

PILOTNÍ STUDIE EXPRESE IZOFOREM PROTEINU P73 U MEDULOBLASTOMU: MOŽNÝ PODÍL P53-HOMOLOGNÍHO PROTEINU S POTENCIÁLNÍM PROGNOSTICKÝM VÝZNAMEM V TUMORIGENEZI EMBRYONÁLNÍCH NÁDORŮ CNS

P73 ISOFORMS EXPRESSION IN MEDULLOBLASTOMA: A POSSIBLE INVOLVEMENT OF P53 HOMOLOGUE PROTEIN WITH POTENTIAL PROGNOSTIC IMPACT IN DEVELOPMENT OF EMBRYONAL BRAIN TUMORS

ZITTERBART K.¹, KADLECOVÁ J.², ZAVŘELOVÁ I.³, KRATOCHVÍLOVÁ A.², SPĚŠNÁ R.², KŘEN L.³, PAVELKA Z.¹, ŠTĚRBA J.¹

¹ KLINIKA DĚTSKÉ ONKOLOGIE LF MU A FN BRNO

² ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY FN BRNO

³ ÚSTAV PATOLOGIE LF MU A FN BRNO

Souhrn

Východiska: TP73, člen genové rodiny p53, se vyznačuje nezvyklou komplexitou genového lokusu. Přepisem ze dvou promotorů a alternativním sestřihem primárního transkriptu vznikají dvě třídy NH₂-terminálních izoform proteinu p73: transaktivačně- kompetentní TAp73 a transaktivačně-deficientní ΔTAp73 (ΔNp73, p73Δex2, p73Δex2/3). TP73 je zapojen v regulaci diferenciaci a apoptózy v neuronální, mesenchymální a epiteliální tkáni. Zvýšená exprese TP73 je u řady nádorů považována za onkogenní, overexprese ΔTAp73 je negativním prognostickým znakem u některých karcinomů a neuroblastomu. **Typ studie a soubor:** Pilotní molekulárně genetická a imunohistochemická studie exprese izoform proteinu p73 v souboru nádorové tkáně medulloblastomu. **Metody a výsledky:** Metodou real-time PCR byly detekovány transkripty TAp73, ΔNp73, p73Δex2 u nádorů (n=11) a v referenční RNA z mozečku. Byla prokázána zvýšená exprese ΔNp73 a trend ke zvýšené expresi TAp73 u medulloblastomu. Nebyla prokázána korelace izoform TP73 s expresí genů TRKC, MYCC v jednotlivých vzorcích. Imunohistochemické značení ΔNp73 a p73α (n=23) potvrdilo dosažené výsledky na úrovni proteinu. **Závěr:** Exprese N-terminálních izoform p73 se může podílet na molekulární podstatě tumorigeneze u medulloblastomu. Definujeme TP73 jako vhodný kandidátní gen pro další studium jeho prognostického a terapeutického významu u tohoto onemocnění.

Klíčová slova: TP73, medulloblastom, izoformy p73, real-time PCR, imunohistochemie, prognóza

Summary

Backgrounds: TP73 gives rise to two diametrically opposed protein classes: transactivation-competent p73 proteins (TAp73) and transactivation-deficient NH₂-terminally truncated ΔTAp73 proteins. ΔTAp73 are generated by aberrant splicing (p73Δex2, p73Δex2/3) and alternative promoter usage of intronic promoter P2 (ΔNp73). TP73 is involved in neural, mesenchymal and epithelial morphogenesis. Oncogenic activity of TP73 has been well documented and frequent tumor specific up-regulation of ΔTAp73 forms was observed in some types of cancer. ΔNp73 overexpression was found to be an independent prognostic marker for aggressive clinical behavior in patients with carcinomas and neuroblastoma. **Design and subject:** Real-time PCR and immunohistochemical detection of TP73 isoforms in medulloblastoma samples. **Methods and results:** TAp73, ΔNp73, p73Δex2 transcripts have been analyzed in medulloblastoma specimens and normal cerebellar tissue. ΔNp73 overexpression as well as a trend to increased TAp73 expression were found. No correlations between TP73 isoforms and TRKC, MYCC expression were documented. Immunohistochemical analysis of ΔNp73 and p73α confirmed molecular genetic data. **Conclusions:** Our findings suggest the involvement of TP73 in medulloblastoma tumorigenesis, defining TP73 as potential prognostic and therapeutic target for medulloblastoma.

Key words: TP73, medulloblastoma, p73 isoforms, real-time PCR, immunohistochemistry, prognosis

