją i transkrypcją mtDNA, a idąc dalej: zaburzać te procesy, jak się to dzieje np. w chorobie Alzheimera. Wykryte tam mutacje regionu kontrolnego powodują zmniejszenie liczby cząsteczek mtDNA i powodują obniżenie transkrypcji genu ND6. Jedną z często wykrywanych zmian jest mononukleotydowe powtórzenie w pozycji D310, które zidentyfikowano w nowotworach: piersi, jelita grubego, szyjki macicy, pęcherza moczowego, głowy i szyi oraz endometrium [24].

Mutacje w rejonie kodującym mtDNA wpływają na proces translacji i fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach. Mutacje te są znajdowane w całym rejonie kodującym [42], np.: genach kodujących kompleks I, III, IV (rak piersi, rak prostaty); 12S i 16S. Okazuje się, iż wiele nowotworów przejawia obniżoną aktywność łańcucha oddechowego [7], a badania wskazują, iż to RFT są odpowiedzialne za większość negatywnych skutków mutacji mtDNA [60].

Czynniki sprzyjające mutacjom mtDNA w nowotworze endometrium

Wiele czynników powoduje, iż mtDNA jest dużo bardziej narażone na mutacje niż DNA jądrowe. Jednym z nich jest zwiększone stężenie RFT, które mogą utleniać nie tylko mtDNA, ale i wszelkiego rodzaju białka znajdujące się w mitochondriach (np.: składniki łańcucha oddechowego czy enzymy metabolizmu podstawowego). W porównaniu do DNA jądrowego, materiał genetyczny w mitochondriach nie jest chroniony przez histony, aczkolwiek niektóre badania sugerują, iż TFAM (mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A) pełni w mtDNA rolę histonopodobną [26]. Nie do pominięcia jest również to, iż replikacja w tych organellach przebiega niezależnie i częściej od podziałów komórkowych, co sprawia, że mtDNA jest niemal ciągle narażony na czynniki uszkadzające i zwiększa się prawdopodobieństwo powstania zmutowanych cząsteczek mtDNA.

Częstsze mutacje są również wynikiem tego, iż mechanizmy naprawy mitochondrialnego DNA nie są tak sprawne w porównaniu z działającymi w jądrze komórkowym. Do tej pory udało się zlokalizować białka biorące udział w naprawie bezpośredniej uszkodzeń alkilacyjnych (DR) oraz przynajmniej po jednym z każdego z 5 etapów naprawy przez wycinanie nukleotydów (NER). Wykazano również aktywność naprawy błędnie sparowanych zasad (MMR), jednak nie zidentyfikowano białek biorących udział w tym procesie. Poza tym w mitochondriach zachodzi również naprawa rekombinacyjna (RER) [26]. Sugeruje się, iż niejednorodny stopień mutacji mtDNA w określo-

nych typach nowotworów może być spowodowany różnicami w mechanizmach naprawczych mtDNA w poszczególnych typach tkanek [28].

Kolejnym z czynników odpowiedzialnych za uszkodzenia mtDNA, mogą być mutacje genu kodującego polimerazę mitochondrialną gamma. Okazuje się, że zamiana kwasu asparaginowego na alaninę w domenie egz nukleolitycznej zwiększa błędne wstawianie zasad. Co ciekawe, obecność takiej zmutowanej polimerazy w mitochondriach nie zwiększyła wytwarzania RFT [30].

Wszystkie wyżej wymienione czynniki powodują, że częstość mutacji mtDNA jest prawie 10 razy większa w porównaniu do DNA jądrowego, co może się przyczynić do udziału mitochondriów w procesie transformacji nowotworowej [65].

Reaktywne formy tlenu (RFT) a nowotwór endometrium

Mitochondrialny łańcuch transportu elektronów generuje największe ilości RFT w komórce. Do RFT należą: anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru i rodniki hydroksylowe. Blokada przepływu elektronów powoduje zatrzymanie elektronów na kompleksach I-III, a zatem mutacja mtDNA zmieniająca wydajność łańcucha oddechowego może się przyczynić do zwiększonego wytwarzania RFT, które powstają, ponieważ niesparowane elektrony są przenoszone na tlen, powstają nadtlenki. Te z kolei ulegają przemianie przez znajdującą się w matriks manganową dysmutazę ponadtlenkową (MnSOD, *Sod2*) do wody utlenionej (w cytoplazmie i przestrzeni międzymbłonowej mitochondriów proces ten jest przeprowadzany przez Cu/ZnSOD (*Sod1*)). Stosunkowo stabilny w matriks nadtlenek wodoru może dyfundować do cytoplazmy, gdzie w obecności metali przejściowych powstają bardzo silnie reaktywne rodniki hydroksylowe (reakcja Fentona). Sama woda utleniona jest powoli zredukowana do wody poprzez peroksydazę glutationową w matriks i katalazę (enzym peroksyosomalny) [60].

