

# Ocena przydatności diagnostycznej i prognostycznej *N*-acetyloglukozaminy transferazy z wiązaniem *O*-glikozydowym w przebiegu transformacji nowotworowej pęcherza moczowego u kobiet w wieku pomenopauzalnym

## *Diagnostic and prognostic value of O-linked N-acetylglucosamine transferase transferase in bladder neoplastic transformation in postmenopausal women*

Anna Krześlak<sup>1</sup>, Jacek Wikosz<sup>2</sup>, Ewa Forma<sup>1</sup>, Waldemar Różański<sup>2</sup>, Magdalena Bryś<sup>1</sup>,  
Mariusz Blewniewski<sup>2</sup>, Marek Lipiński<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego;

kierownik Katedry: prof. dr hab. n. biol. Wanda Małgorzata Krajewska

<sup>2</sup>II Klinika Urologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi;

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

Przeгляд Menopauzalny 2011; 6: 432–435

### Streszczenie

**Cel pracy:** Celem przeprowadzonych badań była ocena przydatności oznaczania ekspresji genu *N*-acetyloglukozaminy transferazy z wiązaniem *O*-glikozydowym (*O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase – OGT) w diagnozowaniu nowotworów pęcherza moczowego u kobiet w wieku pomenopauzalnym oraz w prognozowaniu przebiegu transformacji nowotworowej tego narządu.

**Materiał i metody:** Materiał użyty do badań stanowił mocz pozyskany od 52 chorych ze zdiagnozowanymi nowotworami pęcherza moczowego. W preparatach tych oznaczono ekspresję OGT na poziomie matrycowego kwasu rybonukleinowego (mRNA) w czasie rzeczywistym (*real-time*) metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR). Materiał kontrolny stanowił mocz pozyskany od 37 kobiet, u których w badaniu ultrasonograficznym (USG) nie stwierdzono zmian nowotworowych. Wyznaczono wartość progową dla badanego genu oraz obliczono czułość i swoistość tego markera.

**Wyniki:** Przy progowej wartości OGT wynoszącej 416,93 czułość testu wynosiła 100%, a swoistość 88,9%. Ekspresję OGT stwierdzono w 36 z 46 (78,2%) preparatów moczu pobranego od kobiet ze zdiagnozowanym rakiem pęcherza moczowego oraz w 18 z 37 (48,6%) preparatów moczu prawidłowego. Natomiast uwzględniając wartość progową, ekspresję OGT stwierdzono odpowiednio w 19 z 46 i w 1 z 37 analizowanych preparatów. Ekspresji OGT nie stwierdzono w moczu kobiet chorych ze zdiagnozowanym brodawkowatym nowotworem przejściowonabłonkowym o niskim potencjale złośliwości (*papillary urothelial neoplasm of low malignant potential* – PUNLMP).

**Wnioski:** Oznaczanie ekspresji OGT 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, *N*-acetyloglukozamina transferazy z wiązaniem *O*-glikozydowym, rak pęcherza moczowego u kobiet.

### Summary

**Aim of the study:** The aim of the study was to evaluate the usefulness of mRNA expression of O-GlcNAc transferase (OGT) for bladder neoplasm diagnosis and disease prognosis in postmenopausal women.

**Material and methods:** OGT expression was measured by a real-time PCR assay in urine obtained from 52 postmenopausal women with bladder neoplasms and 37 healthy women. For the studied gene, cut-off, specificity and sensitivity were estimated.

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

**Results:** For OGT, the cut-off value was 416.93, sensitivity 100% and specificity 88.9%. Expression of OGT was established in 36/46 (78.2%) urine specimens taken from women with bladder cancer and in 18/37 (48.6%) urine specimens from healthy women. There was no OGT expression in women with papillary urothelial neoplasms of low malignant potential (PUNLMP).

**Conclusions:** Measurement of OGT mRNA level in urine samples obtained from postmenopausal women with urinary bladder cancer may be a useful marker of diagnosis and prognosis.

