

## Livelli di espressione della tankirasi nel carcinoma della vescica e nelle urine\*

Silvia Quattrone<sup>1</sup>, Stefania Gelmini<sup>1</sup>, Cesare Selli<sup>2</sup>, Donata Villari<sup>3</sup>, Bruno Neri<sup>4</sup>, Mario Pazzagli<sup>1</sup>, Claudio Orlando<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Unità di Biochimica Clinica, Università degli Studi di Firenze

<sup>2</sup>Dipartimento di Chirurgia, Università degli Studi di Pisa

<sup>3</sup>Dipartimento di Urologia, Università degli Studi di Firenze

<sup>4</sup>Dipartimento di Oncologia, Università degli Studi di Firenze

### ABSTRACT

#### Tankyrase mRNA in bladder cancer and urine.

The control of human telomere length requires a telomere-specific DNA binding protein, TRF1 (telomeric repeat binding factor-1). Tankyrase (TK), a telomeric protein with homology to the catalytic domain of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase, contains 24 ankyrin repeats in a domain responsible for its interaction with TRF1. ADP-ribosylation of TRF1 decreases its ability to bind to telomeric DNA and causes telomere elongation, a mechanism connected to cell immortalization and cancer development. Because of the strong tendency of bladder cancer to recur, the monitoring of asymptomatic patients has a particular importance. TK mRNA expression was measured with a quantitative method (real time RT-PCR) in bladder cancers (n=45) and in corresponding normal mucosae. In all patients, TK mRNA was also measured in exfoliated cells collected with voided urine. The expression of TK mRNA in superficial ( $6.2 \pm 1.9 \times 10^5$ ) and infiltrating ( $13.0 \pm 3.5 \times 10^5$ ) bladder cancer were significantly higher ( $p=0.016$  and  $p=0.023$ , respectively) than in corresponding normal tissues ( $2.3 \pm 0.3 \times 10^5$ ). We found the highest concentrations of urinary TK mRNA in patients affected by infiltrating bladder cancer ( $3.7 \pm 2.4 \times 10^4$ ), whereas in patients with non infiltrating superficial bladder cancers TK mRNA was lower ( $9.9 \pm 8.3 \times 10^3$ ), but still significantly different from normal controls ( $1.2 \pm 3.7 \times 10^2$ ,  $p < 0.005$ ). In conclusion TK mRNA appears a promising tool in bladder cancer diagnosis and follow-up.

### RIASSUNTO

Il controllo della lunghezza dei telomeri nell'uomo richiede la presenza di una specifica proteina, TRF1 (telomeric repeat binding factor-1). La tankirasi (TK) è una proteina telomerica che presenta omologie con il dominio catalitico della PARP ((poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase) e contiene 24 ripetizioni di tipo ankirinico a livello del dominio responsabile della sua interazione con TRF1. L'ADP ribosilazione di TRF1 diminuisce la sua abilità di legarsi al DNA telomerico e causa un allungamento dei telomeri, meccanismo connesso all'immortalizzazione cellulare e alla carcinogenesi. Considerando l'alta tendenza di recidive dei carcinomi della vescica, il monitoraggio di pazienti asintomatici riveste un'importanza fondamentale. L'espressione dell'mRNA di TK è stata misurata con un metodo quantitativo (real time PCR) in carcinomi vescicali (n=45) e nelle corrispondenti mucose normali. In tutti i pazienti, l'mRNA di TK è stato misurato anche nel rispettivo sedimento urinario ottenuto da un campione di urine raccolte prima dell'intervento chirurgico. L'espressione dell'mRNA di TK nei carcinomi della vescica superficiali ( $6,2 \pm 1,9 \times 10^5$ ) e infiltranti ( $13,0 \pm 3,5 \times 10^5$ ) era significativamente maggiore ( $p=0,016$  and  $p=0,023$ , rispettivamente) rispetto a quella dei corrispondenti tessuti normali ( $2,3 \pm 0,3 \times 10^5$ ). Le concentrazioni maggiori di mRNA di TK urinario si sono ritrovate nei pazienti affetti da carcinoma vescicale infiltrante ( $3,7 \pm 2,4 \times 10^4$ ), mentre nei pazienti con carcinoma vescicale superficiale l'mRNA di TK risultava più basso ( $9,9 \pm 8,3 \times 10^3$ ), ma ancora significativamente diverso da quello dei controlli normali ( $1,2 \pm 3,7 \times 10^2$ ,  $p < 0,005$ ). In conclusione l'mRNA di TK potrebbe rappresentare un valido strumento nella diagnosi e nel follow-up del carcinoma della vescica.