Przypuszcza się, iż RFT w połączeniu z inaktywacją *p16ink4a*, oprócz uszkodzenia TP53, jest jednym z dwóch głównych mechanizmów nowotworzenia. Okazuje się, iż u myszy z delecją jednego allelu (heterozygotycznym knock-outem MnSOD) obserwuje się 100% wzrost występowania nowotworów. Mitochondrialne RFT mogą przyczynić się do powstania nowotworu na dwa sposoby:

- 1) Powodując mutacje w protoonkogenach i supresorach nowotworów: zwiększone wytwarzanie RFT skutkuje zwiększoną dyfuzją nadtlenu wodoru z mitochondriów, która w reakcji z metalami ciężkimi w jądrze generuje bardzo reaktywny rodnik hydroksylowy, ten zaś może dalej uszkadzać DNA jądrowe, w tym protoonkogeny, czyniąc je aktywnymi onkogenami. Poza tym w wyniku uszkodzeń DNA jądrowego uruchomione zostają systemy naprawy, m.in.: poliADPrybozylacja, która degraduje jądrowe NAD⁺. Jego degradacja i wysoki stosunek NADH/NAD⁺ inaktywuje deacetylazę histonową SIRT1, której nieobecność włącza transkrypcję genów będących w prawidłowych warunkach nieaktywnymi w tkankach postmitotycznych (np. onkogenów);

Tabela 4. Opisane dotychczas mutacje mtDNA w raku endometrium

Lp.	Rejon mtDNA	Typ mutacji	Nukleotydy	Zmiana	Piśmiennictwo
1	Pętla D	punktowa	152	T>C	[28]
2		punktowa	521	G>A	[28]
3		punktowa	294	T>C	[28]
4		delecja	289–346	50 pz delecja	[28]
5		mtMSI	303–309	C7>C8-11	[28,61]
6		mtMSI	514–523	[(CA)5](CA)4>(CA)5	[28,61]
7		mtMSI	16184–16193	[C5TC4]C7,C10-13>C7-C14	[28,61]
8		punktowa	650	T>C	[28]
9		punktowa	817	G>A	[28]
10		12S RNA	punktowa	879	T>C
11	mtMSI		956–960	[C5]C5,C6>C4-C7	[28]
12	mtMSI		956–965	C5>C11	[28,61]
13	16S RNA	punktowa	3163	G>A	[28]
14	ND2	punktowa	5213	G>A	[31]
15	tRNA-Agr	punktowa	10463	T>C	[31]
16		punktowa	10550	G>A	[31]
17	ND4L	punktowa	10551	T>C	[31]
18		punktowa	10640	T>C	[31]
19	tRNA-Leu(CUN)	punktowa	12308	A>G	[31]
20	tRNA- Ser (AGY)	punktowa	12258	C>G	[31]
21					

W kolumnie „Zmiana” [] oznacza sekwencję występującą w rCRS.

2) Poprzez stymulację proliferacji komórek: w małych stężeniach RFT zachowują się jak mitogeny, oddziałując z różnego rodzaju kinazami i czynnikami transkrypcyjnymi, czego następstwem mogą być podziały komórkowe [60].

Zatem w wyniku mutacji mtDNA zaburzającej przepływ elektronów przez łańcuch oddechowy, co skutkuje wzrostem wytwarzania RFT, może zostać uruchomiona kaskada wydarzeń prowadząca do transformacji nowotworowej [60].