Úvod

Ztráta funkce proteinu p53 je klíčovou událostí v procesu karcinogeneze u řady nádorů [1,2]. Studie hledající homology tohoto klasického nádorového supresoru vedly k objevu dalších členů p53-genové rodiny, TP73 [3] a TP63 [4]. TP73 je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 1 (1p36.2-3), v oblasti podléhající u řady nádorů ztrátě heterozygosity. Strukturální homologie proteinu p73 a p53 vede k překrývajícím se protein-proteinovým a DNA-proteinovým interakcím [5]. Přesto však není p73 klasickým nádorovým supresorem Knudsonova typu, neboť jeho inaktivující mutace jsou v lidských nádorech nalézány extrémně řídké [6] a p73^{-/-} deficientní myš nemá zvýšený sklon ke spontánnímu výskytu nádorů [7]. Spektrum biologických funkcí proteinu p73 je široké, vykazuje funkce obdobné proteinu p53, ale rovněž funkce antagonistické, či je zapojen do signálních drah, na nichž se p53 nepodílí [8,9]. Za touto skutečností stojí nezvyklý počet COOH- a NH₂-terminálních izoform proteinu p73, jejichž existence vychází z komplexity genového lokusu TP73. Kromě promotoru P1 je v oblasti intronu 3 lokalizován další, interní promotor P2. Přepis z P1 dává vznik nezkrácené (*full-length*) transkripčně kompetentní TA-formě, přepis z P2 vede ke vzniku NH₂-zkráceného (*truncated*) proteinu ΔNp73. U ΔNp73 je 61 N-koncových aminokyselin proteinu TAp73 nahrazeno 13 aminokyselinami kódovanými z alternativního exonu 3B. Dále byla dokumentována existence aberantních transkriptů p73Δex2, p73Δex2/3, ΔN'p73, které, byť přepisovány z promotoru P1 rovněž postrádají TA doménu. p73Δex2 a p73Δ2/3 vznikají alternativním sestřihem exonů 2 resp. 2/3, kódují protein počínající aminokyselinou 49 resp. 72. Transkript ΔN'p73 obsahuje 198 párů bází z alternativního exonu 3B (jeho 3'-koncovou část) a po translaci kóduje protein identický s ΔNp73. Souhrnně jsou tyto TA-deficientní, vůči TAp73 a *w*t p53 dominantně negativní izoformy p73 označovány jako ΔTAp73. Kromě transkriptu kódujícího p73 v plné délce 14 exonů (α-izoforma) nalézáme v normální či nádorové tkáni dalších nejméně osm C-terminálních izoform β, γ, δ, ζ, η, θ, vznikajících mnohočetným sestřihem exonů 10 až 14. Experimentální data naznačují, že především rozdílně modulují transkripční roli proteinu p73. [5,8-11].

TAp73 sdílí s proteinem p53 částečnou funkční homologii. Ektopicky navozená zvýšená exprese TAp73 vede u buněk *in vitro* k vazbě p73α a p73β na promotory některých p53-cílových genů s antiproliferativní a proapoptotickou funkcí, mezi jinými CDKN1A/p21, GADD45, BTG2, 14-3-3σ, IGFBP3, BAX a PUMA [8,12]. Zvýšená exprese TAp73 je indukována (i) buněčnými a virovými onkogeny E2F1, MYCC, E1A (ii) poškozením DNA γ-ionizujícím zářením či alkylací (iii) při hyperaktivaci T-receptorů na periferních T-lymfocytech [13-15]. Dle nově publikovaných dat je pravděpodobné, že po aktivaci TP73 je výsledná transkripční odpověď buňky dána vzájemnými interakcemi TA vs. ΔTA izoform, zastoupením jednotlivých COOH-terminálních izoform a rovněž transkripční aktivitou ostatních členů rodiny p53 spolu s dalším buněčným kontextem. To lze demonstrovat na příkladu práce *Goldschneidera et al.* [12], který prokázal, že u buněk neuroblastomové linie SH-SY5Y vede zvýšená exprese ΔNp73α k akumulaci nemutované formy p53, dochází k inhibici WAF1/p21 genové exprese (díky dominantně negativnímu efektu ΔNp73α), ovšem překvapivě k indukci BTG2/SLF1/PC3, dalšího z p53-cílových genů. Tato transaktivace je navíc závislá jak na statusu genu p53 (nedochází k ní u p53^{-/-} neuroblastomových buněk), tak na dalším buněčném kontextu (je nalézána u p53^{+/+} neuroblastomových buněk, nikoliv však u p53^{+/+} buněk karcinomu prsu).

Významná je role p73 při diferenciaci v neuronální, mesenchymální a epitelální tkáni [8,16-19]. Protein p73 se

podílí na nádorovém fenotypu buňky u řady malignit, nejčastěji zmiňovanými nádory s účastí p73 v tumorigenezi jsou karcinom plic, prsu, spinocelulární karcinom hlavy a krku, karcinom jícnu, žaludku a kolorekta, hepatocelulární karcinom a chalangiokarcinom, ovariální karcinom, karcinom močového měchýře, neuroblastom, ependymom, meningiom, AML a blastická krize CML [8,9,20-29]. Většina těchto studií detekovala expresi p73 metodou RT-PCR, novější studie potvrzují expresi na úrovni proteinu imunoblottingem či imunohistochemicky [18,27-29]. Vzniká evidence o tom, že především ΔTA izoformy se podílejí na dysregulaci signálních drah nádorových buněk. Zvýšená exprese ΔNp73 byla prokázána v případě neuroblastomu, hepatocelulárního a ovariálního karcinomu a rovněž u karcinomu prsu, plic a kolorekta; ve všech těchto případech měla prognosticky negativní význam [21-23,27,28]. U řady nádorů je nalézáno konkomitantní zvýšení exprese TAp73 i ΔTAp73 izoform [28].

Cílem práce bylo provést pilotní studii exprese N-terminálních izoform proteinu p73 v nádorové tkáni meduloblastomu. Pracovní hypotéza, že se izoformy p73 mohou účastnit na dysregulaci signálních drah tohoto nejčastěji se vyskytujícího embryonálního nádoru centrální nervové soustavy dětí, vycházela z následujících zjištění: (i) p73 se podílí na morfogenezi nervové soustavy, aberantní exprese morfogenů v tumorigenezi je dobře dokumentována [16,30-33] (ii) p73 reguluje apoptózu v neuronální tkáni [16,17,30] (iii) ΔNp73 overexprese je nepříznivým prognostickým znakem u neuroblastomu, maligního extrakraniálního neurogenního nádoru dětského věku [23].

