

Ocena przydatności β -N-acetylo-D-glukozaminidazy i endogliny jako markerów molekularnych w diagnostyce nowotworów pęcherza moczowego u kobiet w wieku pomenopauzalnym

Diagnostic value of β -N-acetyl-D-glucosaminidase and endoglin as molecular markers in postmenopausal women with urinary bladder neoplasms

Waldemar Różański¹, Marek Lipiński¹, Paweł Woźniak¹, Ewa Forma², Anna Krześlak², Magdalena Bernaciak², Mariusz Blewniewski¹, Magdalena Bryś²

¹II Klinika Urologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi;

kierownik Kliniki: dr hab. n. med. Waldemar Różański, prof. Uniwersytetu Medycznego

²Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego;

kierownik Katedry: prof. dr hab. Wanda Małgorzata Krajewska

Przeгляд Menopauzalny 2011; 3: 197–201

Streszczenie

Cel pracy: Celem pracy była ocena przydatności oznaczania ekspresji β -N-acetylo-D-glukozaminidazy (MGEA5) i endogliny (CD105), na poziomie mRNA, w diagnostyce nowotworów pęcherza moczowego u kobiet w wieku pomenopauzalnym oraz w prognozowaniu przebiegu choroby.

Materiał i metody: W próbkach moczu pobranych od 30 kobiet ze zdiagnozowanymi nowotworami pęcherza moczowego oznaczono ekspresję MGEA5 i CD105 na poziomie mRNA metodą *real-time* reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR). Grupę kontrolną stanowił mocz pobrany od 20 kobiet, u których w badaniu ogólnym moczu ani w wywiadzie nie występował krwinkomocz, a w badaniu ultrasonograficznym (USG) nie stwierdzono zmian nowotworowych. Wyznaczono wartość progową dla obu oznaczanych genów oraz obliczono czułość i swoistość badanych markerów.

Wyniki i wnioski: Przy progowej wartości MGEA5 wynoszącej 98,3 czułość testu wynosiła 85,2%, a swoistość 95%. Ekspresję MGEA5 stwierdzono w 27 (90%) preparatach moczu pobranego od kobiet chorych oraz w 20 (100%) preparatach moczu pozyskanego od kobiet zdrowych. Oznaczanie ekspresji CD105 charakteryzowała 100-procentowa czułość i 80-procentowa swoistość. Wartość progowa wynosiła powyżej 2,0. W przeciwieństwie do MGEA5, ekspresji CD105 nie stwierdzono u chorych z nowotworami przejściowonabłonkowymi o małym potencjale złośliwości (*papillary urothelial neoplasms of low malignant potential* – PUNLMP) i w moczu kobiet zdrowych.

Jednoczesne oznaczenie ekspresji MGEA5 i CD105 na poziomie mRNA w moczu kobiet w wieku pomenopauzalnym chorych na nowotwory pęcherza moczowego wydaje się użytecznym wskaźnikiem diagnostycznym i prognostycznym w przebiegu choroby.

Słowa kluczowe: marker molekularny, MGEA5, CD105, rak pęcherza moczowego.

Summary

The aim of the study was to evaluate the usefulness of mRNA expression of β -N-acetyl-D-glucosaminidase (MGEA5) and endoglin (CD105) for bladder cancer diagnosis and disease prognosis in postmenopausal women.

Material and methods: Expression of MGEA5 and CD105 in mRNA with PCR real-time method was estimated in a urine specimen from 30 women with diagnosed bladder cancer. The control group consisted of 20 women with negative cancer history and no changes in the urine specimen and ultrasound examination of the bladder. For both estimated genes, cut-off, specificity and sensitivity were estimated.