Mutacje mitochondrialnego DNA w raku endometrium

Dotychczasowe badania mutacji mtDNA w raku endometrium wskazują na występowanie mutacji punktowych, delecji i mitochondrialnej niestabilności mikrosatelitarnej (mtMSI – mitochondrial microsatellite instability) (tabela 4). Liu i wsp. sekwencjonując pętlę D, geny kodujące 12S RNA i 16S RNA zaobserwowali mutacje mtDNA w ponad połowie badanych próbek (28/50) w tym: 2% delecji (289-346pz w pętli D), 14% mutacji punktowych (pz 152, 521, 294 w pętli D; 650, 817, 879 w genie kodujących 12S RNA, 3163 w genie kodującym 16S RNA) i w 50% mtMSI (303-309, 514-523, 16184-16193 w pętli D i 956-965 w 12S RNA). Większość wykrytych mutacji punktowych

stanowiły tranzycje T => C i G => A – mutacje charakterystyczne dla stresu oksydacyjnego (utlenianie zasad purynowych/pirymidynowych). Jednakże wykryto też liczne mutacje punktowe, co może świadczyć o licznych błędach replikacyjnych mitochondrialnej polimerazy gamma w komórkach nowotworowych [28].

Wang i wsp. analizowali następnie obecność mtMSI w 4 rodzajach nowotworów: endometrium, jajnika, szyjki macicy i piersi. Wśród 12 badanych markerów (4 z rejonu pętli D i 8 z rejonu kodującego), mtMSI zlokalizowano w 4 regionach mtDNA, przy czym tylko w raku endometrium znaleziono wszystkie 4, co jest zgodne z wcześniejszymi badaniami [28], tzn.: trzy z nich znajdują się w pętli D: 303-315 (najczęstsza), 514-523, 16184-16193; jedna w obrębie genu kodującego 12S RNA: 956-965. Markery mikrosatelitarne w pozycji 303 (C7TC5 w rCRS), 956 (C5TC4) i 16184 (C5TC4); mają bardzo podobną budowę – wszystkie zawierają trakt C przerwany przez T. To, że mtMSI jest obecna we wszystkich badanych markerach pętli D, a brak jej w pozostałych ośmiu markerach, świadczy o bardzo dużej podatności pętli D na mutacje [61].

Badania mutacji raka macicy wskazują na obecność mutacji w regionie superzmiennym I (HVI) [41]. Pojedyncze

mutacje punktowe w raku endometrium zidentyfikowała Lorenc i wsp. (tabela 4) [31]. Opisane zostały zmiany w regionie kodującym. Wszystkie mutacje z wyjątkiem C12258G były homoplazmatyczne. Rola znalezionych mutacji w nowotworzeniu nie jest znana, aczkolwiek były one stwierdzone w innych chorobach (np.: T10463C w syndromie Retta). Polscy badacze [54] wykazali obecność mutacji mtDNA w 4 z 40 przypadków raka endometrium. Co ciekawe, w żadnym wypadku mutacje nie były obecne w przyległych do raka tkankach ani hiperplazmatycznej tkance endometrium. Mutacje mtDNA współistniały ze zmianami w genomie jądrowym, tj.: utratą heterozygotyczności w genach supresorowych (RB1, TP53, *p16INK4A*).

Analizowano także wrodzone predyspozycje do rozwoju tego typu nowotworu. Nukleotydy 16184-16193 znajdują się na 3' końcu TAS (sekwencja terminacyjna) i w miejscu wiążącym podjednostkę 7S DNA. Wrodzony polimorfizm 16189T>C, wykryty w 14% raków endometrium, jest również związany z podwyższonym ryzykiem rozwoju raka piersi u kobiet i rozwojem glejaka. Ponadto, powiązany jest ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia cukrzycy typu 2, która jak wiadomo, jest czynnikiem ryzyka w etiologii raka endometrium i raka piersi. Dodatkowo w przypadku raka endometrium, polimorfizm (A/C 5178) charakterystyczny dla haplogrupy D (typowa dla południowo-wschodniej Azji) jest związany istotnie statystycznie z obecnością choroby [64].

Znaczenie funkcjonalne powyższych mutacji i polimorfizmów dla komórki jeszcze dokładnie nie poznano. Dotychczas przeprowadzone badania na innych nowotworach sugerują, że badanie mutacji w płęci D może mieć duże znaczenie kliniczne. Opisane wyniki dają nadzieję na możliwość przewidywania podwyższonego ryzyka zachorowania, szybkiego i precyzyjnego diagnozowania, zastosowania odpowiedniego leczenia dostosowanego do profilu indywidualnego pacjenta w przyszłości [27]. W przypadku raka endometrium nie zdołano jeszcze powiązać mutacji płęci D z odpowiedzią na terapię (chemio- lub radioterapia). Obecnie wiadomo, iż rejon 303-315 jest fragmentem CBSII i miejscem wiązania primera replikacyjnego. mtMSI w rejonie 303-309 w jest dość często spotykanym w innych rodzajach nowotworów. Nie wiadomo czy wpływa ona na replikację mtDNA [28]. Wpływ mtMSI na działanie podjednostki 12S RNA nie został dotąd zbadany,

