

94 Exprese izoforem proteinu p73 u meduloblastomu a její prognostický význam.

Zitterbart K.¹, Zavřelová I.², Kadlecová J.³, Pavlík T.⁴, Kratochvílová A.², Spěšná R.², Štěřba J.¹

1) Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

2) Ústav patologie LF MU a FN Brno

3) Oddělení lékařské genetiky FN Brno

4) Institut biostatistiky a analýz, LF MU a PřF MU, Brno

Úvod

TP73, člen genové rodiny nádorového supresoru p53, se vyznačuje nezvyklou komplexitou genového lokusu. Přepisem ze dvou promotorů a alternativním sestřihem primárního transkriptu vznikají rozdílné N-terminální izoformy: TAp73 (*full-length*) je transaktivně kompetentní variantou proteinu p73, zatímco zkrácené (*truncated*) izoformy Np73, p73ex2, p73ex2/3, souhrnně označované jako TAp73, postrádají transaktivní (TA) doménu a funkčně vykazují k p53 a TAp73 negativní dominanci. Rovněž na C-terminálním konci proteinu p73 se setkáváme díky alternativnímu sestřihu primárního transkriptu s rozdílnými izoformami, z nichž je řetězcem v plné délce.

Byl prokázán prognostický význam detekce p73 v případech některých malignit: zvýšená exprese izoforem p73 má negativní dopad např. u pacientů s adultními gliálními nádory CNS. Na dysregulaci signálních drah nádorových buněk se podílejí především Δ TAp73 izoformy [1-6].

Za fyziologických podmínek se p73 podílí rovněž na regulaci proliferace a diferenciace ve vyvíjející se neuronální tkáni (*developmental signaling*) [7,8]. Geny, které se účastní morfogeneze, jsou aberantně exprimovány u řady neurogenních nádorů [9,10]. Na základě těchto údajů jsme stanovili pracovní hypotézu možné účasti p73 v tumorigenezi meduloblastomu.

Cíl

Studie definuje podíl N-terminálních izoforem proteinu p73 v dysregulaci signálních drah u meduloblastomu, nejčastějšího maligního nádoru CNS dětí. Bylo provedeno imunohistochemické značení p73 α a Δ Np73 v nádorové i kontrolní tkáni a následná analýza jejich možného prognostického významu. Metodou real-time PCR byly detekovány transkripty TAp73 a Δ Np73 a srovnána jejich exprese ve vzorcích meduloblastomu s referenční RNA normálního cerebela.

Materiál a metody

Tkáň meduloblastomu, normální tkáň mozečku: Parafinové bloky pacientů s diagnózou primárního meduloblastomu léčených na Klinice dětské onkologie LF MU a FN Brno v letech 1998-2006 (n=29) a bloky s normální tkání mozečku byly získány z archivů patologicko-anatomických ústavů. Nativní vzorky nádorové tkáně (n=13) byly zamrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -80°C u většiny pacientů léčených v letech 2003-2006. Komerčně dostupná RNA z normálního lidského mozečku (Human Brain Cerebellum Total RNA, BD Biosciences) byla užita jako referenční vzorek nenádorové tkáně (jedná se o směsný vzorek RNA izolované z mozečku 24 mužů/žen zmírajících náhlou smrtí).

Imunohistochemické značení p73 α / β a Δ Np73: Z formalínem fixované, v parafinových blocích zalité tkáně byly získány 4 μ m řezy. Po standardních procedurách byly vzorky inkubovány při 4°C přes noc s primárními protilátkami: (i) myši monoklonální

protilátka anti-73 α / β (klon ER-15, Lab Vision, Neomarkers; ředění 1:2000), epitop lokalizován mezi AK 380-637 lidského proteinu p73, specificky značena pouze α -izoforma [11]. (ii) myší monoklonální protilátka anti-delta-Np73 (klon 38C674.2, Imgenex; ředění 1:4000), epitop lokalizován mezi AK 2-13 lidského proteinu Δ Np73. Imunodetekce byla provedena pomocí avidin-biotinového komplexu (Vectastain *Elite ABC Kit*, Vector Laboratories) a vizualizována užitím diaminobenzidinu jako substrátu. Řezy bylyobarveny Gillovyým hematoxylinem.

