

## Udział $\alpha$ Klotho w transformacji nowotworowej pęcherza moczowego

### STRESZCZENIE

Rak pęcherza moczowego jest najczęściej występującym nowotworem układu moczowego w Polsce. W roku 2015 nowotwór ten był czwartym, co do częstości występowania nowotworem u mężczyzn oraz czternastym u kobiet. Molekularne podstawy transformacji nowotworowej pęcherza moczowego nie są do końca poznane. We wszystkich stadiach zaawansowania nowotworów pęcherza moczowego, niezależnie od stopniach złośliwości histologicznej odnotowuje się jednak nieprawidłowości w sygnalizacji FGFR.

Gen  *$\alpha$ Klotho*, odkryty został w roku 1997 jako gen, którego inaktywacja prowadzi do pojawienia się cech przedwczesnego starzenia u myszy. Nazwa genu i białka  $\alpha$ Klotho wywodzi się od imienia greckiej bogini Klotho, która przędła nić ludzkiego życia. Białko  $\alpha$ Klotho występuje w dwóch formach – transbłonowej oraz sekrecyjnej, powstającej na skutek alternatywnego składania pre-mRNA w obrębie eksonu 3 genu  *$\alpha$ KL*, bądź też w wyniku cięcia transbłonowej formy białka przez enzymy proteolityczne. Transbłonowa forma białka  $\alpha$ Klotho funkcjonuje jako koreceptor dla czynnika wzrostu fibroblastów 23 przez co zaangażowana jest w utrzymywanie homeostazy fosforanowej organizmu oraz regulację metabolizmu witaminy D. Zarówno transbłonowa, jak i sekrecyjna postać białka zaangażowane są ponadto w utrzymywanie homeostazy jonów wapnia. Białko  $\alpha$ Klotho wykazuje także zdolność regulacji aktywności szlaków sygnalizacyjnych, w tym FGF/FGFR, sygnalizacji insuliny/IGF-1, szlaku Wnt i TGF- $\beta$ , których nadmierna aktywność obserwowana jest w przypadku wielu typów nowotworów. Liczne badania pokazały, że zdolność  $\alpha$ Klotho do inhibicji szlaków sygnalizacyjnych powiązana jest z pełnieniem przez  *$\alpha$ Klotho* funkcji genu supresorowego.

Przeprowadzone badania miały na celu ocenę wpływu zmian epigenetycznych na ekspresję genu  *$\alpha$ Klotho* w komórkach raka pęcherza moczowego poprzez analizę ekspresji badanego genu na poziomie mRNA oraz stopnia metylacji jego regionu promotorowego w prawidłowej i nowotworowo zmienionej tkance pęcherza moczowego oraz określenie wpływu inhibitorów metylotransferaz DNA i deacetylaz białek histonowych na ekspresję oraz stopień metylacji regionu promotorowego genu  *$\alpha$ KL* w komórkach raka pęcherza

moczowego. W pracy dokonano również oceny wpływu białka  $\alpha$ Klotho na aktywność szlaku FGF/FGFR w komórkach raka pęcherza moczowego oraz analizy wpływu trzech wybranych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów genu  $\alpha$ Klotho (rs1207568, rs564481, rs9527025) na ryzyko zachorowania na raka pęcherza moczowego.

Materiał do badań stanowiły 73 preparaty zmienionej nowotworowo tkanki pęcherza moczowego (w tym 7 preparatów PUNLUMP), 5 preparatów prawidłowej tkanki pęcherza moczowego, 96 preparatów krwi żyłnej pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym przejściowokomórkowym rakiem pęcherza moczowego, 114 preparatów krwi żyłnej pochodzących od osób zdrowych, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej oraz komórki raka pęcherza moczowego linii T24.