Byla zavedena kvantifikace transkriptů TAp73, ΔNp73 a p73Δex2 metodou real-time PCR a imunohistochemická detekce ΔNp73 a p73α a vyšetřeny dostupné vzorky meduloblastomu pacientů Kliniky dětské onkologie LF MU a FN Brno. V případě real-time PCR byla provedena analýza korelace izoform TP73 s expresí genů MYCC a TRKC, jejichž detekce má u pacienta s meduloblastomem potenciální prognostický význam [34-36].

Materiál a metody

Tkáň meduloblastomu: Dostupná nádorová tkáň pacientů s diagnózou primárního meduloblastomu Kliniky dětské onkologie LF MU a FN Brno (KDO). Nativní vzorky (n=11) pocházely z banky nádorové tkáně KDO při Oddělení lékařské genetiky FN Brno, byly získány, archivovány a vyšetřeny za dodržení všech zákonných norem po obdržení informovaného souhlasu. Parafinové bloky (n=23) byly získány z archívů patologicko-anatomických ústavů. Důvodem absence některých vzorků byla především velikost biopsie dostačující jen rutinní diagnostice a operace mimo dětské onkocentrum.

Human Brain, Cerebellum Total RNA (BD Biosciences): Referenční RNA z lidského mozečku 24 mužů/žen zmírajících náhlou smrtí byla užitá jako idealizovaná normální tkáň ke srovnání exprese TP73 v tkáni nádoru a v tkáni, ze které meduloblastom histogeneticky vzniká. V případě mozkových nádorů není při neurochirurgické operaci možno získat normální, k nádoru přiléhající tkáň.

Real-Time PCR: Celková RNA byla izolována z nativní nádorové tkáně užitím TRIzol (Invitrogen), koncentrace byla určena spektrofotometricky. 1 μg RNA byl reverzně přepsán užitím oligo(dT) primeru a reverzní transkriptázy Transcriptor (Roche Diagnostics). Vyšetření metodou real-time PCR bylo provedeno na systému LightCycler (Roche Diagnostics), vlastní PCR kvantifikace v modifikaci TaqMan (*homogenous 5' nuclease assay*). Každá reakce byla provedena v LC kapiláře v objemu 10 μl reakční směsi, skládající se z 1 μl alikvoty vyšetřované cDNA, 1 μl hot-start reakčního kitu LC FastStart DNA

Master Hybridization Probes obsahujícího Taq DNA polymerázu, dNTP, Mg²⁺ a pufr (Roche Diagnostics), 1 µl (0,5 µM) každého páru primerů (KRD, TIB MOLBIOL), 1 µl (0,2 mM) TM sondy (TIB MOLBIOL), 0,25 µl Uracil-DNA glykosylázy (Roche Diagnostics) a optimalizovaného množství Mg²⁺. Sekvence užitých primerů a TM sond uvádí Tab. 1. (design

Tabulka č. 1.:
(a)

mRNA	Sense-primer	Antisense-primer
TAp73	5'-CCTCTGGAGCTCTCTGGAAC-3'	5'-GCTCAGCAGATTGAAGTGGGCCATG-3'
p73Δex2	5'-GGTCGCGACGGCTGCAGGGA-3'	5'-CAGGCGCCGGCGACATGG-3'
ΔNp73	5'-CAACGGCCCGCATGTTCCC-3'	5'-TGGTCCCATGGTGTGCTCAGC-3'
Beta-aktin	5'-TGAGCGCGCTACAGCTT-3'	5'-TCCTTAATGTACGCACGATT-3'

(b)

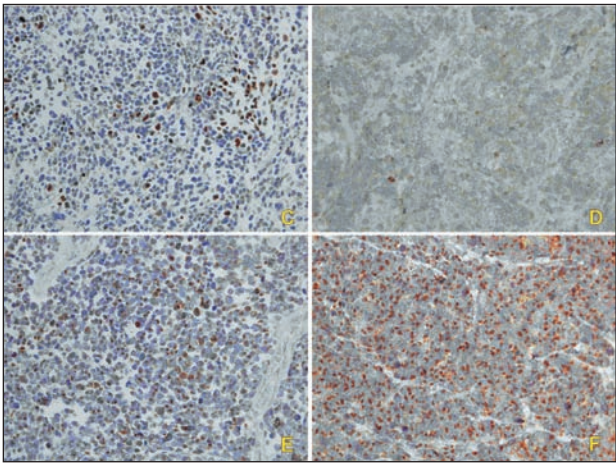
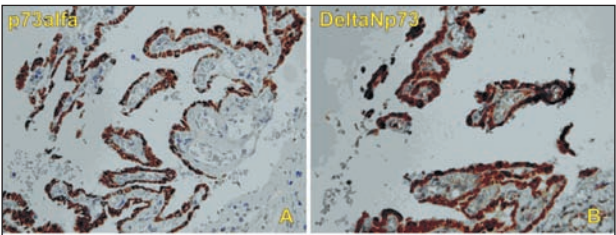
mRNA	Sekvence TM sondy
TAp73	5'-CCCTCCAGGTGGAAGACGTCCATGC-3'
p73Δex2	5'-CCCTCCAGGTGGAAGACGTCCATGC-3'
ΔNp73	5'-CCGTGCGGGGTCAACGACGT-3'
Beta-aktin	5'-ACCACCGCGCCGAGCGGT-3'