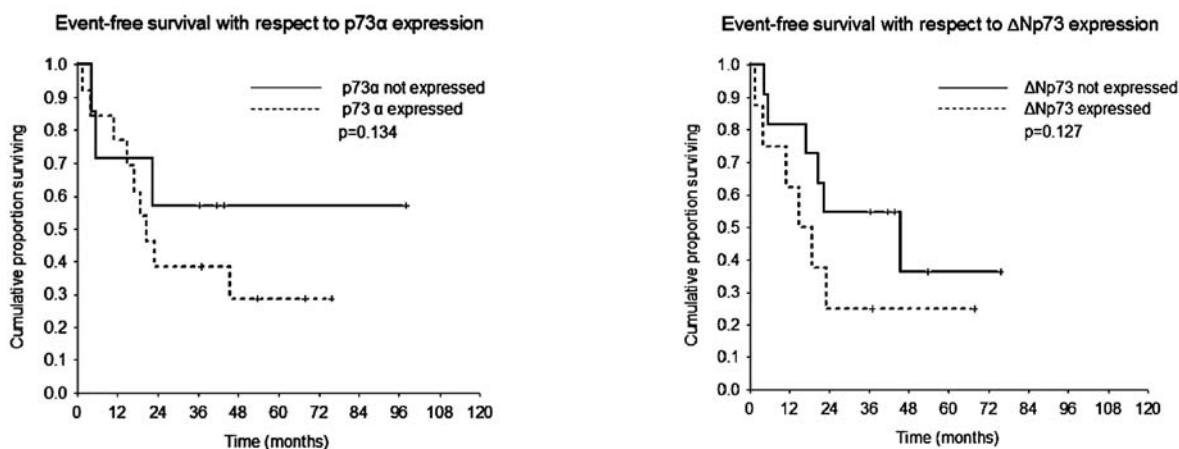
Real-time PCR detekce TAp73 a Δ Np73: Celková RNA byla izolována z nativní nádorové tkáně užitím TRIzol (Invitrogen), koncentrace byla určena spektrofotometricky. 1 μ g RNA byl reverzně přepsán užitím oligo(dT) primeru a reverzní transkriptázy Transcriptor (Roche Diagnostics). Vyšetření metodou real-time PCR v modifikaci TaqMan bylo provedeno na systému LightCycler (Roche Diagnostics). Jednotlivé reakce probíhaly v LC kapiláře v objemu 10 μ l reakční směsi, skládající se z 1 μ l cDNA, 0,5 μ M každého páru primerů, 0,2 M TM sondy (TIB MOLBIOL), 0,25 μ l uracil-DNA glykosylázy a z reakčního kitu FastStart DNA Master HybriProbe (Roche Diagnostics) obsahujícího Taq DNA polymerázu, dNTP a Mg²⁺. Sekvence primerů (KRD, TIB MOLBIOL) byly designovány dle [6]. Expresce cílových transkriptů byla normalizována k expresi β -aktinu (housekeepingový gen), k výpočtu koncentrací byla užitá interpolace ze standardních kalibračních křivek.

Statistické hodnocení: Ke stanovení prognostického významu IHC pozitivita p73 α a Δ Np73 byly užitý standardní nástroje pro analýzu přežití (Kaplan-Maierovy křivky, Cox F-test). Wilcoxon rank sum test byl užit ke srovnání kvantifikované exprese transkriptů TAp73 a Δ Np73 v referenční RNA zdravého cerebella a v nádorové tkáni meduloblastomu.

Výsledky

Imunohistochemická detekce p73 α a Δ Np73

Z celkového počtu 29 histopatologicky vyšetřených meduloblastomů bylo dle morfologických kritérií WHO klasifikováno 23 (79%) nádorů jako klasický podtyp, 5 meduloblastomů bylo desmoplastických (17%), 1 velkobuněčný. Následně byla provedena imunohistochemická detekce p73 α a Δ Np73 v souboru nádorové tkáně i v archivní normální tkáni mozečku, jako pozitivní byl hodnocen výsledek, při němž došlo k požadované reakci u více než 1% buněk. Plexus choroideus byl užit jako pozitivní kontrola značení p73 α i Δ Np73 [5].



