

HOT TOPICS

IN UROLOGIA



Studio Real-Time PCR di Bradeion (SEPT4) come nuova marker urinario di neoplasia vescicole: Espressione genica quantitativa e relativa

M. Racioppi, L. Bongiovanni, F. Sasso, A. Volpe, D. D'Agostino, F. Marangi, P.F. Bassi

Clinica Urologica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico "A. Gemelli" Roma

Riassunto:

Obiettivo: Al fine di valutare l'affidabilità di nuovi marker urinari per la diagnosi ed il follow-up delle neoplasie vescicali, abbiamo testato, mediante studio Real-Time PCR, il prodotto genico del Bradeion, una proteina omonima, conosciuta anche come SEPT4. Si tratta di una proteina GTPasica appartenente alla famiglia delle septine, implicate in processi cellulari quali citochinesi ed esocitosi, ma con proprietà strutturali e modalità di azione ancora largamente ignote.

Metodi: Dal 2005 al 2007 abbiamo raccolto campioni di urine in pazienti ricoverati per neoplasia vescicale. Unico criterio di esclusione è stata la presenza di ematuria macroscopica al momento della raccolta del campione. I pazienti arruolati, dopo la raccolta del campione sono stati sottoposti a resezione endoscopica e, in caso di neoplasia muscolo-infiltrante, a cistectomia radicale; la stratificazione conclusiva è avvenuta al momento della disponibilità dell'esame istologico definitivo. Sono stati selezionati 58 soggetti (M=52; F=6; età media 70 anni) dei quali 41 (M=35; F=6) affetti da neoplasia vescicale (pTa=11; pT1=18; pT2-3=12) e 17 soggetti sani (M=17; età media 35 anni) come controlli.

Sui campioni d'urina raccolti, dopo filtraggio e reversione dell'mRNA, abbiamo quantificato nei vari gruppi l'espressione genica del Bradeion mediante RT-PCR. E' stata eseguita quindi una valutazione dell'espressione genica quantitativa e relativa dopo normalizzazione con il gene "housekeeper" 18S. L'analisi statistica è stata eseguita mediante Mann-Whitney test e costruzione di ROC curve.

Risultati: L'analisi quantitativa dell'espressione genica (ΔCt) ha mostrato valori di 15,65 (pTa), 17,25 (pT1), 18 (pT2/pT3); 20,1Ct (controlli). Lo studio statistico evidenzia significatività elevata in diverse comparazioni fra stadi.

Lo studio mediante ROC curve (AUC=0,79, 95% CI 0,67-0,89, $p=0,0001$) ha individuato un cut-off ≤ 20 (sensibilità 92,7%, specificità 64,7%). Inoltre, nel corso dello studio di espressione relativa si è registrata una notevole overespressione del gene nei soggetti affetti.

Discussione: Dai risultati registrati emerge un'elevata significatività statistica nel confronto tra pazienti e controlli; non significativa è la differenza tra pazienti con differenti stadi di neoplasia. L'analisi di quanto riportato potrebbe già quindi prefigurare un ruolo del Bradeion(SEPT4) come marker urinario di presenza di malattia. L'individuazione di un cut-off di 20Ct, sufficientemente sensibile e specifico, rafforza questa impressione. Ovviamente, studi su un più ampio numero di pazienti saranno necessari per confermare quanto riportato in via preliminare.

Conclusioni: Lo studio preliminare mediante RT-PCR del Bradeion(SEPT4) come marker urinario di neoplasia vescicale ha fornito risultati promettenti e comunque tali da giustificare uno studio di fase successiva su un maggior numero di pazienti.

1. Introduzione

Il cancro della vescica è il secondo maggiore tumore della sfera urologica nel sesso maschile e il decimo, in ordine di frequenza nel sesso femminile; l'età media alla diagnosi è 65 anni [1]. A livello mondiale nel 2000 sono stati diagnosticati 336.000 nuovi casi di cancro della vescica. I paesi a maggiore incidenza includono Stati Uniti, Canada, Francia, Danimarca, Italia, Spagna ed Egitto. Secondo il National Cancer Institute's (NCI) Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) l'incidenza anno-relata dal cancro della vescica negli Stati Uniti nel 1999 è stata 21,2 casi su 100.000 nella popolazione, con la maggior parte dei casi verificatisi negli uomini la cui incidenza nel 2000 è stata di 3-4 volte più elevata: in particolare si sono verificati circa 260.000 nuovi casi nella popolazione maschile e 75.000 in quella femminile [2,3]. La prevalenza del cancro della vescica negli Stati Uniti è stata riportata in un range compreso tra 450.000 e 619.000, approssimativamente 165-220 casi per 100.000. In Italia, nel 2000, la stima è stata di 14.000 nuovi casi negli uomini e 3.000 nelle donne. L'andamento della mortalità anno-relata dovuta al cancro della vescica negli Stati Uniti, nel 1999, è stata 4,4 morti per 100.000 abitanti [4]. Nel 2000, il cancro della vescica è stato responsabile di 12.200 morti negli Stati Uniti e più di 132.400 nel mondo.