Sekvence použitých primerů (a), sekvence užitých TaqMan sond (b)

primerů dle [20], v případě TAp73 byla modifikována sekvence R primeru) V pilotních experimentech byly produkty amplifikace ověřeny gelovou elektroforézou a sekvenací, v nutných případech byly reakční podmínky optimalizovány pomocí temperature gradient PCR. Expres cílového transkriptu byla paralelně stanovována ve 2 kapilárách, vyšetření každého vzorku bylo nezávisle opakováno v jedné kapiláře. Byly vyšetřovány odpovídající negativní kontroly (cDNA lymfocytů zdravých dárců, genomová DNA, H₂O), plasmid pcDNA3 s amplikonem TAp73α sloužil jako pozitivní kontrola při detekci TAp73 (dar Dr. P. Müllera, Ph.D., Masarykův onkologický ústav, Brno). Byla užit relativní kvantifikace cílových transkriptů, jejich exprese byla normalizována k expresi beta-aktinu jako housekeepingovému genu, k výpočtu koncentrací transkriptů byla užitá interpolace ze standardní kalibrační křivky [37]. Normalizované výsledky exprese neurotrofinového receptoru TRKC a protoonkogenu MYCC v analyzovaném materiálu byly získány v rámci dřívějších rutinních diagnostických vyšetření.

Imunohistochemie: Z formalínem fixované, v parafinových blocích zalité tkáně byly získány 4 µm řezy. Po standardních procedurách byly vzorky inkubovány při 4 °C přes noc s následujícími primárními protilátkami: (i) myší monoklonální protilátka p73α/β (klon ER-15, Lab Vision, Neomarkers; ředění 1:2000), epitop lokalizován mezi AK 380-637 lidského proteinu p73, tato protilátka specificky značí pouze α-izoformu [38] (ii) myší monoklonální protilátka delta-Np73 (klon 38C674.2, Imgenex; ředění 1:4000), epitop lokalizován mezi AK 2-13 lidského proteinu ΔNp73 [18]. Imunodetekce byla provedena pomocí avidin-biotinového komplexu (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) a vizualizována užitím diaminobenzidinu jako substrátu. Řezy bylyobarveny Gillovým hematoxylinem.

Obrázek 2



Imunohistochemická detekce p73α (A, C, E) a ΔNp73 (B, D, F) v nádorové tkáni meduloblastomu. Plexus choroideus byl užit jako pozitivní kontrola pro p73α (A) a ΔNp73 (B) [28]. Střední p73α pozitivita a velmi slabá (<1 %) ΔNp73 pozitivita byla detekována v tomto meduloblastomu s extrémní nodulární predominancí (C,D). Silná jadená i cytoplazmatická exprese p73α a cytoplazmatická exprese ΔNp73 byla detekována v případě tohoto klasického meduloblastomu (E, F).

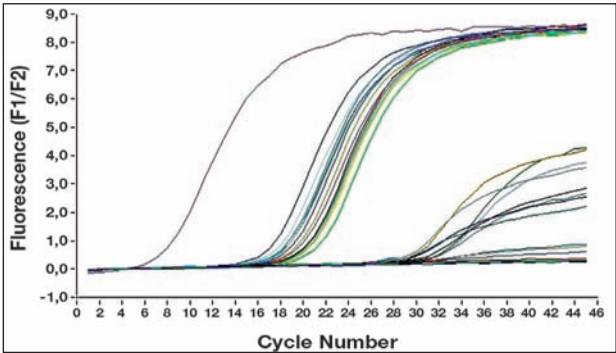
Statistická analýza: Normalizovaná exprese TAp73, ΔNp73, p73Δex2 zjištěná metodou real-time PCR ve vzorcích meduloblastomu (MBL) byla deskriptivně vyhodnocena (median, 25. a 75. kvantil, minimum, maximum). Human Brain, Cerebellum Total RNA byla užit jako idealizovaná normální tkáň mozečku (N), medián exprese v tomto referenčním vzorku byl užit k porovnání s meduloblastomy (MBL:N). Vzhledem k tomu, že relativně malý analyzovaný počet vzorků neumožnil užit robustní statistickou analýzu, byla zvolena kontingenční tabulka porovnávající v souboru tkáně meduloblastomu počet hodnot ležících nad a pod mediánem exprese referenční RNA (Fisher's exact test). Spearmanův korelační koeficient byl užit k porovnání exprese cílových transkriptů s expresí TRKC a MYCC (stanoveno rutinně v rámci diagnostických vyšetření).

Výsledek

Expres izoforem TAp73, ΔNp73, p73Δex2 u meduloblastomu detekovaná metodou real-time PCR