**Key words:** molecular marker, O-GlcNAc transferase, OGT, bladder cancer in women.

## Wstęp

*N*-acetyloglukozamina transferazy z wiązaniem *O*-glikozydowym (*O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase – OGT) jest jednym z dwóch enzymów związanych z potranslacyjną modyfikacją białek komórkowych (*O*-GlcNAcyacją), która polega na przyłączeniu do seryny lub treoniny wiązaniem *O*-glikozydowym (*O*-GlcNAc), pojedynczych reszt *N*-acetyloglukozaminy [1]. Wyniki wielu badań wskazują, że *O*-GlcNAcyacja odgrywa ważną rolę w procesach związanych z nowotworzeniem, takich jak metabolizm, transkrypcja, regulacja cyklu komórkowego i reorganizacja cytoszkieletu [2]. *O*-GlcNAcyacja jest modyfikacją wykazującą cechy predestynujące ją do odgrywania roli w przekazywaniu sygnału w komórce. Po pierwsze, jest to modyfikacja bardzo dynamiczna. Okres połowicznego zaniku reszt cukrowych jest znacznie krótszy niż ten sam czas dla polipeptydu. Po drugie, poziom *O*-GlcNAcyacji białek zmienia się w zależności od dostępności składników odżywczych, stymulacji komórek czynnikami wzrostu i insuliną, a także zależy od fazy cyklu komórkowego. Po trzecie, istnieje ścisły związek pomiędzy *O*-GlcNAcyacją i fosforylacją białek komórkowych. W wielu wypadkach reszty *O*-GlcNAc i fosforanowe rywalizują ze sobą o miejsce wiązania [3].

Szereg doniesień wskazuje na zaburzenia *O*-GlcNAcyacji w procesie nowotworzenia. W przypadku niektórych raków, np. tarczycy, piersi, płuc i jelita grubego, stwierdzono znaczne zmiany w poziomie *O*-GlcNAcyacji białek komórkowych, w porównaniu z tkanką prawidłową lub nowotworami łagodnymi [4–10]. Zmiany *O*-GlcNAcyacji skorelowane były ze zmianami aktywności lub ekspresji enzymów zaangażowanych w *O*-GlcNAcyację, czyli *O*-GlcNAc transferazy oraz  $\beta$ -*N*-acetylo-D-glukozaminidazy (OGA), enzymu odtaczającego reszty *O*-GlcNAc.

Wcześniejsze badania dotyczące oceny przydatności oznaczania ekspresji genu kodującego  $\beta$ -*N*-acetylo-D-glukozaminidazę (*MGEA5*) w moczu kobiet chorych na nowotwory pęcherza moczowego dały bardzo obiecujące wyniki ze względu na wysoką czułość (85,2%) i swoistość (95,0%) tego markera molekularnego. Wyznaczona wartość progowa 98,3 pozwoliła na precyzyjne oddzielenie od siebie populacji kobiet chorych na nowotwory pęcherza moczowego od grupy kobiet zdrowych [11]. Biorąc pod uwagę te wyniki, jak również coraz liczniejsze dane sugerujące zaangażowanie *O*-GlcNAcyacji

w procesy związane z powstawaniem i progresją nowotworów, interesujące wydaje się zbadanie u pacjentek z nowotworami pęcherza moczowego również ekspresji OGT. W związku z powyższym, celem badań była ocena ekspresji OGT na poziomie matrycowego kwasu rybonukleinowego (mRNA) w czasie rzeczywistym (*real-time*) metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR) oraz ocena przydatności diagnostycznej i prognostycznej badanego genu jako markera transformacji nowotworowej pęcherza moczowego u kobiet w wieku pomenopauzalnym.

## Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły preparaty moczu pozyskanego od 52 kobiet ze zdiagnozowanymi nowotworami pęcherza moczowego. Średnia wieku w tej grupie wynosiła  $56,8 \pm 13,4$ . U 46 kobiet zdiagnozowano raka pęcherza moczowego, natomiast u 6 brodawczakowaty nowotwór przejściowonabłonkowy o niskim potencjale złośliwości (*papillary urothelial neoplasm of low malignant potential* – PUNLMP). Charakterystyka kliniczno-patologiczna preparatów przedstawiona została w tabeli I. Materiał kontrolny stanowiły preparaty moczu pozyskanego od 37 kobiet, u których w badaniu ultrasonograficznym (USG) nie zdiagnozowano zmian nowotworowych. Złuszczone komórki nabłonkowe izolowano z ok. 50 ml moczu. Bezpośrednio po pobraniu próbki moczu przechowywano w temperaturze 4°C do chwili wykonywania oznaczeń, a następnie wirowano przy 2000 obr./min przez 15 min. Otrzymany osad przemywano dwukrotnie zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej (pH 7,6) i przechowywano w temperaturze –80°C do dalszych oznaczeń.

### Izolowanie kwasu rybonukleinowego i synteza komplementarnego kwasu deoksyrybonukleinowego

Całkowity kwas rybonukleinowy (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 kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) była wartość  $A_{260}/A_{280}$  mieszcząca się w granicach

**Tab. I.** Charakterystyka kliniczno-patologiczna osób chorych i badanych preparatów

Charakterystyka	Chore n = 52 (%)
wiek [lata]	
przedział	52–88
średnia ± SD	56,8 ±13,4
typ nowotworu	
<i>Carcinoma urotheliale</i>	46 (88,5)
PUNLMP	6 (11,5)
stopień zróżnicowania histologicznego	
G1	22 (42,3)
G2	11 (21,1)
G3	13 (36,6)
stopień zaawansowania klinicznego	
Ta–T1	31 (59,6)
T2–T4	15 (40,4)