Results and conclusions: At a cut-off value of MGEA5 of 98.3 sensitivity was 85.2% and specificity 95%. Expression of MGEA5 was established in 27 of 30 (90%) urine specimens taken from women with bladder cancer and in 100% (20 of 20) urine specimens from healthy women. Expression of CD105 was characterized by 100% sensitivity and 80% specificity. Cut-off was over 2.0. There was no CD105 expression in women with papillary

Adres do korespondencji:

Marek Lipiński, II Klinika Urologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Pabianicka 62, 93-513 Łódź, tel. +48 42 698 52 11, faks +48 42 689 52 12, e-mail: miklipa@poczta.onet.pl

urothelial neoplasms of low malignant potential (PUNLMP), in contrast to MGEA5 expression. Estimation of expression of both MGEA5 and CD105 in mRNA of urine specimens of postmenopausal women with urinary bladder may be a useful marker of diagnosis and prognosis of bladder carcinoma.

Key words: molecular markers, MGEA5, CD105, bladder cancer.

Wstęp

Nienaciekający błony mięśniowej rak pęcherza moczowego (*non-muscle invasive bladder cancer*) jest jednym z najczęściej występujących nowotworów układu moczowego i stanowi ok. 70% wszystkich nowotworów pęcherza moczowego [1]. W Polsce jest ósmym pod względem częstości zachorowań nowotworem u kobiet. Zgodnie z danymi opublikowanymi przez Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów Centrum Onkologii w Warszawie, złośliwe nowotwory pęcherza moczowego u kobiet diagnozowane są w ok. 98% przypadków po 45. r.ż. W 2008 r. odnotowano w Polsce 1281 przypadków tego nowotworu u kobiet, z czego 1261 u osób w przedziale wieku 45–85 lat. W tym samym czasie zmarły z tego powodu 653 kobiety [2].

Nienaciekający rak pęcherza moczowego może długo nie wywoływać żadnych objawów, dlatego niezwykle istotnym zagadnieniem jest odpowiednio wczesna i właściwa diagnostyka choroby. Obecnie w wielu ośrodkach naukowych trwają badania nad wytypowaniem możliwie najczulszych i najbardziej specyficznych markerów molekularnych, których zmiany na poziomie molekularnym można by oznaczać w materiale pozyskiwanym od pacjentów w sposób nieinwazyjny. Coraz częściej podkreśla się w piśmiennictwie naukowym konieczność wytypowania grupy markerów molekularnych tak dobranych, aby w jak najpełniejszy sposób charakteryzowały one proces nowotworowy toczący się w obrębie dróg moczowych [3].

Modyfikacją białek komórkowych, polegającą na przyłączeniu pojedynczych reszt β -*N*-acetylo-D-glukozaminy do reszt seryny lub treoniny wiązaniem *O*-glikozydowym (*O*-GlcNAc), jest glikozylacja. Do chwili obecnej zidentyfikowano ok. 200 białek komórkowych, w przypadku których potwierdzono występowanie reszt *O*-GlcNAc. Wyróżnia się wśród nich białka cytoszkieletu, jądrowych kompleksów porowych, chromatyny, polimerazę RNA klasy II i jej czynniki transkrypcyjne, protoonkogeny, supresory nowotworów, jądrowe receptory hormonów, fosfatazy, kinazy, enzymy zaangażowane w procesy metaboliczne i wiele innych. Przyłączenie reszt *O*-GlcNAc jest modyfikacją wykazującą cechy predestynujące ją do odgrywania istotnej roli w przekazywaniu sygnału, zarówno w komórkach prawidłowych, jak i nowotworowych [4–6].

Enzymem usuwającym reszty *O*-GlcNAc z białek jądrowych i cytoplazmatycznych jest β -*N*-acetylo-D-glukozaminidaza (MGEA5). Wykazuje ona słabą aktywność hialuronidazy oraz aktywność heksozaminidazy, które związane są z *N*-końcową częścią enzymu. Sekwencja

sklonowanej MGEA5 została zidentyfikowana jako sekwencja odpowiadająca antygenowi 5, ulegającemu ekspresji w komórkach oponiaka (*meningioma expressed antigen 5* – MGEA5) i powodującemu odpowiedź immunologiczną u pacjentów. Największą ekspresją tego enzymu charakteryzują się mózg, łożysko i trzustka [6–8].