Obr. 1

V normální tkáni mozečku, ze které je meduloblastom histogeneticky odvozen, nebyla v případě vzorku adultního cerebella zaznamenána žádná exprese vyšetřovaných izoform p73. Ve snaze postihnout eventuelní vývojovou odlišnost jsme vyšetřili rovněž archivní tkáně mozečku novorozence. Překvapivě, Purkyněho buňky vykazovaly v tomto případě silnou cytoplasmatickou pozitivitu p73 α i Δ Np73, zatímco buňky zevní a vnitřní granulózní vrstvy a molekulární vrstvy se specificky neznačily. Toto zjištění, v souladu s dříve dokumentovanou účastí p73 v morfogenezi neuronální tkáně, nebylo doposud na základě dostupných literárních údajů zaznamenáno a svědčí o zapojení p73-signální dráhy rovněž v ontogenetickém vývoji lidského mozečku.

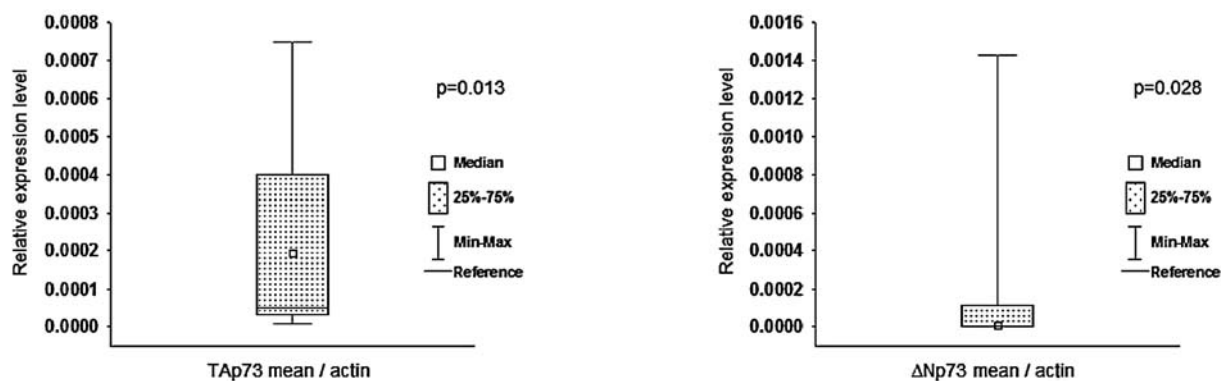
Imunohistochemická detekce p73 α prokázala pozitivitu u 15 z 29 (52%) vyšetřených meduloblastomů, pozitivita dosahovala v jednotlivých případech až 50% buněk nádorové populace. U 7 (24%) případů bylo p73 α -pozitivních 1-5% nádorových buněk, u 4 (14%) vzorků bylo imunoreaktivních 6-15% nádorových buněk a u dalších 4 (14%) vzorků byla pozitivita p73 α u více než 16% (rozsah 20-60%) buněk nádoru. Na subcelulární úrovni převažovala v imunoreaktivních vzorcích souběžná jaderná i cytoplasmatická distribuce signálu.

IHC značení Δ Np73 odhalilo pozitivitu u 8 z 28 (29%) vyšetřených vzorků, převažovala cytoplasmatická lokalizace Δ Np73 proteinu. Společná exprese full-length C-terminální α -izoformy a N-terminální truncated Δ N-formy byla prokázána v 7 z 15 α -pozitivních případů. Vždy se jednalo o Δ Np73 pozitivitu v menším či stejném procentu buněk oproti α -řetězci. Toto pozorování nepřímo svědčí pro skutečnost, že jsou exprimovány i další N-terminální izoformy p73, což je zcela v souladu s výsledkem real-time PCR analýzy prokazující transkript TAp73 u většiny touto metodou vyšetřených vzorků meduloblastomu.