### INTRODUZIONE

I carcinomi uroteliali, che comprendono il carcinoma della vescica, il carcinoma uretrale ed il carcinoma della pelvi renale, sono i tumori più comuni del tratto urinario. Si manifestano fondamentalmente in due forme, superficiale

di basso grado e invasivo di alto grado. Nel caso del cancro della vescica più del 50% dei pazienti con carcinoma superficiale dopo resezione endoscopica presenta ricadute ricorrenti, e di questi circa il 15% sviluppano carcinoma invasivo e/o metastatico. La maggior parte dei

\*Lavoro presentato al "SIBioC 2003, 35° Congresso Nazionale della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Firenze 14-17 Ottobre 2003

pazienti con tumore avanzato presentano al momento della diagnosi iniziale carcinoma invasivo, e di questi il 50% presenta già metastasi a distanza (1).

Per la diagnosi, la cistoscopia e l'ureteroscopia rimangono gli standard di riferimento come metodi di indagine, ma sono procedure molto invasive. Inoltre, considerando l'alta tendenza di recidive dei carcinomi della vescica, il monitoraggio di pazienti asintomatici riveste un'importanza fondamentale (2). Ad oggi non sono stati individuati fattori prognostici certi utili nella predizione della prognosi e nella valutazione dell'estensione del carcinoma vescicale.

Recentemente è stata identificata una nuova proteina localizzata a livello dei telomeri umani, la tankirasi (TK). Questa proteina contiene 24 ripetizioni di tipo ankirinico a livello del suo dominio centrale e un dominio carbossiterminale omologo a quello catalitico della poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase (PARP) (3). Nella TK il dominio ankirinico è responsabile dell'interazione con un'altra proteina telomerica, telomeric repeat binding factor-1 (TRF1), un fattore di regolazione negativa richiesto per la normale funzione dei telomeri mentre il suo dominio PARP è utilizzato per ADP-ribosilare se stessa e TRF1, inibendo così la sua capacità di legarsi ai telomeri. La TK rappresenta così, come la telomerasi, un regolatore positivo della lunghezza dei telomeri e quindi la sua attivazione può essere coinvolta nei meccanismi di cancerogenesi.

Scopo di questo studio è stato quello di misurare l'espressione dell'mRNA della TK in una casistica di tumori vescicali superficiali e infiltranti, per valutare il coinvolgimento di tale proteina telomerica in questo tipo di tumori uroteliali. In aggiunta la presenza dello specifico mRNA suddetto è stata valutata anche nei sedimenti urinari degli stessi soggetti, per valutare la possibile valenza diagnostica di questo parametro nella diagnosi del tumore della vescica.

## MATERIALI E METODI

Nel nostro studio abbiamo misurato l'espressione dell'mRNA della TK con un metodo quantitativo in 45 carcinomi della vescica, di cui 35 carcinomi superficiali e 10 tumori infiltranti e nelle corrispondenti mucose vescicali non affette. In tutti i pazienti, l'mRNA della TK è stato anche misurato nel rispettivo sedimento urinario ottenuto da un campione di urine raccolte prima dell'intervento chirurgico. L'mRNA per la TK è stato misurato anche in 20 campioni urinari di altrettanti soggetti sani utilizzati come controllo. I campioni di urine venivano centrifugati a freddo a 2000 rpm per 15 min ed il sedimento così ottenuto sottoposto a 2 lavaggi con 20 ml di PBS ognuno, seguiti da centrifugazione a freddo a 2000 rpm per 15 min.

### Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto dai campioni di tessuto tumorale e sano, conservati in RNAlater (Qiagen, Milan, Italy) con l'"RNeasy Mini kit" (Qiagen, Milan, Italy) seguendo il protocollo fornito dal produttore. Lo stesso kit è stato utilizzato per l'estrazione e la purificazione dell'RNA nei

sedimenti urinari. I campioni di RNA sono stati eluiti con 50 µl di acqua RNase free. La concentrazione e la purezza dell'RNA sono state determinate tramite dosaggio allo spettrofotometro dopo trattamento con DNasi (RNase free DNase set, Qiagen, Italy).