W celu analizy ekspresji genu  $\alpha$ Klotho z preparatów tkankowych pęcherza moczowego wyizolowano całkowity RNA przy użyciu odczynnika TRI Reagent w modyfikacji własnej. Na matrycy RNA dokonano syntezy cDNA. Analizę ekspresji genu  $\alpha$ KL przeprowadzono techniką Real Time PCR przy użyciu komercyjnie dostępnych sond TaqMan<sup>®</sup>. Jako gen referencyjny wybrano *HPRT1*. Oceny stopnia metylacji regionu promotorowego genu  $\alpha$ Klotho dokonywano techniką MS-PCR, z wykorzystaniem odpowiednich zestawów starterów rozróżniających zmetylowane i niezmetylowane sekwencje DNA. Wykazano, że w odniesieniu do prawidłowej tkanki pęcherza moczowego, ekspresja genu  $\alpha$ KL na poziomie mRNA jest istotnie statystycznie niższa w przypadku nowotworów pęcherza moczowego oraz ulega spadkowi wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania oraz złośliwości histologicznej nowotworu. Zmiany stopnia metylacji regionu promotorowego w badanych grupach nie wykazywały istotności statystycznej.

Do określenia wpływu inhibitorów metylotransferaz DNA i deacetylaz białek histonowych na ekspresję genu  $\alpha$ Klotho oraz stopień metylacji regionu promotorowego badanego genu, komórki raka pęcherza moczowego linii T24 traktowano inhibitorem metylotransferaz DNA – 5-aza-2'-deoksytydyną w obecności lub bez inhibitora deacetylaz białek histonowych – trichostatyny A. Do izolacji całkowitego RNA i DNA z badanych komórek wykorzystano metodę z odczynnikiem TRI Reagent. Analizę ekspresji genu  $\alpha$ KL przeprowadzono techniką Real Time PCR przy użyciu komercyjnie dostępnych sond TaqMan<sup>®</sup>,

a ocenę stopnia metylacji regionu promotorowego genu *αKlotho* prowadzono techniką MS-PCR, z użyciem odpowiednich zestawów starterów rozróżniających zmetylowane i niezmetylowane sekwencje DNA. W efekcie traktowania komórek linii T24 inhibitorem metylotransferaz DNA obserwowano przywrócenie ekspresji genu *αKlotho* na poziomie mRNA. W porównaniu do komórek kontrolnych, komórki traktowane 5-aza-2'-deoksycytydyną wykazywały blisko o połowę niższy stopień metylacji wysp CpG w regionie promotorowym genu *αKlotho*. W wyniku traktowania komórek inhibitorem deacetylaz białek histonowych nie obserwowano zmian w ekspresji genu *αKL*, z kolei zastosowanie obu inhibitorów prowadziło do istotnego statystycznie wzrostu ekspresji badanego genu na poziomie mRNA.

Oceny wpływu białka *αKlotho* na aktywność szlaku FGF/FGFR w komórkach linii T24 dokonywano poprzez analizę ekspresji genów docelowych regulowanych przez kinazy MAP (tj. *ETS-1*, *PAX6*, *c-FOS*, *c-MYC*, *STAT1*, *STAT3*) oraz fosforylację kinazy ERK1/2, w odpowiedzi na aktywację szlaku FGF/FGFR po traktowaniu komórek linii T24 białkiem *αKlotho* oraz FGF1 i/lub FGF2. Do izolacji całkowitego RNA z badanych komórek wykorzystano zestaw EXTRACTME TOTAL RNA firmy DNA Gdańsk. Analizę ekspresji wybranych genów docelowych przeprowadzono techniką Real Time PCR przy użyciu komercyjnie dostępnych sond TaqMan<sup>®</sup>. Do analizy fosforylacji kinazy ERK1/2 zastosowano metodę Western blot z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał pierwszorzędowych oraz przeciwciał drugorzędowych skompleksowanych z peroksydazą chrzanu. Analiza wykazała, że białko *αKlotho* może modulować aktywność szlaku kinaz MAP w komórkach linii T24 traktowanych czynnikami FGF1 i FGF2.