Dále jsme provedli pilotní analýzu možného prognostického významu IHC pozitivitu p73 α a Δ Np73. Z hodnocení byli vyloučeni ti pacienti, u nichž nebyl dodržen optimální léčebný plán (například odmítnutí adjuvantní radioterapie zákonným zástupcem dítěte apod.). Jak je patrné z Obr. 1, je dokumentován trend k horší prognóze pacientů s p73 α ($p=0,134$) a Δ Np73 ($p=0,127$) imunoreaktivními meduloblastomy. Statistické významnosti nebylo dosaženo pro limitovaný počet vzorků, který vyplývá z reálné incidence tohoto nádoru v populaci. V případě adultních gliomů CNS byl prognostický význam Δ TA izoforem v literatuře dokumentován [12]. Prospektivní vyšetřování dalších případů nám umožní definitivní zodpovězení této otázky rovněž u meduloblastomu.

Real-time PCR detekce transkriptů TAp73, Δ Np73

TAp73 exprese byla detekována ve všech vyšetřených vzorcích meduloblastomu ($n=13$). Medián exprese cílového transkriptu v referenční RNA (Human Brain Cerebellum Total RNA) činil 0,0065% exprese β -aktinu, u meduloblastomu 0,0192% exprese β -aktinu. Bylo pozorováno signifikantní zvýšení exprese TAp73 v nádorové tkáni meduloblastomu ($p=0,013$). (Obr. 2.) Δ Np73 exprese byla detekována u 6 z 13 (46%) vyšetřených vzorků meduloblastomu, exprese v referenční RNA z mozečku byla nulová, i zde byl prokázán signifikantní rozdíl v expresi cílového transkriptu mezi nádorovou a normální tkání ($p=0,028$) (Obr.2).



Obr. 2

Závěr

Studie prokázala expresi N-terminálních izoforem proteinu p73 u meduloblastomu. Metodou real-time PCR byl zaznamenán signifikantní rozdíl v expresi transkriptů TAp73 a Δ Np73 mezi nádorovou tkání meduloblastomu a normální tkání mozečku, toto zjištění bylo potvrzeno rovněž imunohistochemicky. Dle autorů dostupné literatury jde o první průkaz zvýšené exprese transaktivně deficientní Δ Np73 izofomy u tohoto onemocnění. Pilotní analýza prognostického významu odhalila trend k horší prognóze dětí s p73 α Δ Np73 imunoreaktivními nádory.

Na základě těchto pozorování vyvozujeme, že exprese izoforem p73 se podílí na dysregulaci signálních drah meduloblastomu a definujeme TP73 jako vhodný kandidátní gen pro další studium jeho prognostického významu.

Práce byla podpořena granty FRVŠ 1303/05 a RASO ČOS 2005.

Literatura

1. Kaghad M, Bonnet H, Yang A et al. *Cell* 1997;90:809-819.
2. Moll UM, Slade N. *Mol Cancer Res* 2004;2:371-386.
3. Ozaki T, Nakagawara A. *Cancer Sci* 2005;96:729-737.
4. Zaika AI, Slade N, Erster SH et al. *J Exp Med* 2002;196:765-780.
5. Domínguez G, García JM, Pena C et al. *J Clin Oncol* 2006; 24:805-15.
6. Stiewe T, Tuve S, Peter M et al. *Clin Cancer Res* 2004;10:626-633.
7. Pozniak CD, Radinovic S, Yang A et al. *Science* 2000;289:304-306.
8. Jacobs BW, Kaplan RD, Miller FD. *J Neurochem* 2006; 97:1571-84.
9. Loiseau H, Arsaut J, Demotes-Mainard J. *Neurosci Lett* 1999;263:173-176.
10. Fogarty MP, J. *J Neurobiol* 2005;64:458-475.
11. Sayan AE, Paradisi A, Vojtesek B et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330:186-193.
12. Wager M, Guilhot J, Blanc JL et al. *Br J Cancer* 2006;95:1062-9.