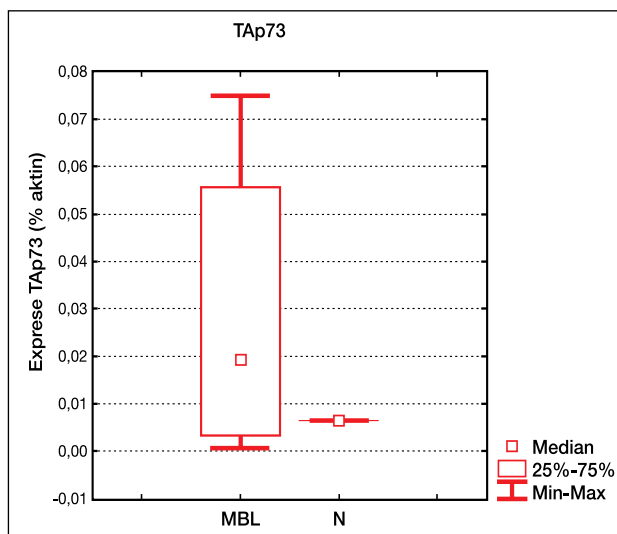
TAp73 exprese byla detekována ve všech vyšetřených vzorcích meduloblastomu a rovněž v RNA z lidského mozečku. Medián exprese v referenční RNA (Human Brain, Cerebellum Total RNA), činil 0,0065 % exprese beta-aktinu, u meduloblastomu 0,0192 % exprese beta-aktinu (rozsah 0,0008 % - 0,0749 %). Medián up-regulace TAp73 jednotlivých vzorků (MBL:N) činil 2,95 (rozsah 0,13 - 11,52). Byl pozorován trend k nádorově specifické overexpresi TAp73, vzhledem k limitovanému počtu vyšetřených vzorků nádoru však nebylo dosaženo statistické významnosti (p=0,194). (Graf 1a., Obr. 1)

Obrázek 1



Real-time PCR analýza exprese TAp73 a housekeepingového genu (beta-aktin), je znázorněn reprezentativní amplification plot.

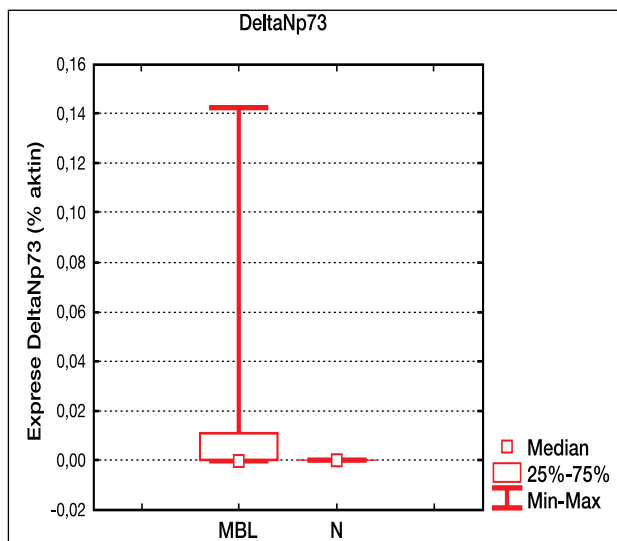
Graf 1a



Normalizovaná exprese TAp73 (a), Δ Np73 (b) a p73 Δ ex2 (c). Box-ploxy znázorňují medián, 25. a 75. percentil a rozsah normalizované exprese cílových transkriptů v nádorové tkáni meduloblastomu (MBL, $n=11$), pro srovnání je vyneseno medián normalizované exprese v referenční RNA mozečku od 24 zdravých dárců (N).

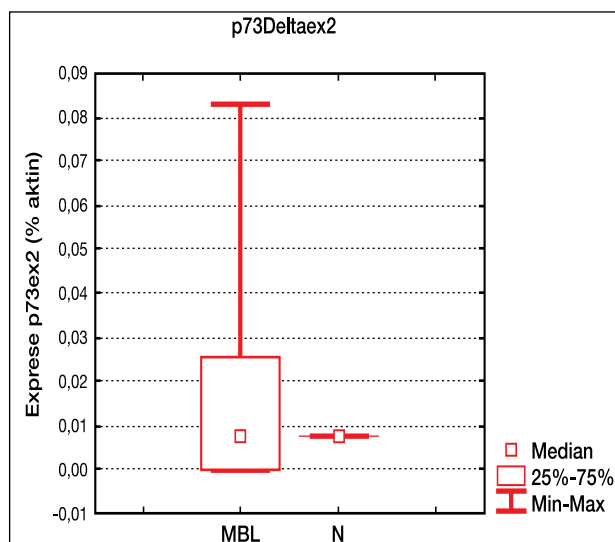
Δ Np73 exprese byla detekována u 5 z celkem 11 vyšetřených vzorků meduloblastomu. Medián exprese v referenční RNA z mozečku byl nulový. Rozsah hodnot exprese v nádorové tkáni činil 0 - 0,1428 % exprese beta-aktinu. Byla pozorována signifikantně zvýšená exprese Δ Np73 v našem souboru tkáně meduloblastomu ($p=0,0175$) (Graf 1b.)

Graf 1b



p73 Δ ex2 exprese byla detekována u 8 z 11 vyšetřených vzorků meduloblastomu a rovněž v referenční RNA z lidského mozečku. Medián exprese v referenční RNA činil 0,0084 % exprese beta-aktinu, u meduloblastomu 0,0077 % exprese beta-aktinu (rozsah 0 - 0,0828 %). Medián hodnot exprese v jednotlivých vzorcích nádoru ku referenční RNA (MBL:N) byl 0,92 (rozsah 0 - 9,86). Nebyl pozorován trend k nádorově specifické overexpresi p73 Δ ex2 v našem souboru pacientů, toto zjištění je však limitováno malým počtem vyšetřených vzorků, u 4 z 11 vzorků přesahuje normalizovaná hodnota 75. percentil exprese v referenční RNA mozečku. (Graf 1c.)