### Retrotrascrizione

Per ogni campione 400 ng di RNA sono stati retrotrascritti in un volume finale di 80 µl utilizzando reagenti Perkin Elmer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) alle seguenti concentrazioni: 1X TaqMan RT buffer (500 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.3); MgCl<sub>2</sub> 5,5 mM; dNTPs 500 µM ciascuno; Random hexamer 1,25 µM; RNase inhibitor 0,4 U/µl; Multiscribe Reverse Transcriptase 1,25 U/µl, utilizzando Gene Amp 9700 Thermal Cycler (PE Applied Biosystems). I campioni sono stati incubati a 25°C per 10 min, retrotrascritti a 48°C per 30 min, l'enzima è stato poi inattivato a 95°C per 5 min ed è seguito raffreddamento a 4°C. L'RNA totale isolato dalla linea cellulare DU145 (carcinoma prostatico umano) è stato utilizzato per generare la curva standard per il successivo saggio TaqMan (Fig. 1). Questa linea cellulare è stata scelta in quanto presenta una espressione relativamente elevata dell'mRNA di TK.

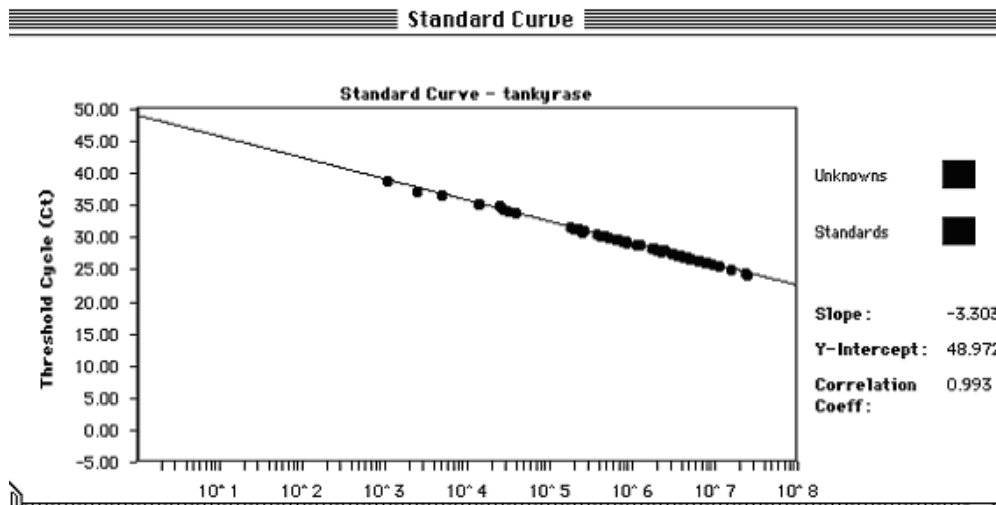
### Real time PCR

I primers e la sonda TaqMan per la misura dell'espressione dell'mRNA di TK sono stati selezionati utilizzando il software "primer express" (PE Applied Biosystems). Venticinque ng di cDNA (5 µl/tubo) sono stati utilizzati per ciascun campione in un volume finale di 25 µl di mix di PCR contenente: 1X TaqMan Universal Master Mix e 300 nM primers e sonda. Le condizioni di amplificazione sono le seguenti: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, poi 40 cicli a 95°C per 15 sec, 60°C per 1 min. Ogni campione è stato riprodotto in triplicato ed ogni esperimento comprendeva un controllo positivo (cDNA della linea di neuroblastoma CHP404) ed un controllo negativo. Per la reazione di PCR è stato utilizzato il termociclatore ABI Prism 7700 Sequence Detector (PE Applied Biosystems). Per il dosaggio dello specifico mRNA per la TK nei sedimenti urinari siamo ricorsi ad un dosaggio di tipo relativo. Negli stessi retrotrascritti abbiamo quindi misurato l'espressione dell'mRNA per GAPDH, utilizzato come gene di riferimento per la normalizzazione dei dati quantitativi. Dal confronto dei valori di ciclo soglia (Ct) del gene target (tankirasi) e del gene di riferimento (GAPDH) abbiamo valutato l'espressione relativa di ogni campione con la formula:  $\Delta Ct = (Ct \text{ GAPDH} - Ct \text{ Tankirasi})$ . I valori così ottenuti sono stati poi normalizzati utilizzando un calibratore. I risultati di ogni dosaggio dell'mRNA per la TK sono quindi stati espressi come valori relativi dal rapporto Tankirasi/GAPDH.