W celu analizy polimorfizmów pojedynczego nukleotydu genu *αKlotho* izolowano DNA z krwi pełnej za pomocą zestawu AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit. Występowanie trzech wybranych polimorfizmów określono przy użyciu techniki PCR z dwiema parami przeciwstawnych starterów (PCR-CTPP) oraz metody Real Time PCR z sondami fluorescencyjnymi TaqMan<sup>®</sup>. Wykazano, że genotypy GA i AA polimorfizmu rs1207568 wpływają na wzrost ryzyka zachorowania na raka pęcherza moczowego odpowiednio blisko 2 i ponad 6 razy. U osób będących heterozygotami lub homozygotami pod względem allelu A wykazano ponad 2-krotnie wyższe ryzyko zachorowania na raka pęcherza moczowego, z kolei w przypadku nosicieli allelu G w układzie homo- lub

heterozygotycznym odnotowano spadek ryzyka zachorowania na badany nowotwór. W przypadku polimorfizmu rs952705 wykazano, że genotyp GC powoduje ponad 2-krotny wzrost ryzyka zachorowania na raka pęcherza moczowego.

A. Ciesielska

## The effect of $\alpha$ Klotho on urinary bladder cancerogenesis

### SUMMARY

Bladder cancer is the most common cancer of the urinary tract in Poland. In 2015 it was the fourth most commonly diagnosed type of cancer in men and fourteenth in women. The molecular basis of bladder carcinogenesis is not fully understood. In all stages of bladder cancer, independently from histological malignancy rates, irregularities in FGFR signalling are found.

*$\alpha$ Klotho* gene was discovered in 1997 as a gene, which inactivation leads to premature aging syndrome in mice. The  $\alpha$ Klotho gene and protein names are derived from the name of Greek goddess who spins the thread of life. The  $\alpha$ Klotho protein exists in two forms: transmembrane and secreted form, which is generated through an alternative splicing of mRNA in the 3rd exon or by enzymatic cleavage of transmembrane form by proteases. The transmembrane form of  $\alpha$ Klotho protein functions as a coreceptor for fibroblast growth factor 23, and it is involved in maintenance of phosphate homeostasis and vitamin D metabolism regulation. Moreover, both transmembrane and secreted  $\alpha$ Klotho are involved in maintaining calcium homeostasis. The  $\alpha$ Klotho protein has also the ability to regulation of signalling pathways activity, including FGF/FGFR, insulin/IGF-1 signaling, Wnt and TGF- $\beta$  pathways, which increased activity is observed in many types of cancers. Numerous studies have shown that the ability of  $\alpha$ Klotho to inhibit signalling pathways is associated with suppressor function of  $\alpha$ Klotho gene.

The aim of the study was to assess the effect of epigenetic changes on  *$\alpha$ Klotho* gene expression in bladder cancer cells by analyzing the expression of the gene at the mRNA level and the methylation degree of its promoter region in normal and cancerous bladder tissue and determining the effect of DNA methyltransferase inhibitors and histone deacetylases for the expression and degree of methylation of the promoter region of the  *$\alpha$ KL* gene in bladder cancer cells. The impact of  $\alpha$ Klotho protein on FGF/FGFR pathway activity in bladder cancer cells and analysis of the influence of three selected polymorphisms of single nucleotides of the  $\alpha$ Klotho gene (rs1207568, rs564481, rs9527025) on the risk of bladder cancer was also performed.

The research material consisted of 73 preparations of neoplastic bladder tissue (including 7 PUNLUMP preparations), 5 preparations of normal bladder

tissue, 96 venous blood preparations from patients diagnosed with transient cell carcinoma of the bladder, 114 venous blood preparations from healthy persons, in whom no cancer was found and T24 bladder cancer cell line.