Graf 1c



Imunohistochemická detekce p73 α a Δ Np73

V souboru 23 histopatologicky vyšetřených meduloblastomů bylo dle morfologických kritérií WHO klasifikováno 17 nádorů jako klasický podtyp, 5 meduloblastomů bylo desmoplastických, 1 velkobuněčný. Byla provedena imunohistochemická detekce p73 α a Δ Np73, jako pozitivní byl hodnocen výsledek, při němž došlo k požadované reakci u více než 1 % buněk nádorové populace. Plexus choroideus byl užito jako pozitivní kontrola p73 α i Δ Np73 [28] (Obr. 2. A,B); v případě p73 α sloužila za pozitivní kontrolu rovněž epidermis, vykazující jadernou pozitivitu v parabazální vrstvě buněk [29]. 14 z 23 (61 %) vyšetřených meduloblastomů bylo p73 α pozitivních, vzorky vykazovaly difúzní jadernou i cytoplasmatickou pozitivitu, která v 6 případech přesáhla 10 % buněk (Obr. 2. C,E).

9 z 23 vzorků (39 %) bylo Δ Np73 pozitivních, byla detekována pouze cytoplasmatická exprese Δ Np73 (Obr. 2. D,F). Společná exprese Δ Np73 a α -řetězce (protein Δ Np73 α) byla prokázána v 7 z 9 Δ Np73 pozitivních vzorků. Vždy se jednalo o Δ Np73 pozitivitu v menším procentu buněk oproti α -řetězci, pouze u 2 vzorků překročila Δ Np73 pozitivita 10 % buněk nádoru. U dvou vzorků byla prokázána Δ Np73 pozitivita (v jednom případě pouze fokální) při negativitě α -řetězce. Nebyl detekován specifický vzorec exprese v desmoplastických meduloblastomomech ve srovnání s klasickým histologickým podtypem, toto pozorování je však omezeno počtem analyzovaných vzorků.

Imunohistochemie vs. real-time PCR detekce TP73 izoforem
9 vzorků bylo možno analyzovat metodou real-time PCR i imunohistochemicky. Detekce mRNA Δ Np73 korelovala s imunohistochemickou pozitivitou v 5 z 9 případů. Jednou byla pozorována nízká exprese transkriptu Δ Np73 a fokální imunohistochemické značení nepřesahující 1 % buněk preparátu, třikrát byla detekována pozitivita na úrovni proteinu a nikoliv mRNA. Vzorek vykazující nejvyšší expresi mRNA Δ Np73 byl imunoreaktivní v 50 % buněk preparátu, což byla rovněž nejvyšší pozitivita z vyšetřených meduloblastomů. 4 z 9 vzorků hodnocených oběma metodami mělo méně než 1 % p73 α -imunoreaktivních buněk, šlo o meduloblastomy, u nichž na úrovni mRNA byla detekována nízká a v jednom případě střední exprese TAp73 a zároveň žádná či nízká exprese transkriptů p73 Δ ex2 a Δ Np73.

Korelace exprese izoforem TAp73, Δ Np73, p73 Δ ex2 s expresí TRKC, MYCC - genů s dokumentovaným prognostickým významem u meduloblastomu

Neprokázali jsme korelaci mezi expresí transkriptů jednotlivých

vých izoforem p73 a protoonkogenu MYCC či neurotrophinového receptoru TRKC ($p > 0,05$, Spearmanův korelační koeficient).

Diskuse

Naše výsledky prokazují expresi N-terminálních izoforem p73 (TAp73, Δ Np73, p73 Δ ex2) u meduloblastomu, maligního embryonálního nádoru centrální nervové soustavy. Ve srovnání se zdravou tkání mozečku, z níž tento nádor histogeneticky vzniká, jsme prokázali metodou real-time PCR zvýšení exprese transkriptu Δ Np73 a trend k zvýšení exprese TAp73. Imunohistochemické značení potvrdilo pozitivitu Δ Np73 u více než třetiny vyšetřených nádorů. Rovněž imunoreaktivita p73 α pozorovaná u více než poloviny vzorků nepřímo svědčí pro skutečnost, že jsou exprimovány i další N-terminální izoformy p73, což je v souladu s analýzou na úrovni mRNA. Podíl p53-homologního proteinu p73 maligním fenotypu buňky byl dokumentován u řady nádorů [8,9,20-29]. Dle současných prací přibývá důkazů, že zvýšená exprese Δ TA forem p73, především Δ Np73, je u některých nádorů nepříznivým prognostickým znakem. Dobře je tato skutečnost dokumentována především u karcinomů - hepatocelulárního karcinomu, karcinomu plic, prsu, kolorekta, ovaria [21,22,27,28] a rovněž u neuroblastomu [23,39]. Překvapivě jen málo pozornosti je věnováno průkazu p73 v dalších nádorech neuronální histogeneze, přestože jsou p53 i p73 významně zapojeny v regulaci apoptózy a diferenciace v tkáni periferního i centrálního nervového systému [16,30,31]. Autorům předkládané práce není známa jiná studie zkoumající zastoupení TA vs. Δ TA N-terminálních izoforem u meduloblastomu. Jednou z mála prací zabývajících se expresí TP73 u mozkových nádorů je publikace Loiseau H. et al. [24], která prokazuje, pomocí semi-kvantitativní RT-PCR s primery neumožňujícími rozlišit TAp73 vs. Δ TAp73, zvýšenou expresi transkriptu p73 u ependymomu. Analýzovány byly v této práci i další vybrané nádory CNS, z nichž některé vzorky anaplastických astrocytomů a meduloblastomu vykazovaly zvýšený obsah mRNA p73. Ugur H. et al. [40] podal důkaz overexpresí mRNA TAp73 u 8 z 12 a Δ Np73 u 3 z 12 vyšetřených vzorků multiformního glioblastomu. Imunohistochemicky byl detekován protein p73 α/β v nádorové tkáni ependymomu, kraniofaryngeomu a některých vzorcích high-grade gliomů [41,42]. Mutační analýza p73 nedetekovala u meduloblastomu přítomnost mutace (soubor 5 vyšetřených vzorků) [43], analýza metylace TP73 prokázala tuto epigenetickou změnu u 2 z 11 vyšetřených meduloblastomů [44]. Meduloblastom představuje přibližně 20 % všech primárních nádorů mozku dětí, je nejčastějším maligním nádorem centrální nervové soustavy dětského věku. Dle klinických ukazatelů rozlišujeme onemocnění standardního a vysokého rizika, komplexní péče ve specializovaných centrech dět-