Si è stimato che nel 2007 ci sono state più di 67.000 diagnosi di tumori della vescica [5]. Approssimativamente, al momento della diagnosi nell'80% dei casi la malattia è di tipo superficiale (limitata alla mucosa e alla lamina propria). In un terzo dei casi la malattia, alla diagnosi, avrà interessamento muscolare [6]. Comunque, la maggior parte dei tumori superficiali recidiva e nel 15-20% dei casi progredisce verso una forma muscolo-invasiva. La diagnosi precoce del tumore della vescica, attraverso l'identificazione dei tumori prima che essi invadano lo strato muscolare, può migliorare la prognosi del paziente e ridurre i casi in cui si rende necessario il ricorso alla cistectomia. L'iter diagnostico del tumore della vescica passa attraverso l'uso della cistoscopia, dello studio radiografico e della citologia urinaria (iter di indagine tumorale più costoso in assoluto) [7]. La cistoscopia di controllo resta l'esame standard nell'identificare le recidive nei pazienti in follow-up. Purtroppo, la cistoscopia non è solo una procedura invasiva, ma avendo una sensibilità inferiore al 70% non permette il riconoscimento della presenza di neoplasia in oltre il 30% dei casi. In associazione a questa procedura è stata usata, con le riconosciute limitazioni, la

citologia urinaria, almeno fino alla scoperta di alternativi biomarker urinari. Negli ultimi dieci anni si è assistito ad importanti progressi nel campo della produzione di marcatori urinari per la ricerca del tumore della vescica, progressi legati soprattutto allo sviluppo della genomica e della proteomica. Un marcatore efficace nella diagnosi di neoplasia vescicale dovrebbe costare poco, ridurre il ricorso alla cistoscopia ed identificare facilmente lo stadio del tumore. Il marcatore ideale dovrebbe quindi essere non invasivo, facile da dosare, affidabile ed efficace. È necessario che abbia un'alta sensibilità perché soprattutto nella gestione dei pazienti in follow-up un tumore non riconosciuto aumenterebbe il rischio di progressione della malattia e quindi di mortalità; d'altra parte, è anche necessaria un'alta specificità poiché, in quel caso, i falsi positivi richiederebbero una valutazione cistoscopia invasiva del tutto inutile. Esistono numerosi buoni marcatori, ma ancora non è stato scoperto quello ideale. L'utilizzo dei biomarcatori per il tumore della vescica ha lo scopo di sostituire o comunque di ridurre l'utilizzo della cistoscopia come mezzo di indagine diagnostica primaria o di follow-up. Bisogna tener anche presente, che i pazienti non sono disposti a sostituire la cistoscopia con test la cui sensibilità sia inferiore al 90-95 % e a compromettere, quindi, l'accuratezza della diagnosi di tumore vescicale [8]. Sebbene in campo urologico si utilizzino dei marcatori, come ad esempio il PSA (nella diagnosi del tumore della prostata), per quanto riguarda il tumore di vescica non è largamente usato nessun tipo di marcatore, forse anche a causa della riluttanza da parte degli stessi urologi e dei pazienti nel sostituire lo standard attuale.

Al fine di valutare l'affidabilità di nuovi marker urinari per la diagnosi ed il follow-up delle neoplasie vescicali, abbiamo testato, mediante studio Real-Time PCR, un probabile nuovo marker molecolare urinario, il prodotto genico del Bradeion, una proteina omonima, conosciuta anche come SEPT4. Si tratta di una proteina GTPasica appartenente alla famiglia delle septine, implicate in processi cellulari quali citochinesi ed esocitosi, ma con proprietà strutturali e modalità di azione ancora largamente ignote. Abbiamo quindi eseguito multiple comparazioni fra pazienti affetti da cancro vescicale in diversi stadi di malattia stratificati secondo il T, e comparazione di questi con soggetti del gruppo controllo, analizzando sia le differenze quantitative di espressione di tale marker nei vari gruppi che le differenze di espressione relativa rispetto ad un gene "housekeeper".