można tylko przypuszczać, iż może ona mieć znaczenie w czasie translacji peptydów mitochondrialnych i pośrednio wpływać na proces fosforylacji oksydacyjnej. Nie jest też pewne czy homoplazmia wyżej wymienionych mutacji ma wpływ na funkcjonowanie mitochondriów. Powyższe niejasności stwarzają możliwości przeprowadzenia licznych eksperymentów w przyszłości.

PODSUMOWANIE

Ostatnie 20 lat badań nad rakiem endometrium wyjaśniło wiele faktów związanych z powstawaniem i rozwojem tego nowotworu. Poznano podstawowe przyczyny rozwoju I typu choroby (etiologia nowotworu typu II jest wciąż nieznaną). Zidentyfikowano też wiele charakterystycznych zmian molekularnych, takich jak chociażby zaburzenia ekspresji białka PTEN czy też kodującego go genu; mutacje w genach: *KRAS*, *BRAF*, *β-kateniny* (znajdowane głównie w rakach estrogenozależnych), zaburzenia w genach naprawy błędnie sparowanych zasad, mutacje wpływające na ekspresję p53 czy *HER2/neu*. Podczas gdy rola niektórych genów i ich produktów wydaje się ustalona, mechanizmy działania innych pozostają niepewne. Wciąż stwierdzane są nowe korelacje między określonymi rodzajami nowotworów a występowaniem markerów.

Biologia mitochondriów otwiera nowe możliwości w walce z rakiem. Szansa, iż stwierdzone do tej pory liczne zaburzenia mtDNA w wielu typach nowotworów są przypadkowe, jest niewielka. Zmiany takie zaobserwowano też w raku endometrium. Dokładna rola mitochondriów w nowotworzeniu nie jest w pełni znana. Analiza mitochondrialnego DNA należy do analiz ekonomicznych, zarówno pod względem czasu jak i pieniędzy, badanie tego aspektu nowotworzenia niesie szansę na nowe narzędzia mogące pomóc w określeniu ryzyka zachorowania i monitorowania przebiegu choroby.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Panu Przemysławowi Tomalskiemu (Centre for Brain and Cognitive Development, School of Psychology, Birkbeck College, UK) oraz Panu Radosławowi Ejsmontowi (Max Planck Institute of Cell Biology and Genetics, Technische Universität Dresden, Niemcy) za cenę uwagi i wskazówki podczas opracowywania tekstu.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Amant F., Moerman P., Neven P., Timmerman D., Van Limbergen E., Vergote I.: Endometrial cancer. *Lancet*, 2005; 366: 491-505
- [2] Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R., Young I.G.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981; 290: 457-465
- [3] Berneburg M., Kamenisch Y., Krutmann J., Rocken M.: 'To repair or not to repair - no longer a question': repair of mitochondrial DNA shielding against age and cancer. *Exp. Dermatol.*, 2006; 15: 1005-1015
- [4] Bertram J.S.: The molecular biology of cancer. *Mol. Aspects Med.*, 2000; 21: 167-223
- [5] Black D., Soslow R.A., Levine D.A., Tornos C., Chen S.C., Hummer A.J., Bogomolny F., Olvera N., Barakat R.R., Boyd J.: Clinicopathologic significance of defective DNA mismatch repair in endometrial carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 2006; 24: 1745-1753
- [6] Bokhman J.V.: Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, 1983; 15: 10-17
- [7] Brandon M., Baldi P., Wallace D.C.: Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*, 2006; 25: 4647-4662
- [8] Bussaglia E., del Rio E., Matias-Guiu X., Prat J.: PTEN mutations in endometrial carcinomas: a molecular and clinicopathologic analysis of 38 cases. *Hum. Pathol.*, 2000; 31: 312-317
- [9] Caduff R.F., Johnston C.M., Frank T.S.: Mutations of the Ki-ras oncogene in carcinoma of the endometrium. *Am. J. Pathol.*, 1995; 146: 182-188
- [10] Chakravarty D., Srinivasan R., Ghosh S., Gopalan S., Rajwansi A., Majumdar S.: Estrogen receptor beta1 and the beta2/betacx isoforms in nonneoplastic endometrium and in endometrioid carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2007; 17: 905-913
- [11] Coskun P.E., Ruiz-Pesini E., Wallace D.C.: Control region mtDNA variants: longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 2174-2176