W sygnalizacji indukowanej przez czynniki z rodziny transformującego czynnika wzrostu beta (*transforming growth factor beta* – TGF β) oprócz receptorów TGF β typu I i II uczestniczą białka określane jako receptory pomocnicze TGF β (*accessory receptor/auxiliary receptor*). Termin receptor pomocniczy nie jest pojęciem systematycznym, gdyż białka te nie pełnią wszystkich funkcji przypisanych receptorom, natomiast mogą wpływać na aktywność szlaku sygnalizacyjnego TGF β . Jednym z takich receptorów jest glikoproteina transbłonowa endogлина (*cluster of differentiation 105* – CD105). Jest ona receptorem TGF β 1 i TGF β 3. Ulega nadekspresji w śródbłonku naczyń krwionośnych tkanek, w których zachodzi waskularyzacja, a szczególnie w powstających *de novo* naczyniach krwionośnych nowotworów. Sugeruje się, że endogлина może być rozważana jako użyteczny marker neoangiogenezy w nowotworach [9, 10].

Cel pracy

Celem badań była ocena ekspresji MGEA5 i CD105 na poziomie mRNA metodą *real-time* reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR) oraz ocena przydatności diagnostycznej i prognostycznej badanych genów jako markerów transformacji nowotworowej pęcherza moczowego u kobiet w wieku pomenopauzalnym.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły preparaty moczu pobranego od 30 kobiet ze zdiagnozowanymi nowotworami pęcherza moczowego. Średnia wieku w tej grupie wynosiła 64,77 \pm 9,12 roku. Charakterystyka kliniczno-patologiczna preparatów zamieszczona została w tabeli I. Materiał kontrolny stanowiły preparaty moczu pobranego od 20 kobiet, u których w badaniu ogólnym moczu ani w wywiadzie nie występował krwinkomocz lub krwiomocz, a w badaniu ultrasonograficznym (USG) nie stwierdzono zmian podejrzanych o rozrost nowotworowy. Złuszczone komórki nabłonkowe izolowano z 50 ml moczu. Bezpośrednio po pobraniu próby moczu przechowywano w temperaturze 4°C do chwili wykonywania ozna-

Tab. I. Charakterystyka kliniczno-patologiczna pacjentek i badanych preparatów

Charakterystyka	Pacjentki (n = 30) [%]
wiek	
przedział	52–88
średnia ±SD	54,3 ±11,5
typ nowotworu	
<i>carcinoma urotheliale</i>	24 (80,0)
PUNLMP	6 (20,0)
stopień zróżnicowania histologicznego	
G1	10 (33,3)
G2	9 (30,0)
G3	5 (16,7)

PUNLMP – nowotwór przejściowonabłonkowy o małym potencjale złośliwości (papillary urothelial neoplasms of low malignant potential).

czeń, a następnie wirowano przy 2,000 rpm przez 15 min. Otrzymany osad przemywano dwukrotnie zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (pH 7,6) i przechowywano w temperaturze –80°C do dalszych oznaczeń.

Izolowanie RNA i synteza cDNA

Całkowite RNA izolowano przy użyciu odczynnika TRI Reagent (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Czystość otrzymanych preparatów RNA określano metodą spektrofotometryczną poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm i 280 nm. Przyjętym kryterium czystości DNA była wartość A_{260}/A_{280} mieszcząca się w granicach 1,8–2,0.

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano przy użyciu zestawu PCR Kit ver. 3.0 (Takara Bio Inc. Japonia) zgodnie z zaleceniami producenta. cDNA przechowywano w temperaturze –20°C.