ské onkologie dosahuje 5-letého přežití bez progresu u 65-80 % pacientů standardního, avšak jen u 25-40 % pacientů vysokého rizika [45,46]. Protinádorová léčba je spjata s dlouhodobými nežádoucími účinky na dětský organismus, především s poruchami růstu, insuficiencí žláz s vnitřní sekrecí a s trvalým snížením kognitivních schopností. Nové poznatky nádorové biologie a klinická zkušenost ukazují, že meduloblastom je heterogenním onemocněním, všeobecně přijaté stratifikační ukazatele, jako jsou Changova klasifikace a rozsah resekce nádoru, nedostatečně vystihují biologickou povahu nádoru [46]. Nejčastěji popisovanými možnými biologickými prediktory meduloblastomu jsou neurotrofinový receptor TrkC a neuregulinový receptor ErbB2 (Her-2/neu) a dále protoonkogeny MYCC a MYCN. Vysoká exprese MYCC a nízká exprese TRKC jsou přijímány, byť ne obecně, za biomarkery s negativním prognostickým významem [34-36]. V práci Nakagawary A. [47] lze najít model hypotetizující zapojení proteinů rodiny p53, v prvé řadě Δ Np73, v signální kaskádě inhibice neurotrofinových receptorů Trk v neuronální tkáni. V naší práci jsme neprokázali společnou down- či upregulaci exprese TRKC či MYCC s expresí izoforem TP73 jako nepřímý důkaz možného prognostického významu exprese izoforem p73 u meduloblastomu. Asociace zjištěných biologických dat s klinickým ukazatelem přežití v našem souboru prozatím nebyla provedena pro krátký medián sledování pacientů. Prospektivní vyšetřování izoforem p73 u meduloblastomu, spolu s výzkumem dalších členů rodiny proteinu p53, nám v budoucnu umožní vyvodit závěry stran vzájemných vztahů TAp73 vs. Δ TAp73 a jejich prognostického významu.

Závěr

Na základě pozorované zvýšené exprese Δ Np73 a TAp73 v některých vzorcích meduloblastomu ve srovnání s referenční nenádorovou tkání mozečku vyvozujeme, že exprese izoforem p73 se může podílet na molekulární podstatě tumorigeneze tohoto onemocnění. Definujeme TP73 jako vhodný kandidátní gen pro další studium jeho prognostického a terapeutického významu u meduloblastomu.

Poděkování

Práce vznikla za podpory grantových prostředků shromážděných při Běžích Terryho Foxe pořádaných Českou obcí sokolskou v roce 2004. Částečně byla podpořena grantem FRVŠ 1303/05. Autoři děkují prim. Dr. R. Čufíkovi (FN Ostrava-Poruba) a prof. Dr. S. Němečkovi (FN Hradec Králové) za zapůjčení některých parafinových bloků pacientů léčených na KDO LF MU a FN Brno, a Dr. P. Müllerovi (MOÚ Brno) za poskytnutí plasmidu s amplikonem TAp73. J.K. a I.Z. přispěly ke vzniku práce stejným dílem.

Literatura

1. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-310.
2. Nenutil R, Smardova J, Pavlova S et al.: Discriminating functional and non-functional p53 in human tumours by p53 and MDM2 immunohistochemistry. *J Pathol* 2005;207:251-259.
3. Kaghad M, Bonnet H, Yang A et al.: Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997;90:809-819.
4. Yang A, Walker R, Bronson R et al.: p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant negative activities. *Mol Cell* 1998;2:305-316.
5. Česková P, Valík D, Vojtěšek B: What we currently know about the structure and function of the p53 homologue - p73 protein: facts, hypotheses and expectations. *Folia Biologica (Praha)* 2003;49:1-8.
6. Ikawa S, Nakagawara A, Ikawa Y: p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ* 1999;6:1154-1161.
7. Yang A, Walker N, Bronson R et al.: p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects, but lack spontaneous tumours. *Nature* 2000;404:99-103.
8. Moll UM, Slade N: p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* 2004;2:371-386.
9. Ozaki T, Nakagawara A: p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci* 2005;96:729-737.
10. Stiewe T, Zimmermann S, Frilling A et al.: Transactivation-deficient Δ TA-p73 acts as an oncogene. *Cancer Res* 2002;62:3598-3602.
11. Filippovich I, Sorokina N, Gatei M et al.: Transactivation-deficient p73 α (p73 Δ exon2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogene* 2002;20:514-522.
12. Goldschneider D, Million K, Meiller A et al.: The neurogene BTG2/TIS21/PC3 is transactivated by p73 specifically in neuroblastoma cells. *J Cell Sci* 2005;118:1245-1253.
13. Lissi NA, Davis PK, Irwin M et al.: A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation. *Nature* 2000;407:642-5.