- [12] Cust A.E., Armstrong B.K., Friedenreich C.M., Slimani N., Bauman A.: Physical activity and endometrial cancer risk: a review of the current evidence, biologic mechanisms and the quality of physical activity assessment methods. *Cancer Causes Control*, 2007; 18: 243–258
- [13] Czarnecka A.M., Golik P., Bartnik E.: Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. *J. Appl. Genet.*, 2006; 47: 67–78
- [14] Denny L., Hacker N.F., Gori J., Jones H.W., Ngan H.Y., Pecorelli S.: Staging classifications and clinical practice guidelines for gynaecologic cancers. http://www.figo.org/docs/staging_booklet.pdf (18.07.2008)
- [15] Erdem O., Taskiran C., Onan M.A., Erdem M., Guner H., Ataoglu O.: CD105 expression is an independent predictor of survival in patients with endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 2006; 103: 1007–1011
- [16] Erkanli S., Kayaselcuk F., Kuscu E., Bagis T., Bolat F., Haberal A., Demirhan B.: Expression of survivin, PTEN and p27 in normal, hyperplastic, and carcinomatous endometrium. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2006; 16: 1412–1418
- [17] Feng Y.Z., Shiozawa T., Miyamoto T., Kashima H., Kurai M., Suzuki A., Konishi I.: BRAF mutation in endometrial carcinoma and hyperplasia: correlation with KRAS and p53 mutations and mismatch repair protein expression. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 6133–6138
- [18] Fukuchi T., Sakamoto M., Tsuda H., Maruyama K., Nozawa S., Hirohashi S.: Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res.*, 1998; 58: 3526–3528
- [19] Gatenby R.A., Gillies R.J.: Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nat. Rev. Cancer*, 2004; 4: 891–899
- [20] Goldman N.A., Katz E.B., Glenn A.S., Weldon R.H., Jones J.G., Lynch U., Fezzari M.J., Runowicz C.D., Goldberg G.L., Charron M.J.: GLUT1 and GLUT8 in endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Mod. Pathol.*, 2006; 19: 1429–1436
- [21] Inaba F., Kawamata H., Teramoto T., Fukasawa I., Inaba N., Fujimori T.: PTEN and p53 abnormalities are indicative and predictive factors for endometrial carcinoma. *Oncol. Rep.*, 2005; 13: 17–24
- [22] Ito K., Suzuki T., Akahira J., Sakuma M., Saitou S., Okamoto S., Niikura H., Okamura K., Yaegashi N., Sasano H., Inoue S.: 14-3-3sigma in endometrial cancer – a possible prognostic marker in early-stage cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2005; 11: 7384–7391
- [23] Ito K., Watanabe K., Nasim S., Sasano H., Sato S., Yajima A., Silverberg S.G., Garrett C.T.: Prognostic significance of p53 overexpression in endometrial cancer. *Cancer Res.*, 1994; 54: 4667–4670
- [24] Kagan J., Srivastava S.: Mitochondria as a target for early detection and diagnosis of cancer. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2005; 42: 453–472
- [25] Kimura F., Watanabe J., Hata H., Fujisawa T., Kamata Y., Nishimura Y., Jobo T., Kuramoto H.: PTEN immunohistochemical expression is suppressed in G1 endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2004; 130: 161–168
- [26] Larsen N.B., Rasmussen M., Rasmussen L.J.: Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways?. *Mitochondrion*, 2005; 5: 89–108
- [27] Lievre A., Blons H., Houllier A.M., Laccourreye O., Brasnu D., Beaune P., Laurent-Puig P.: Clinicopathological significance of mitochondrial D-Loop mutations in head and neck carcinoma. *Br. J. Cancer*, 2006; 94: 692–697
- [28] Liu V.W., Yang H.J., Wang Y., Tsang P.C., Cheung A.N., Chiu P.M., Ng T.Y., Wong L.C., Nagley P., Ngan H.Y.: High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas. *Br. J. Cancer.*, 2003; 89: 697–701
- [29] Livasy C.A., Reading F.C., Moore D.T., Boggess J.F., Lininger R.A.: EGFR expression and HER2/neu overexpression/amplification in endometrial carcinosarcoma. *Gynecol. Oncol.*, 2006; 100: 101–106
- [30] Loeb L.A., Wallace D.C., Martin G.M.: The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 18769–18770
- [31] Lorenc A., Bryk J., Golik P., Kupryjanczyk J., Ostrowski J., Pronicki M., Semczuk A., Szolkowska M., Bartnik E.: Homoplasmic MELAS A3243G mtDNA mutation in a colon cancer sample. *Mitochondrion*, 2003; 3: 119–124
- [32] MacDonald N.D., Salvesen H.B., Ryan A., Iversen O.E., Aksten L.A., Jacobs I.J.: Frequency and prognostic impact of microsatellite instability in a large population-based study of endometrial carcinomas. *Cancer Res.*, 2000; 60: 1750–1752
- [33] Mathupala S.P., Rempel A., Pedersen P.L.: Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: a remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for type II hexokinase. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1997; 29: 339–343