2. Materiali e metodi

Dal 2005 al 2007 presso il reparto di Urologia del Policlinico "A. Gemelli"- Roma, abbiamo raccolto campioni di urine in pazienti ricoverati per neoplasia vescicale, candidati ad intervento di TURB o cistectomia radicale. Abbiamo raccolto anche campioni di urine da soggetti sani come gruppo controllo. Unico criterio di esclusione dallo studio per i pazienti è stata la presenza di ematuria macroscopica al momento della raccolta del campione. Tutti i soggetti, pazienti e controlli, prima dell'arruolamento sono stati informati dello studio in corso ed hanno dovuto firmare apposito modulo di consenso informato. I pazienti arruolati, dopo la raccolta del campione sono stati sottoposti a resezione endoscopica e, in caso di neoplasia muscolo-infiltrante, a cistectomia radicale; la stratificazione conclusiva è avvenuta al momento della disponibilità dell'esame istologico definitivo. Per i controlli si è proceduto solo alla raccolta del campione d'urina.

Sui campioni raccolti, dopo filtraggio e reversione dell'mRNA, abbiamo quantificato nei vari gruppi l'espressione genica del Bradeion mediante RT-PCR.

2.1 Prelievo e conservazione del campione

Il campione d'urina (50 ml) è stato raccolto dai pazienti durante la prima minzione spontanea del mattino. Sono stati scartati i campioni di urina che presentavano una franca macroematuria. Dopo il prelievo i campioni sono stati immediatamente trasportati presso il Laboratorio di Biologia Molecolare (Istituto di Ematologia del Policlinico "A. Gemelli") dove sono stati conservati in ambiente refrigerato ad una temperatura non superiore a 4° C e lavorate entro un'ora dal prelievo.

2.2 Filtraggio e concentrazione del campione

I campioni di urina sono stati centrifugati a 1200 rpm utilizzando una centrifuga 5810R (Eppendorf) per 10 minuti a 4° C e quindi lavati due volte in tampone PBS e il pellet cellulare così ottenuto è stato conservato in Quiazol (Qiagen, Hilden, Germany) ad una temperatura di -40° C in un congelatore FR 400 (Dometic).

2.3 Estrazione e reversione dell'RNA

Dal pellet cellulare è stato estratto l'RNA secondo le specifiche fornite dalla ditta produttrice secondo il protocollo QIAGEN-EZ1 RNA Universal Tissue Kit (<http://www.qiagen.com>).

Il materiale genetico così ottenuto è stato quantizzato utilizzando uno spettrofotometro DU® 530 Life Science UV/Visible Spectrophotometers (Beckman Coulter, CA, USA).

Per ottenere il cDna è stato utilizzato 1µg di RNA e revertito utilizzando il QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN). La quantità di cDNA così ottenuta è stata testata eseguendo un esame PCR su di un gene housekeeping (GAPDH).

2.4 Quantificazione dell'espressione genica tramite PCR-Real Time

La PCR-Real Time è stata eseguita utilizzando l'iQ SYBR Green Supermix (BioRad Laboratories, CA, USA) e gli oligonucleotidi disegnati utilizzando il software Beacon Designer 4. In questo modo abbiamo ottenuto i primer da utilizzare.

Il protocollo della PCR-Real Time, le quantità di oligonucleotidi, di DNA polimerasi e di templatato utilizzati sono quelli specificati dalla ditta produttrice e nello specifico ogni kit utilizzato per la reazione conteneva in un volume di 1.25 ml x 10 ad un PH di 8,4 : 100 mM di KCl, 40 mM di Tris-HCl, 0.4 mM di ogni dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), iTaq DNA polimerasi attivato dopo uno step di denaturazione iniziale a 95° C, 6mM di MgCl₂, 20 nM di fluorescina e stabilizzatori.