14. Gong JG, Costanzo A, Yang HQ et al.: The tyrosin kinase c- Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 1999;399:806-809.
15. Yuan ZM, Shioya T, Ishiko T et al.: p73 is regulated by tyrosin kinase c- Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 1999;399:814-817.
16. Pozniak CD, Radinovic S, Yang A et al.: An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* 2000;289:304-306.
17. Miller FD, Pozniak CD, Walsh GS: Neuronal life and death: an essential role for the p53 family. *Cell Death Differ* 2000; 7:880-888.
18. Saifudeen Z, Diavolitis V, Stefkova J et al.: Spatiotemporal switch from deltaNp73 to TAp73 isoforms during nephrogenesis: impact on differentiation gene expression. *J Biol Chem* 2005;280:23094-102.
19. De Laurenzi V, Rossi A, Terrinoni A et al.: p63 and p73 transactivate differentiation gene promoters in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:342-346.
20. Stiewe T, Tuve S, Peter M et al.: Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* 2004;10:626-633.
21. Müller M, Schilling M, Sayan AE et al.: TAp73/DNp73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ* 2005;12, 564-1577.
22. Concin N, Becker K, Slade N et al.: Transdominant Δ TAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res* 2004;64:2449-2460.
23. Douc-Rasy S, Barrois M, Echeynne M, et al. DeltaN- p73alpha accumulates in human neuroblastic tumors. *Am J Pathol* 2002;160:631-639.
24. Loiseau H, Arsaut J, Demotes-Mainard J: p73 gene transcripts in human brain tumors: overexpression and altered splicing in ependymomas. *Neurosci Lett* 1999;263:173- 176.
25. Nozaki M, Tada M, Kashiwazaki H et al.: p73 is not mutated in meningiomas as determined with a functional yeast assay but p73 expression increases with tumor grade. *Brain Pathol* 2001;11: 296-305.
26. Zaika AI, Slade N, Erster SH et al.: Δ Np73, a dominant- negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up- regulated in human tumors. *J Exp Med* 2002;196:765-780.
27. Uramoto H, Sugio K, Oyama T et al.: Expression of Δ Np73 predicts poor prognosis in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6905-6911.
28. Domínguez G, García JM, Pena C et al.: Δ TAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53 and E2F- 1. *J Clin Oncol* 2006; DOI: 10.1200/JCO.2005.02.2350
29. Rejthar A, Nenutil R., Češková P et al.: p53 homologní proteiny: jedna rodina - rozdílné funkce? Jejich exprese je alterována při přechodu z prekancerózy do invazivního spinocelulárního karcinomu. *Klin Onkol* 2003;16:54-59.
30. Pozniak CD, Barnbė-Heider F, Rymar V et al.: p73 is required for survival and maintenance of CNS neurons. *J Neurosci* 2002;22:9800-9809.
31. Mayer G, Perez-Garcia CG, Abraham H et al.: Expression of p73 and reelin in the developing human cortex. *J Neurosci* 2002;22:4973-4986.
32. Fogarty MP et al.: Morphing into cancer : the role of developmental signaling pathways in brain tumor formation. *J Neurobiol* 2005;64:458-475.
33. Marino S: Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends in Mol Med* 2005;11:17-22.
34. Segal RA, Goumnerova LC, Kwon YK et al.: Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:12867-71.
35. Grotzer MA, Janss AJ, Fung K-M et al.: TrkC expression predicts good clinical outcome in primitive neuroectodermal brain tumors. *J Clin Oncol* 2000;18:1027-1035.
36. Grotzer MA, Hogarty MD, Janss AJ et al.: MYC messenger RNA expression predicts survival outcome in childhood primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:2425-33.
37. Witter C, Hahn M, Kaul K (Eds.) *Rapid Cycle Real-Time PCR - Methods and Applications, Quantification*. Berlin: Springer. 2004.
38. Sayan AE, Paradisi A, Vojtesek B et al.: New antibodies recognising p73: comparison with commercial antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:186-193.
39. Casciano I, Mazzocco K, Boni L, et al. Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ* 2002;9:246 -251.
40. Ugur H, Sayan AE, Ozdamar SO et al.: Expression of TAP73 and Delfa NP73 in malignant gliomas. *Oncol Rep* 2004;11:1337-1341.
41. Kamyia M, Nakazato Y: The expression of p73, p21 and MDM2 proteins in gliomas. *J Neurooncol* 2002;59:143-149.
42. Momota H, Ichimiya S, Ikeda T et al.: Immunohistochemical analysis of the p53 family members in human craniopharyngeomas. *Brain Tumor Pathol* 2003;20:73-77.
43. Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P et al.: Mutation analysis of the p73 gene in nonastrocytic brain tumours. *Br J Cancer* 2001;85:204-208.
44. Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Lomas J et al.: Epigenetic changes in pilocytic astrocytomas and medulloblastomas. *Int J Mol Med* 2003;11:655-660.
45. Ellison DW, Clifford CS, Gajjar A et al.: What's new in neuro-oncology? Recent advances in medulloblastoma. *Eur J Paediatr Neurol* 2003;7:53-66.
46. Gajjar A, Hernan R, Kocak M et al.: Clinical, histopathologic, and molecular markers of prognosis: toward a new disease risk stratification system for medulloblastoma. *J Clin Oncol* 2004;22: 984-993.
47. Nakagawara A: Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett*;169:107- 114;2001.

Došlo: 31. 1. 2006
Přijato: 3. 4. 2006