To analyze the expression of the *αKlotho* gene total RNA was isolated from the bladder tissue preparations using the TRI Reagent reagent. The cDNA synthesis was performed on the RNA template. Analysis of *αKL* gene expression was performed by Real Time PCR using commercially available TaqMan® probes. *HPRT1* was the reference gene. Evaluation of the methylation degree of the promoter region of the *αKlotho* gene was performed by the MS-PCR technique, using appropriate sets of primers distinguishing methylated and unmethylated DNA sequences. It was shown that the expression of the *αKL* gene at the mRNA level was statistically significantly lower in the case of bladder tumors in relation to normal bladder tissue and decreased along with the advancement of the severity and histological grade of the tumour. Changes in the methylation degree of the promoter region in the studied groups did not show statistical significance. Changes in the methylation degree of the promoter region in the studied groups did not show statistical significance. There were no statistically significant differences in the degree of methylation of the promoter region of the *αKL* gene in the studied groups.

To determine the effect of DNA methyltransferase inhibitors and histone deacetylases on *αKlotho* gene expression and the degree of methylation of the promoter region of the tested gene, T24 bladder cancer cells were treated with a DNA methyltransferase inhibitor - 5-aza-2'-deoxycytidine in the presence or absence of a histone deacetylase inhibitor - trichostatin A. The isolation of total RNA and DNA from the tested cells was performed using the TRI Reagent.

Analysis of *αKL* gene expression was performed by Real Time PCR using commercially available TaqMan® probes using *HPRT1* as a reference gene. Evaluation of the degree of methylation of the promoter region of the *αKlotho* gene was carried out using the MS-PCR technique, using the appropriate sets of primers distinguishing methylated and unmethylated DNA sequences. As a result of treatment of T24 cells with a DNA methyltransferase inhibitor, restoration of *αKlotho* gene expression at the mRNA level was observed. Cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine showed almost a half-lower degree of methylation of CpG islands in the promoter region of the *αKlotho* gene compared to control cells. No changes were observed in the expression of the *αKL* gene as a result of treatment

of cells with an inhibitor of histone deacetylases, whereas the use of both inhibitors led to a statistically significant increase in the expression of the tested gene at the mRNA level.

The evaluation of the impact of the  $\alpha$ Klotho protein on the FGF/FGFR pathway activity in T24 cells was performed by analyzing the expression of target genes regulated by MAP kinases (i.e. *ETS-1*, *PAX6*, *c-FOS*, *c-MYC*, *STAT1*, *STAT3*) and phosphorylation of ERK1/2 kinase in response to the activation of the FGF/FGFR pathway after treatment of T24 cells with the  $\alpha$ Klotho protein and FGF1 and/or FGF2. The EXTRACTME TOTAL RNA set from DNA Gdańsk was used for the isolation of total RNA from the examined cells. Analysis of the expression of selected target genes was performed by Real Time PCR using commercially available TaqMan<sup>®</sup> probes. Western blot using specific primary antibodies and secondary antibodies complexed with horseradish peroxidase was used to analyze ERK1/2 kinase phosphorylation. The analysis showed that the  $\alpha$ Klotho protein can modulate the MAP kinase pathway activity in T24 cells treated with FGF1 and FGF2 factors.

In order to the analysis of single nucleotide polymorphism of the  *$\alpha$ Klotho* gene the DNA was isolated from whole blood using AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit. For the analysis of single nucleotide polymorphisms of the  *$\alpha$ Klotho* gene, whole blood DNA was isolated using the AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit. The occurrence of three selected polymorphisms was determined using PCR with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) and Real Time PCR with TaqMan<sup>®</sup> fluorescent probes. It was found that the GA and AA genotypes of the rs1207568 polymorphism increases the risk of bladder cancer around 2 times and more than 6 times, respectively. Individuals who were heterozygous and homozygous for the A variant had more than 2-fold higher risk of bladder cancer, while heterozygous or homozygous subjects for the G allele had decreased bladder cancer risk. In case of the rs952705 polymorphism, the presence of GC genotype had 2-fold higher risk of bladder cancer.

A. Cicielski