Analiza ilościowa produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym – reakcja real-time PCR

Otrzymany RNA stanowił matrycę w reakcji *real-time* PCR do oznaczenia liczby kopii mRNA dla genu MGEA5 i endogliny. Użyta mieszanina reakcyjna zawierała: 0,5 µl cDNA, 5 µl TaqMan® Universal PCR MasterMix, 0,5 µl 20 × TaqMan® Gene Expression Assays i 4 µl H₂O. *Real-time* PCR prowadzono w urządzeniu Mastercycler®ep realplex (Eppendorf). Początkowa ilość matrycy wyznaczana była na podstawie parametru Ct (teoretyczny numer cyklu, przy którym wartość fluorescencji jest wyższa niż przyjęta arbitralnie wartość graniczna). Pomiar wartości Ct wykonano w dwóch powtórzeniach, jako gen referencyjny wykorzystano GAPDH (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*). Do badań zastosowano następujące sondy TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA): MGEA5 – Hs00201970_m1; CD105 – Hs00923996_m1; GAPDH – Hs00266705_g1.

Analizy statystycznej wyników dokonano przy użyciu programu komputerowego STATISTICA wersja 9.0 (StatSoft, Poland) i MedCalc wersja 6.14 (MedCalc Software, Belgia). Do oceny rozkładów wykorzystano test Kołmogorowa-Smirnowa i po stwierdzeniu rozkładów odmiennych od normalnych do dalszych obliczeń stosowano testy nieparametryczne – U Manna-Whitneya i Kruskala-Wallisa. Wyliczono także współczynnik skośności, a ponieważ przybierał on wartości niższe niż 1,5, stosowano do obliczeń średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe (*standard deviation* – SD). Za istotną statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$.

Diagnostyczną wartość progową dla MGEA5 i CD105 wyznaczono na podstawie krzywej ROC (*receiver operating characteristic*). Dla każdej wartości progowej obliczano czułość i swoistość. W oparciu o obliczone parametry utworzono wykres zależności czułości od wartości (100-swoistość). Wykres ten – krzywa ROC – posłużył do oceny zdolności rozdzielczej testów diagnostycznych. Pole pod krzywą (*area under curve*) – ROC-AUC – było sprawdzianem zdolności rozdzielczej testu. Za optymalną wartość graniczną dla MGEA5 uznano wartość 98,3, natomiast dla CD105 – 2,0.

Wyniki

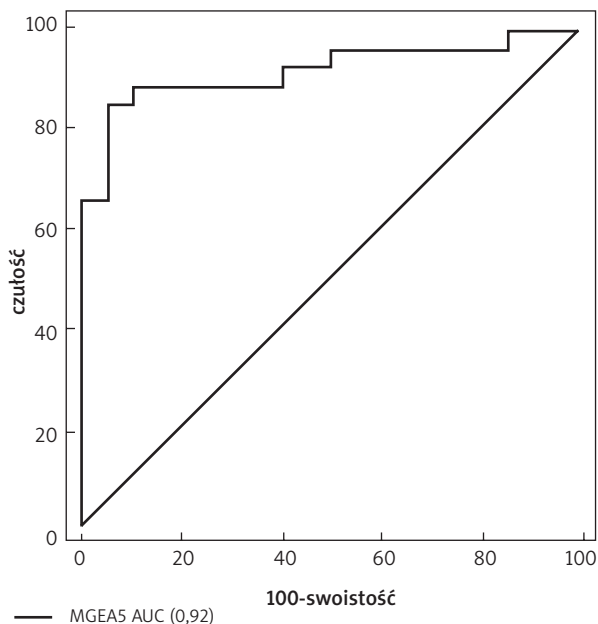
Ekspresję mRNA dla genu MGEA5 stwierdzono w 27/30 (90%) preparatach nowotworowych, natomiast uwzględniając wyznaczoną normę – w 23/30 (76,7%). W grupie kontrolnej ekspresja ta wynosiła odpowiednio 20/20 (100%) i zgodnie z wyznaczoną normą – 6/20 (30%).