2.4 Analisi dei dati ed analisi statistica

E' stata eseguita sia una valutazione dell'espressione genica quantitativa sia dell'espressione relativa dopo normalizzazione con gene "housekeeper" 18S, seguendo specifici algoritmi. Per l'espressione quantitativa sono stati valutati i Ct (cycle threshold) sia per target che housekeeper, con successiva normalizzazione del target con housekeeper ed ottenimento del ΔCt . Si è proceduto quindi a multiple comparazioni fra pazienti in diversi stadi di malattia stratificati secondo il T, e comparazione di questi con soggetti del gruppo controllo. L'analisi statistica è stata eseguita mediante Mann-Whitney test e costruzione di ROC curve.

Per quanto riguarda l'espressione relativa, mediante calcoli specifici, si è ottenuto il $\Delta\Delta Ct$ e valutato il dato $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabella I. Risultati della RT-PCR, in mediana e stratificazione per gruppi, in termini di Ct di 18S e Bradeion, ΔCt , $\Delta\Delta Ct$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

BRADEION					
Gruppo	Mediana 18s	Mediana SEPT4	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Controllo	12,75	32,85	20,1	0	1
Ta	12,25	27,9	15,65	-4,45	21,85
T1	12,775	30,025	17,25	-2,85	7,21
T2	11,2	29,2	18,0	-2,125	4,36

Tabella II. Analisi statistica sull'espressione quantitativa (ΔCt)

Mann-Whitney test (alfa = 0,05; 95% CI)	P	Bradeion	
		0,0021	<u>Ta vs CTRL</u>
		0,0025	<u>T1 vs CTRL</u>
		0,0300	<u>Infiltr vs CTRL</u>
		0,1479	<u>Superf. Vs Infiltr.</u>
		0,0004	<u>Superf vs CTRL</u>
		0,0004	<u>Pz vs CTRL</u>

CTRL = gruppo controllo

Superf. = gruppo Ta+T1

Infiltr. = T2 / T3

Pz = Ta + T1 + T2/T3

Figura 1. Grafico dell'analisi mediante ROC curve.

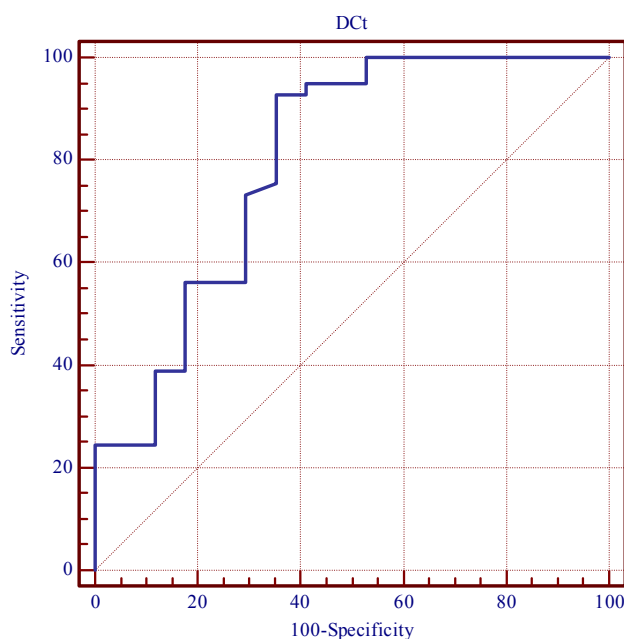


Tabella III. Risultati dell'analisi del dato quantitativo eseguita mediante ROC curve.

Area under the ROC curve (AUC)	0,798	Cut-off	≤20 Ct*
Standard error	0,0704	Sensitivity	92,68
95% CI	0,672 to 0,892	95% CI	80,1 - 98,4
z statistic	4,241	Specificity	64,71
Significance level P (Area=0.05)	0,0001	95% CI	38,4 - 85,7