- [34] Mhaweche P., Benz A., Cerato C., Greloz V., Assaly M., Desmond J.C., Koeffler H.P., Lodygin D., Hermeking H., Herrmann F., Schwaller J.: Downregulation of 14-3-3sigma in ovary, prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation. *Mod. Pathol.*, 2005; 18: 340–348
- [35] Modugno F., Ness R.B., Chen C., Weiss N.S.: Inflammation and endometrial cancer: a hypothesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2005; 14: 2840–2847
- [36] Monaghan H., MacWhinnie N., Williams A.R.: The role of matrix metalloproteinases-2, -7 and -9 and beta-catenin in high grade endometrial carcinoma. *Histopathology*, 2007; 50: 348–357
- [37] Morales L., Timmerman D., Neven P., Paridaens R.: Endometrial safety of third generation aromatase inhibitors versus tamoxifen in breast cancer patients. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2006; 16(Suppl.2): 515–517
- [38] Mutter G.L., Lin M.C., Fitzgerald J.T., Kum J.B., Baak J.P., Lees J.A., Weng L.P., Eng C.: Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000; 92: 924–930
- [39] Nur S., Chuang L., Ramaswamy G.: Immunohistochemical characterization of cancer antigen in uterine cancers. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2006; 16: 1903–1910
- [40] Pedersen P.L., Mathupala S., Rempel A., Geschwind J.F., Ko Y.H.: Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1555: 14–20
- [41] Pejovic T., Ladner D., Intengan M., Zheng K., Fairchild T., Dillon D., Easley S., Marchetti D., Schwartz P., Lele S., Costa J., Odunsi K.: Somatic D-loop mitochondrial DNA mutations are frequent in uterine serous carcinoma. *Eur. J. Cancer*, 2004; 40: 2519–2524
- [42] Penta J.S., Johnson F.M., Wachsmen J.T., Copeland W.C.: Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat. Res.*, 2001; 488: 119–133
- [43] Petros J.A., Baumann A.K., Ruiz-Pesini E., Amin M.B., Sun C.Q., Hall J., Lim S., Issa M.M., Flanders W.D., Hosseini S.H., Marshall F.F., Wallace D.C.: mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 719–724
- [44] Planaguma J., Gonzalez M., Doll A., Monge M., Gil-Moreno A., Baro T., Garcia A., Xercavins J., Alameda F., Abal M., Reventos J.: The up-regulation profiles of p21WAF1/CIP1 and RUNX1/AML1 correlate with myometrial infiltration in endometrioid endometrial carcinoma. *Hum. Pathol.*, 2006; 37: 1050–1057
- [45] Prat J.: Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum. Pathol.*, 2004; 35: 649–662
- [46] Quinn M.J., d'Onofrio A., Moller B., Black R., Martinez-Garcia C., Moller H., Rahu M., Robertson C., Schouten L.J., La Vecchia C., Boyle P.: Cancer mortality trends in the EU and acceding countries up to 2015. *Ann. Oncol.*, 2003; 14: 1148–1152
- [47] Reid-Nicholson M., Iyengar P., Hummer A.J., Linkov I., Asher M., Soslow R.A.: Immunophenotypic diversity of endometrial adenocarcinomas: implications for differential diagnosis. *Mod. Pathol.*, 2006; 19: 1091–1100
- [48] Risinger J.I., Hayes A.K., Berchuck A., Barrett J.C.: PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res.*, 1997; 57: 4736–4738
- [49] Saffari B., Jones L.A., el-Naggag A., Felix J.C., George J., Press M.F.: Amplification and overexpression of HER-2/neu (c-erbB2) in endometrial cancers: correlation with overall survival. *Cancer Res.*, 1995; 55: 5693–5698
- [50] Saito S., Ito K., Nagase S., Suzuki T., Akahira J., Okamura K., Yaegashi N., Sasano H.: Progesterone receptor isoforms as a prognostic marker in human endometrial carcinoma. *Cancer Sci.*, 2006; 97: 1308–1314
- [51] Salas A., Yao Y.G., Macaulay V., Vega A., Carracedo A., Bandelt H.J.: A critical reassessment of the role of mitochondria in tumorigenesis. *PLoS. Med.*, 2005; 2: e296
- [52] Santin A.D., Bellone S., Gokden M., Palmieri M., Dunn D., Agha J., Roman J.J., Hutchins L., Pecorelli S., O'Brien T., Cannon M.J., Parham G.P.: Overexpression of HER-2/neu in uterine serous papillary cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2002; 8: 1271–1279
- [53] Sasaki H., Nishii H., Takahashi H., Tada A., Furusato M., Terashima Y., Siegal G.P., Parker S.L., Kohler M.F., Berchuck A.: Mutation of the Ki-ras protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer Res.*, 1993; 53: 1906–1910
- [54] Semczuk A., Lorenc A., Putowski L., Futyma K., Bryk J., Miotla P., Bartnik E.: Clinicoprognostical features of endometrial cancer patients with somatic mtDNA mutations. *Oncol. Rep.*, 2006; 16: 1041–1045