## RISULTATI

### Tessuti

I livelli medi di espressione dell'mRNA per la TK nei



**Figura 1**

Curva standard per la tankirasi costruita utilizzando l'RNA totale estratto dalla linea cellulare DU145 (carcinoma prostatico umano) scelta in quanto presenta una espressione relativamente elevata dell'mRNA di tankirasi

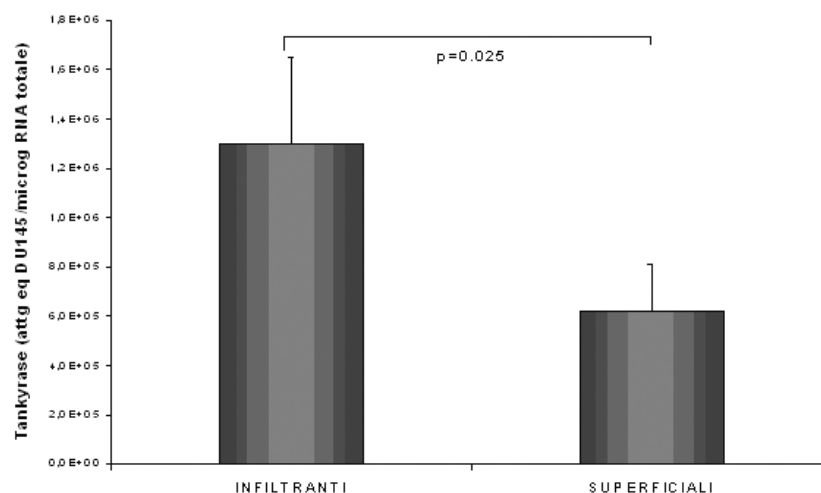
tumori superficiali della vescica ( $6,2 \pm 1,9 \times 10^5$  attg eq RNA DU145/ $\mu\text{g}$  RNA totale) sono risultati significativamente ( $p=0,016$ ) più elevati rispetto ai corrispondenti valori misurati nelle mucose non affette di controllo ( $1,8 \pm 0,3 \times 10^5$ ).

Similmente i valori dell'mRNA di TK nei tumori infiltranti ( $13,0 \pm 3,5 \times 10^5$ ) erano significativamente più elevati ( $p=0,023$ ) rispetto ai loro controlli non affetti ( $0,3 \pm 0,09 \times 10^5$ ). Inoltre il confronto dei livelli medi trovati nei due gruppi di tumori rivelavano un significativo ( $p=0,025$ ) aumento dell'espressione dell'mRNA della TK nei tumori a più alta aggressività (infiltranti) rispetto a quelli superficiali (Fig. 2). Infine i livelli di mRNA di TK nei due gruppi di tumori vescicali risultavano significativamente ( $p=0,017$ )

correlati ai valori misurati nei rispettivi tessuti non affetti.