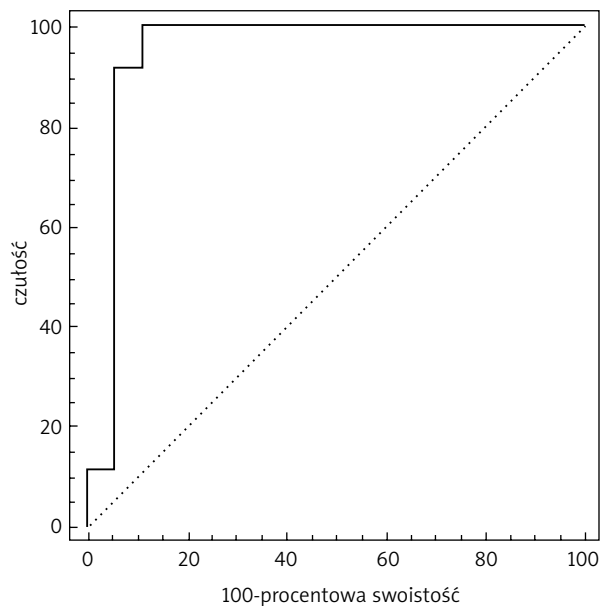
PUNLMP – brodawkczakowaty nowotwór przejściowonabłonkowy o niskim potencjale złośliwości (*papillary urothelial neoplasm of low malignant potential*); SD – odchylenie standardowe (*standard deviation*).

1,8–2,0. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono przy użyciu zestawu PCR Kit ver. 3.0 (Takara Bio Inc. Japonia) zgodnie z zaleceniami producenta. Komplementarny DNA (*complementary DNA* – cDNA) przechowywano w temperaturze –20°C.

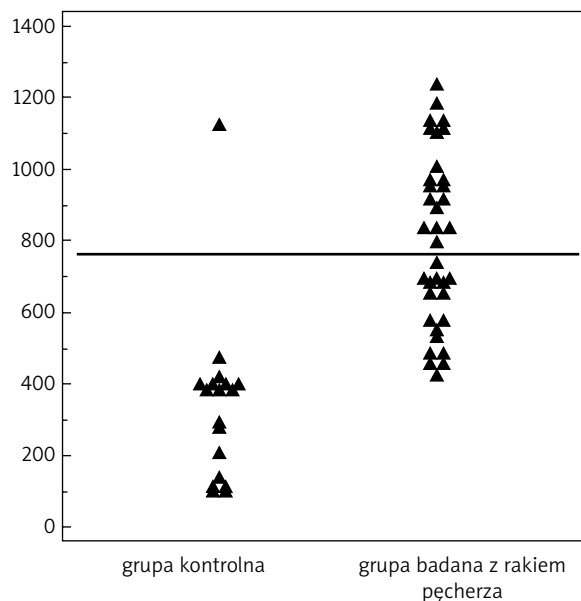
**Analiza ilościowa produktu amplifikacji w czasie rzeczywistym**

Otrzymany RNA stanowił matrycę w reakcji *real-time* PCR dla oznaczenia liczby kopii mRNA dla genu *OGT*. 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 H<sub>2</sub>O. Reakcję łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym 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*. Do badań zastosowano następujące sondy TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA): *OGT* – Hs00269228, *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). Za statystycznie istotną przyjęto wartość *p* < 0,05. Diagnostyczną wartość progową dla *OGT* wyznaczono na podstawie krzywej charakterystyki odbiornika (*receiver operating characteristic* – ROC). Dla wartości tej obliczano czułość i swoistość. W oparciu o obliczone parametry utworzono wykres zależności czułości od wartości (100-procentowa swoistość). Wykres ten (krzywa ROC) posłużył do oceny zdolności



**Ryc. 1.** Krzywa charakterystyki odbiornika dla genu *N*-acetyloglukozaminy transferazy z wiązaniem *O*-glikozydowym (*OGT*)



**Ryc. 2.** Rozkład wartości relatywnej ekspresji genu *N*-acetyloglukozaminy transferazy z wiązaniem *O*-glikozydowym (*OGT*) w grupie kontrolnej i badanej. Wartość progowa 416,93

rozdzielczej testów diagnostycznych. Pole pod krzywą (*area under curve* – AUC) ROC było sprawdzianem zdolności rozdzielczej testu. Za optymalną wartość graniczną dla *OGT* uznano wartość 416,93.

**Wyniki**

Ekspresję mRNA dla genu *OGT* stwierdzono w 36 z 46 (78,2%) preparatów moczu pozyskanego od kobiet ze zdiagnozowanym rakiem pęcherza moczowego, na-

tomiast uwzględniając wyznaczoną normę – w 19 z 46 (41,3%). W grupie kontrolnej ekspresja ta wynosiła odpowiednio 18 z 37 (48,6%) i zgodnie z wyznaczoną normą 1 z 37 (2,7%).