- [55] Shih H.C., Shiozawa T., Kato K., Imai T., Miyamoto T., Uchikawa J., Nikaïdo T., Konishi I.: Immunohistochemical expression of cyclins, cyclin-dependent kinases, tumor-suppressor gene products, Ki-67, and sex steroid receptors in endometrial carcinoma: positive staining for cyclin A as a poor prognostic indicator. *Hum. Pathol.*, 2003; 34: 471–478
- [56] Sivridis E., Buckley C.H., Fox H.: Type I and Type II estrogen and progesterone binding sites in endometrial carcinomas: their value in predicting survival. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 1993; 3: 80–88
- [57] Slomovitz B.M., Broaddus R.R., Burke T.W., Sneige N., Soliman P.T., Wu W., Sun C.C., Munsell M.F., Gershenson D.M., Lu K.H.: Her-2/neu overexpression and amplification in uterine papillary serous carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 2004; 22: 3126–3132
- [58] Smith H.O., Leslie K.K., Singh M., Qualls C.R., Revankar C.M., Joste N.E., Prossnitz E.R.: GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2007; 196: 386 e1–9
- [59] Sonoda K., Miyamoto S., Hirakawa T., Yagi H., Yotsumoto F., Nakashima M., Watanabe T., Nakano H.: Clinical significance of RCAS1 as a biomarker of uterine cancer. *Gynecol. Oncol.*, 2006; 103: 924–931
- [60] Wallace D.C.: A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.*, 2005; 39: 359–407
- [61] Wang Y., Liu V.W., Tsang P.C., Chiu P.M., Cheung A.N., Khoo U.S., Nagley P., Ngan H.Y.: Microsatellite instability in mitochondrial genome of common female cancers. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2006; 16(Suppl.1): 259–266
- [62] Warburg O.: On the origin of cancer cells. *Science*, 1956; 123: 309–314
- [63] Wojciechowska U., Didkowska J., Tarkowski W., Zatoński W.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2004 roku. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2006
- [64] Xu L., Hu Y., Chen B., Tang W., Han X., Yu H., Xiao C.: Mitochondrial polymorphisms as risk factors for endometrial cancer in southwest China. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2006; 16: 1661–1667
- [65] Yoneyama H., Hara T., Kato Y., Yamori T., Matsuura E.T., Koike K.: Nucleotide sequence variation is frequent in the mitochondrial DNA displacement loop region of individual human tumor cells. *Mol. Cancer Res.*, 2005; 3: 14–20
- [66] Zanssen S., Schon E.A.: Mitochondrial DNA mutations in cancer. *PLoS Med.*, 2005; 2L e401