Częstość wykrywania ekspresji mRNA dla MGEA5 w zależności od typu nowotworu przedstawiała się następująco: w PUNLMP – u 5/6 (83,3%) pacjentek, w *carcinoma urotheliale* – u 18/24 (75%). Czუłość MGEA5 wynosiła 85,2%, a swoistość – 95,0%. Pole pod krzywą ROC wynosiło 0,92 (ryc. 1.).

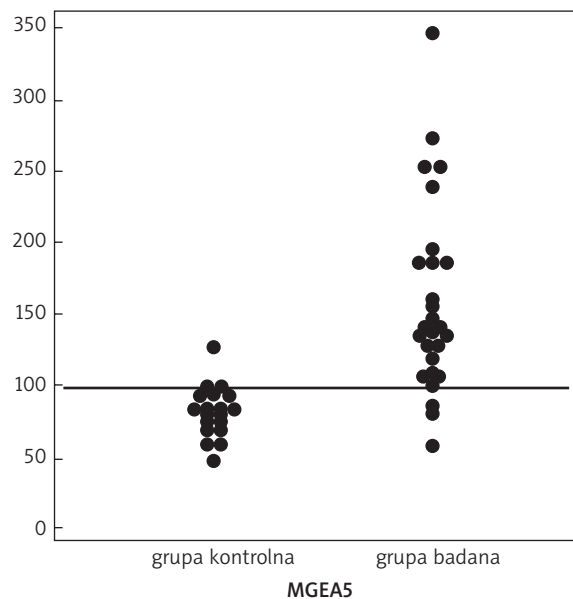
Rozkład wartości relatywnych charakteryzujących ekspresję mRNA dla genu MGEA5 w odniesieniu do wartości progowej przedstawia rycina 2.

W przypadku genu dla CD105 ekspresję stwierdzono w 14/30 (46,7%) preparatach nowotworowych i wartość ta była identyczna po uwzględnieniu wartości progowej. W grupie kontrolnej ekspresja ta wynosiła odpowiednio 5/20 (25%), natomiast zgodnie z wyznaczoną normą 0/20 (0%). Częstość wykrywania ekspresji mRNA dla endogliny w zależności od typu nowotworu przedstawiała się następująco: w PUNLMP – u 0/6 (0%) pacjentek, w *carcinoma urotheliale* – u 14/24 (58,3%). Czუłość CD105 wynosiła 100%, a swoistość 80,0%. Pole pod krzywą ROC wynosiło 0,98 (ryc. 3.).

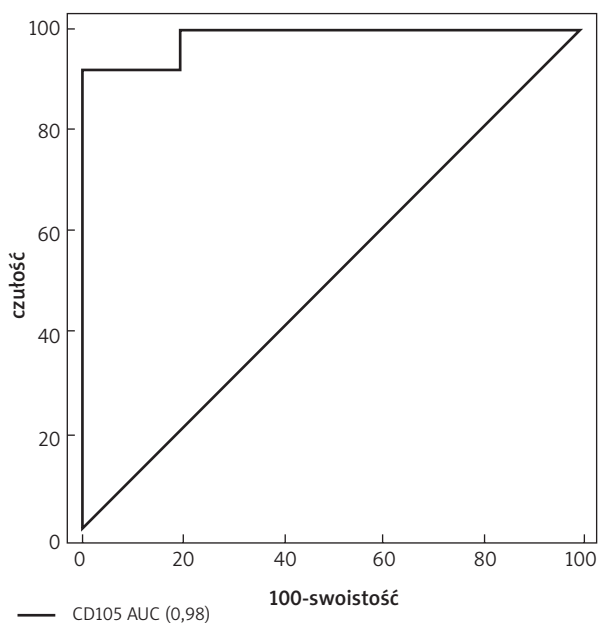
Rozkład wartości relatywnych charakteryzujących ekspresję mRNA dla genu CD105 w odniesieniu do wartości progowej przedstawia rycina 4.



