

9p21 hromosomas CDKN2A lokusa heterozigotitātes analīze nefroblastomas gadījumā

Ivanda Franckeviča^{1,2}, Dace Pjanova³, Regīna Kleina¹

¹ Rīgas Stradiņa universitāte, Patoloģijas katedra, Latvija

² Bērnu klīniskā universitātes slimnīca, Bērnu patoloģijas birojs, Latvija

³ Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

Ievads. 9p21 hromosomā lokalizētā audzēju nomācēja gēna CDKN2A/p16^{INK4a} inaktivācija literatūrā ir aprakstīta T šūnu akūtas limfoblastu leukēmijas, gliomas, melanomas un citu audzēju gadījumā [de Vries, et al., 2006]. Minētā gēna produkts – proteīns p16^{INK4a} – iesaistās šūnas cikla regulācijā, izkonkurējot ciklīnu D1 CDK4 un apturot šūnas ciklu. CDKN2A/p16^{INK4a} gēna inaktivācijas gadījumā netiek ierobežota šūnu proliferatīvā aktivitāte [Borg, et al., 2000]. Nefroblastomas gadījumā ir aprakstīta CDKN2 lokusā esošo gēnu inaktivācija ~12% no audzējiem [Natrajan, et al., 2008]. Imūnhistoķīmiski atrasta saistība starp histoloģiskajiem audzēja tipiem un p16^{INK4a} ekspresiju [Basta-Jovanović, et al., 2008].

Darba mērķis ir veikt CDKN2A/p16^{INK4a} gēna izmaiņu izpēti nefroblastomas gadījumā, izmantot CDKN2 lokusa heterozigotitātes zuduma analīzi un p16^{INK4a} proteīna imūnhistoķīmisku noteikšanu.

Materiāls un metodes. Izmeklēti 14 primāras nefroblastomas gadījumi. Heterozigotitātes zuduma analīze veikta, nosakot 7 (D9S942, D9S1604, D9S974, D9S1748, D9S1870, D9S171 un D9S736) CDKN2 lokusa mikrosatelītu marķierus ar polimerāzes ķedes reakciju. Imūnhistoķīmiskā izmeklēšana veikta ar antivielu CDKN2A/p16^{INK4a} (2D9A12Abcam, Cambridge, MA). Reakcijas pozitivitāte izvērtēta atsevišķi visos audzēja komponentos – stromālajā, epiteliālajā un blastematozajā – un noteikta procentuāli. Ekspresijas salīdzināšanai starp audzēju grupām ar un bez gēna heterozigotitātes zuduma izmantots Manna-Vitnija kritērijs.

Rezultāti. Heterozigotitātes zudums konstatēts 3 gadījumos (21,43% no kopējās grupas) četriem mikrosatelītiem: vienā gadījumā (7,14%), analizējot marķieri D9S736, kas atrodas aiz CDKN2A/p16^{INK4a} gēna pēdējā trešā eksona; vienā gadījumā, analizējot marķieri D9S1604, kas atrodas intronā pirms gēna, norādot uz iespējamu tā saistību ar nefroblastomas attīstību; vienā gadījumā heterozigotitātes zudums atrasts gan marķieri D9S942, gan arī marķieri D9S171 vienlaicīgi. Minētie marķieri attiecīgi atrodas intronā starp 1β un 1α eksoniem un pirms CDKN2A/p16^{INK4a} gēna 1β eksona, norādot uz lielāka reģiona delēciju. Salīdzinot p16^{INK4a} proteīna ekspresiju gadījumos ar un bez gēna heterozigotitātes zuduma, gadījumos, kad konstatētas abas alēles, vidējais pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā bija 80,55%, stromālajā komponentā – 79,87%, epiteliālajā komponentā – 87,25%. Ja mikrosatelītu marķieru analīzē atrasts heterozigotitātes zudums, vidējais pozitīvo šūnu daudzums blastematozajā komponentā bija 84,28%, stromālajā komponentā – 93,51%, epiteliālajā komponentā visos gadījumos pozitīvo šūnu daudzums bija 100%. Statistiski būtisku atšķirību starp minētā proteīna ekspresiju abās grupās nekonstatējām (p = 0,88; p = 0,75, p = 0,091).

Secinājumi. Atrasts heterozigotitātes trūkums četros no analizējamiem marķieriem (D9S736, D9S1604, D9S942, D9S171) un neizmainīta p16^{INK4a} proteīna imūnhistoķīmiskā ekspresija, kas nozīmē, ka CDKN2A lokuss var būt iesaistīts nefroblastomas ģenēzē, bet ar audzēja attīstību saistāmais gēns vēl ir jāidentificē.