4. Discussione

Nel 1973 furono identificate da Hartwell un gruppo di citochinesi mutanti durante la gemmazione di un lievito. Le proteine prodotte da questi geni (ScCdc3, ScCdc10, ScCdc11 e ScCdc12) localizzate nelle strutture filamentose del collo della gemma nel *Saccharomyces cerevisiae*, furono chiamate septine dal laboratorio di John Pringle. Le 13 septine umane conosciute sono straordinariamente simili, tutte hanno nella loro parte più lunga un dominio centrale GTP-binding affiancato da una regione multibasica e da un unico dominio chiamato septina. La complessità di questa famiglia di geni è aumentata dall'esistenza di uno splicing alternativo in molte septine umane, che aumentano notevolmente il numero delle potenziali isoforme espresse. L'espressione globale di tutti i membri della famiglia delle septine indica che alcune septine sono presenti in tutti i tessuti (es. SEPT9), mentre altre hanno una distribuzione ristretta per esempio come la SEPT3, essendo stata trovata solo nel tessuto cerebrale [9]. Alterazioni dell'espressione della septina sono state notate nel tumore e in altri stati patologici. Mentre in passato erano chiamate in causa come conseguenza di difetti della citochinesi, è chiaro che come nei lieviti, le septine sembrano avere multiple funzioni [10]. Non sarebbe sorprendente se l'aumento del numero e la complessa distribuzione delle septine dei mammiferi fossero associate ad un aumento del range delle funzioni cellulari. Dati da più fonti indicano, inoltre, che le septine umane possono interagire con altre septine, come anche con componenti del citoscheletro come l'actina e la tubulina. Le septine dunque

sarebbero implicate in processi cellulari quali citochinesi ed esocitosi, ma con proprietà strutturali e modalità di azione ancora largamente ignote.

Il prodotto genico del Bradeion (Cromosoma: 17; Localizzazione: 17q22-q23) è una proteina omonima, conosciuta anche come SEPT4.

Diverse linee di evidenza hanno suggerito che il SEPT4 potrebbe essere coinvolto nell'eziogenesi dei tumori. Tanaka e coll. identificarono due "splice variants" alternativi del SEPT4 (anche chiamata Bradeion) attraverso lo screening di una varietà di espressioni. I risultati preliminari mostrarono più del 70% delle positività in tutte le neoplasie urologiche fino ad ora studiate (tumore della prostata, del rene e della vescica). Il punto più straordinario è che non ci furono casi di falsi positivi (50 casi totali) nonostante la presenza di ematuria massiva e importanti infezioni. [11]

Infine bisogna dire che questi risultati non hanno portato alla scoperta di nuovi marcatori. Attualmente non sono disponibili ulteriori studi.

Considerando le poche esperienze precedenti riportate in letteratura, il nostro studio preliminare mediante RT-PCR del Bradeion (SEPT4) come marker urinario di neoplasia vescicale ha fornito risultati promettenti. I risultati dell'analisi quantitativa valutati statisticamente, anche se su bassa numerosità del campione studiato, mettono in luce come Bradeion sia un buon marker di neoplasia vescicale, in termini di sensibilità e specificità, soprattutto nelle neoplasie vescicali superficiali.

Tale dato viene anche confermato dalla valutazione dei risultati riguardo l'espressione relativa che vede il Bradeion fortemente iperespresso negli stadi superficiali.

Tali risultati spingono a proseguire lo studio su campioni di pazienti e controlli a numerosità maggiore.

Bibliografia

- [1] Napalkov P, Maisonneuve P, Boyle P: Epidemiology of bladder cancer. In: Superficial bladder cancer. Pagano F, Fair WR eds; ISIS medicai publi, Oxford 1997; pp 1-23.
- [2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94:153-6.
- [3] Catalona WJ: Tumori di origine uroteliale. In: *Urologia di Campbell*. Walsh, Retik, Stamey, Vaughan eds; Verduci publ; pp 1131-1188.
- [4] Parkin DM, Muir CS, Whelan S, Gao YT, Ferlay J, Powell J: Cancer incidence in five continents, Voi VI (IARC Scientific Publication N° 120). Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1992.
- [5] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57:43-66.
- [6] Malkowicz SB, Van Poppel H, Mickisch G, et al. Muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Urology* 2007; 69(1 Suppl):3-16.
- [7] Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, et al. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics* 2003; 21:1315-1330.
- [8] Yossepowitch O, Herr HW, Donat SM. Use of urinary biomarkers for bladder cancer surveillance: patient perspectives. *J Urol* 2007; 177:1277-1282, discussion 1282.
- [9] Hall PA, Jung K, Hillan KJ, Russell SE. Expression profiling the human septin gene family. *J Pathol*. 2005 Jul;206(3):269-78
- [10] Hall PA, Russell SE. The pathobiology of the septin gene family. *J Pathol*. 2004 Nov;204(4):489-505. Review.
- [11] Tanaka M, Kijima H, Itoh J, Matsuda T & Tanaka T. (2002) Impaired expression of a human septin family gene Bradeion inhibits the growth and tumorigenesis of colorectal cancer in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 9: 483-48
-