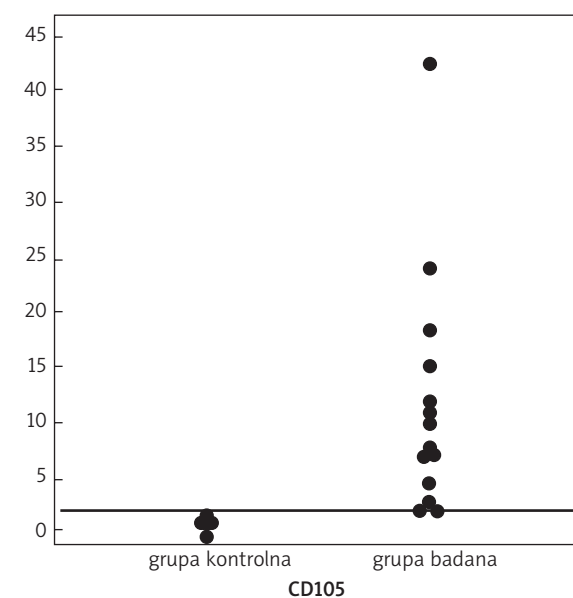
Ryc. 1. Krzywa ROC dla genu MGEA5



Ryc. 2. Rozkład wartości relatywnej ekspresji genu MGEA5 w grupie kontrolnej i badanej. Wartość progowa 98,3



Ryc. 3. Krzywa ROC dla genu endogliny



Ryc. 4. Rozkład wartości relatywnej ekspresji genu endogliny w grupie kontrolnej i badanej. Wartość progowa 2,0

Dyskusja

Choroba nowotworowa cechuje się zwiększeniem tempa proliferacji komórek, a tym samym zwiększeniem stopnia anaplazji. Procesom tym towarzyszy dysfunkcja mechanizmów regulacyjnych oraz naprawczych, odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg cyklu komórkowego, metabolizm, różnicowanie, wzrost i odnowę tkanek, jak również tworzenie naczyń krwionośnych [1]. W walce z chorobą nowotworową podstawowe znaczenie ma jej wykrycie w jak najwcześniejszym stadium. W przy-

padku diagnozowania nowotworów pęcherza moczowego za metody pomocne uważane są zarówno badania podmiotowe, jak i przedmiotowe, natomiast ostateczne rozpoznanie można postawić na podstawie badania cystoskopowego i histopatologicznego [11]. Nieliczne są natomiast informacje o przydatności badania wybranych markerów molekularnych w płynach biologicznych w diagnostyce onkologicznej zmian nowotworowych, w tym nowotworów pęcherza moczowego [3].

Monitorowanie ekspresji genu MGEA5 przy zastosowaniu metody *real-time* PCR w nowotworach pęcherza

moczowego wydaje się obiecujące z uwagi na wysoką czułość (85,2%) i swoistość (95,0%) tego markera molekularnego. Ponadto wyznaczona wartość progowa 98,3 pozwala na precyzyjne oddzielenie od siebie populacji kobiet chorych na nowotwory pęcherza moczowego od grupy kobiet zdrowych.

Gen MGEA5 i kodowane przez niego białko są stosunkowo słabo scharakteryzowane w aspekcie udziału w procesie transformacji nowotworowej. Wiadomo jednak, że nadekspresja MGEA5 powoduje zaburzenia cyklu komórkowego. Mechanizm tych zaburzeń może być różny, ale w przypadku nadekspresji omawianego enzymu dochodzi do zmian w fosforylacji białek, szczególnie pRb, opóźnienia przejścia przez fazę M oraz zakłócenia normalnej ekspresji cyklin. Modyfikacja czynników transkrypcyjnych przez reszty O-GlcNAc może wpływać na ich stabilność, wewnątrzkomórkową lokalizację, aktywność oraz interakcje z innymi białkami kompleksów transkrypcyjnych lub DNA. Uważa się, że zachowanie równowagi pomiędzy O-glikozylacją a fosforylacją ma kluczowe znaczenie dla aktywności czynników transkrypcyjnych i ich zdolności do regulowania ekspresji genów, w tym także tych zaangażowanych w procesy nowotworzenia [6, 12].