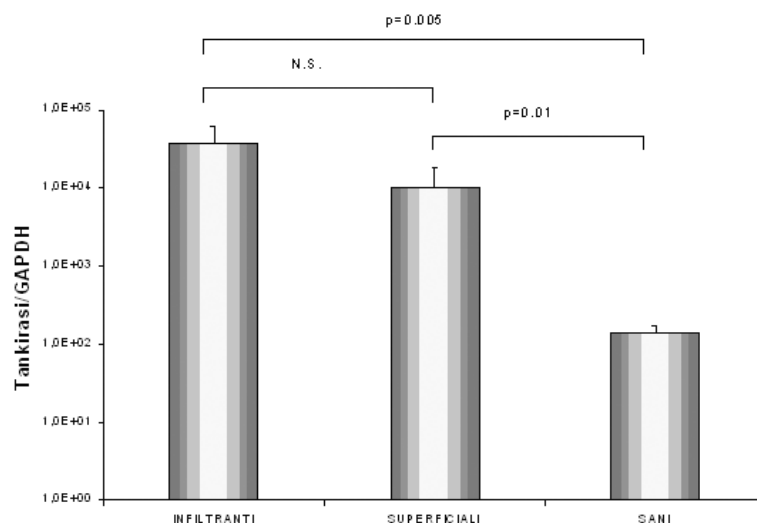
### Sedimenti Urinari

Nei sedimenti urinari l'espressione della TK risultava significativamente maggiore ( $p=0,01$ ) nei carcinomi superficiali ( $9,9 \pm 8,3 \times 10^3$ ) rispetto ai controlli sani ( $1,4 \pm 0,3 \times 10^2$ ). In maniera del tutto sovrapponibile i livelli urinari di TK mRNA ottenuti nei pazienti con carcinomi infiltranti ( $3,7 \pm 2,4 \times 10^4$ ) risultavano significativamente elevati ( $p=0,005$ ) rispetto ai campioni di controllo (Fig 3). La differenza tra i livelli dei valori urinari di TK mRNA tra i due gruppi di tumori non raggiungevano invece la significatività statistica ( $p=0,2$ ).



**Figura 2**

Livelli medi di espressione dell'mRNA di tankirasi nei tessuti di tumori della vescica infiltranti ( $n=10$ ) e superficiali ( $n=35$ ). I valori sono espressi come attogrammi equivalenti di RNA della linea cellulare DU145 per  $\mu\text{g}$  di RNA totale



**Figura 3**

Livelli medi di espressione dell'mRNA di tankirasi nei sedimenti urinari dei pazienti con carcinoma vescicale infiltrante (n=10), carcinoma vescicale superficiale (n=35) e nei campioni urinari di soggetti sani (n=20) utilizzati come controllo. I valori sono espressi come valori relativi dal rapporto fra il gene target e quello di riferimento: Tankirasi/GAPDH.

## CONCLUSIONI

I dati ottenuti in questo studio sembrano indicare che l'espressione di TK risulta aumentata nei tumori della vescica, se confrontati a quanto misurabile nei corrispondenti tessuti non affetti prelevati dagli stessi pazienti ed utilizzati come campioni di controllo. L'aumento dell'espressione appare comunque più evidente nei tumori di tipo infiltrante, dimostrando quindi un'associazione tra l'entità dell'espressione del gene e il grado di aggressività della neoplasia. Questo dato sembra avvalorare un dato già noto per altre proteine telomeriche (telomerasi), la cui espressione rappresenta certamente un evento precoce nelle varie tappe della carcinogenesi ed influenzano il comportamento biologico del tumore.

Come a suo tempo dimostrato per la misura dell'attività telomerasica e per l'espressione della subunità catalitica della telomerasi (hTERT), nel sedimento urinario dei soggetti affetti da carcinoma della vescica i livelli di mRNA per TK risultano costantemente e significativamente più elevati rispetto a quanto misurabile nei sedimenti urinari di soggetti normali di controllo. Anche in questo caso però

questo tipo di aumento risulta particolarmente più elevato nei soggetti con tumore infiltrante rispetto a quello dei pazienti con tumori superficiali.

Tutti i dati fin qui raccolti sembrano indicare che la TK potrebbe rappresentare un valido strumento nella diagnosi e nel follow-up del carcinoma della vescica, soprattutto per la facilità legata all'impiego di un dosaggio non invasivo come quello possibile nel sedimento urinario.

## BIBLIOGRAFIA

1. Miyake H., Eto H., Arakawa S., Kamidono S and Hara I. "Over expression of CD44V8-10 in urinary exfoliated cells as an independent prognostic predictor in patients with urothelial cancer" J Urol., 167, 1282-87; 2002.
2. Inoue T., Nakanishi H., Inada K.-I., Hioki T., Tatematsu M. and Sugimura Y. "Real time reverse transcriptase polymerase chain reaction of urinary cytokeratin 20 detects transitional cell carcinoma cells" J Urol., 166, 2134-41; 2001.
3. Smith S., Giriat I., Schmitt A., De Lange T. " Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres" Science, 282, 1484-87; 1998.