Czułość OGT wynosiła 100%, a swoistość 88,9%. Pole pod krzywą ROC wynosiło 0,946 (ryc. 1). Rozkład wartości relatywnych charakteryzujących ekspresję mRNA dla genu *OGT* w odniesieniu do wartości progowej przedstawia rycina 2.

## Dyskusja

Funkcja *O*-GlcNAcyacji w powstawaniu i progresji nowotworów nie została jednoznacznie określona. Wyniki badań wskazują jednak, że analiza ekspresji i aktywności enzymów zaangażowanych w tę modyfikację może mieć bardzo istotne znaczenie w diagnostyce nowotworów. Duże natężenie *O*-GlcNAcyacji skorelowane z dużą ekspresją OGT wydaje się dobrym markerem progresji nowotworów piersi [6, 10]. Wykazano, że ekspresja OGT jest znacznie większa w rakach piersi słabo zróżnicowanych, o wyższym stopniu złośliwości niż w rakach dobrze zróżnicowanych. Z kolei małe stężenie mRNA dla OGA jest skorelowane z występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych [10]. Stwierdzono także, że mała ekspresja OGA może być niezależnym czynnikiem rokowniczym w przypadku nawrotu raka wątrobowokomórkowego [9].

W prezentowanej pracy dokonano oceny przydatności diagnostycznej ekspresji OGT w moczu kobiet chorych na nowotwory pęcherza moczowego. Uzyskane wyniki wskazują, że oznaczanie ekspresji OGT na poziomie mRNA może się stać użytecznym wskaźnikiem w diagnostyce nowotworów pęcherza moczowego u kobiet w wieku pomenopauzalnym, ponieważ przy progowej wartości OGT 416,93 czułość testu wynosiła 100%, a swoistość 88,9%.

W piśmiennictwie naukowym coraz częściej podkreśla się konieczność wytypowania grupy markerów molekularnych, tak dobranych, aby w najlepszy sposób charakteryzowały one proces nowotworowy toczący się w obrębie dróg moczowych i które można by wykorzystać do poprawy diagnostyki raka pęcherza moczowego [12]. Wyniki badań autorów niniejszej pracy sugerują, że za-

równo OGT, jak i analizowany wcześniej gen kodujący  $\beta$ -*N*-acetylo-D-glukozaminidazę mogą być włączone do panelu markerów, których oznaczenie w moczu kobiet w wieku pomenopauzalnym chorych na nowotwory pęcherza moczowego ma wartość diagnostyczną i prognostyczną. Dalsze badania na odpowiednio licznych grupach są niezbędne do stwierdzenia, czy proponowane przez autorów markery mogą być w przyszłości pomocne w podejmowaniu decyzji klinicznych.

*Praca wykonana z funduszy działalności statutowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr 503/O-157-01/503-01.*

*Praca wykonana z funduszy działalności statutowej Uniwersytetu Łódzkiego.*

## Piśmiennictwo

- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between *O*-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem* 2011; 80: 825-58.
- Slawson C, Hart GW. *O*-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 678-84.
- Hanover JA, Krause MW, Love DC. The hexosamine signaling pathway: *O*-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800: 80-95.
- Krześlak A, Pomorski L, Lipińska A. Elevation of nucleocytoplasmic beta-*N*-acetylglucosaminidase (*O*-GlcNAcase) activity in thyroid cancers. *Int J Mol Med* 2010; 25: 643-8.
- Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, et al. Nutrient sensor *O*-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* 2010; 29: 2831-42.
- Gu Y, Mi W, Ge Y, et al. GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2010; 70: 6344-51.
- Mi W, Gu Y, Han C, et al. *O*-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 514-9.
- Shi Y, Tomic J, Wen F, et al. Aberrant *O*-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2010; 24: 1588-98.
- Zhu Q, Zhou L, Yang Z, et al. *O*-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Med Oncol* 2011; 24: 567-71.
- Krześlak A, Forma E, Bernaciak M, et al. Gene expression of *O*-GlcNAc cycling enzymes in human breast cancers. *Clin Exp Med* 2011; DOI 10.1007/s10238-011-0138-5.
- Róžański W, Lipiński M, Woźniak P i wsp. Ocena przydatności  $\beta$ -*N*-acetylo-D-glukozaminidazy i endogliny jako markerów molekularnych w diagnostyce nowotworów pęcherza moczowego u kobiet w wieku pomenopauzalnym. *Przeegl Menopauz* 2011; 3: 197-201.
- Yutkin V, Nisman B, Pode D. Can urinary biomarkers replace cystoscopic examination in bladder cancer surveillance? *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10: 787-90.