Proces angiogenezy jest nierozzerwalnie związany z progresją nowotworu, a także z jego przerzutowaniem. Liczba czynników stymulujących ten proces jest dość znaczna, niemniej jednym z częściej rozważanych w aspekcie typowania molekularnych markerów nowotworzenia jest endogлина. Wydaje się, że ma ona istotne znaczenie w takich nowotworach, jak: rak piersi, jajnika, endometrium, prostaty czy pęcherza moczowego [13, 14]. Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że oznaczanie ekspresji endogliny na poziomie mRNA może stać się użytecznym wskaźnikiem do diagnozowania złośliwych procesów nowotworowych toczących się w obrębie pęcherza moczowego u kobiet w wieku pomenopauzalnym, gdyż ekspresji tego genu nie obserwuje się u osób zdrowych i tych, u których zdiagnozowano PUNLMP. Na podkreślenie zasługuje także wysoka czułość (100%) i swoistość (80,0%) tego potencjalnego markera.

Wyniki przeprowadzonych przez nas badań wskazują, że określanie ekspresji MGEA5 i CD105 na poziomie mRNA metodą *real-time* może stać się użytecznym markerem w diagnozowaniu i prognozowaniu nowotworów pęcherza moczowego u kobiet w wieku pomenopauzalnym, dzięki któremu możliwe będzie ograniczenie liczby wykonywanych cystoskopii. Badania te jednak wymagają kontynuowania i przebadania większej liczby chorych kobiet.

Praca wykonana z funduszy pracy własnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 502–19–842.

Piśmiennictwo

1. Kompier LC, van Tilborg AA, Zwarthoff EC. Bladder cancer: novel molecular characteristics, diagnostic, and therapeutic implications. *Urol Oncol* 2010; 28: 91-6.
2. Krajowy Rejestr Nowotworów.
3. Yutkin V, Nisman B, Pode D. Can urinary biomarkers replace cystoscopic examination in bladder cancer surveillance? *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10: 787-90.
4. Slawson C, Housley MP, Hart GW. O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks. *J Cell Biochem* 2006; 97: 71-83.
5. Kudlow JE. Post-translational modification by O-GlcNAc: another way to change protein function. *J Cell Biochem* 2006; 98: 1062-75.
6. Krześlak A. Wpływ modyfikacji białek komórkowych przez O-GlcNAc na proces przekazywania sygnału. *Postępy Biochemii* 2007; 53: 389-99.
7. Whelan SA, Hart GW. Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmic protein glycosylation and phosphorylation. *Circ Res* 2003; 93: 1047-58.
8. Iyer SP, Hart GW. Dynamic nuclear and cytoplasmic glycosylation: enzymes of O-GlcNAc cycling. *Biochemistry* 2003; 42: 2493-9.
9. ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 2008; 11: 79-89.
10. El-Gohary YM, Silverman JF, Olson PR, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 572-9.
11. Lipiński M. Metody diagnostyczne stosowane w rozpoznawaniu raka pęcherza moczowego. *Przegląd Urologiczny* 2008; 9: 64-71.
12. Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, et al. Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J Biol Chem* 2005; 280: 32944-56.
13. Sadłacka P, Walentowicz-Sadłacka M, Grabiec M. Rola angiogenezy w rozwoju nowotworów. *Przegl Menopauz* 2010; 1: 28-31.
14. Dallas NA, Samuel S, Xia L, et al. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1931-7.