

АДХЕЗИОНИ МОЛЕКУЛИ У WILMS-ОВОМ ТУМОРУ : ЕКСПРЕСИЈА И ЗНАЧАЈ БЕТА-КАТЕНИНА (II ДЕО)

Гордана БАСТА-ЈОВАНОВИЋ¹, Сања РАДОЈЕВИЋ¹, Славиша ЂУРИЧИЋ², Марина САВИН³, Стево ШКОДРИЋ¹, Гордана БУЊЕВАЧКИ², Јован ХАЏИ-ЂОКИЋ³, Вида НЕШИЋ³

1. Институт за патологију Медицинског факултета у Београду; 2. Институт за здравствену заштиту мајке и детета Србије " Др Вукан Чупић"; 3. Институт за нефрологију и урологију КБЦ Србије

КРАТАК САДРЖАЈ: Бета-катенин је гликопротеин који има важну улогу ћелијско-ћелијској адхезији, у проводјењу сигнала и у регулацији експресије гена и у интеракцији са аксином и APC (аденоматоус полипосис цоли). Позната је његова улога као онкогена у неколико типова карцинома у хуманој популацији. Као протоонкоген је највероватније укључен у туморогенезу Wilms-овог тумора. Данас је познато да се у 15% Wilms-ових тумора налази мутација β-катенина, што указује да поремећај у Wnt сигналом путу игра важну улогу у настанку неких типова Wilms-овог тумора. Циљ нашега рада је био да испитамо експресију β-катенина у ћелијама Wilms-овог тумора, да је упоредимо са експресијом у нормалном бубрежном ткиву и да испитамо да ли постоји корелација између његове експресије у тумору са туморским стадијумом, хистолошким типом и/или прогностичком групом.

Кључне речи: Wilms-ов тумор, адхезиони молекули, β-катенин

Бета-катенин је гликопротеин молекулске масе 92 кД. У почетку се сматрало да β-катенин има једино улогу у ћелијско-ћелијској адхезији. Касније су уочене и друге функције које β-катенин може имати у ћелији као што је централна улога у провођењу сигнала и регулација експресије гена. β-катенин и његов хомолог γ-катенин (плакоглобин) ступају у три врсте интеракција: интеракције са кадхеринима у везним спојевима, интеракције у нуклеусу где се везују за транскрипционе факторе и стимулишу експресију гена интеракција слободног цитоплазматског β-катенина са аксином и APC (adenomatous polyposis coli) протеином. Испитивања су показала да све три врсте интеракције имају важну улогу како у морфогенези и одржавању структуре ткива, тако и у процесу туморогенезе (1).

Мишљење је да β-катенин може да делује као онкоген прекомерно активирајући гене који директно доприносе развоју тумора. Онкогенска активација β-катенина се јавља у неколико типова карцинома у хуманој популацији (2). Према мишљењу многих истраживача бета-катенин као онкоген конфигурира као кандидат за ген значајан за настанак Wilms-овог тумора.

Циљ нашега рада био је да се анализира експресија β-катенина у Wilms-овом тумору, да је упоредимо са експресијом у нормалном бубрежном ткиву и да испитамо да ли постоји корелација између његове експресије у тумору са туморским стадијумом, хистолошким типом и/или прогностичком групом.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД

Експресија β-катенина испитана је у 28 случајева Wilms-овог тумора од којих су 18 били болесници

женског а 10 мушког пола (однос дечаки:девојчице био је 5:9). Просечна старост болесника била је 48 месеци, а кретала се у распону од 7 - 132 месеца. У испитаној групи били су заступљени сви стадијуми, као и сви хистолошки типови Wilms-овог тумора, а само у једном случају код болесника је постојала метастаза тумора бубрега у ткиво плућа. У једном случају Wilms-ов тумор је нађен билатерално.

Ткивни исечци Wilms-овог тумора са парафинских калуца су после депарафинизације кувани у микроталасној пећници 3x5 минута после чега су се 30 мин хладили у цитратном пуферу на собној температури. После испирања дестилованом водом препарати су потопљени у 3% водоник пероксид 5 мин. а потом су испрани дестилованом водом 30 сек., после чега су испрани PBS-пуфером 3x5 мин. У циљу блокирања неспецифичне реакције на препарате је на капан свињски серум 1:10 у трајању од 30 мин. после чега је апликовано примарно антителио (β-катенин) у разблажењу 1:100 у трајању од 60 мин. Након тога препарати су испрани у PBS пуферу 3x5 мин а затим је апликовано секундарно антителио (LSAB+ визуелизациони систем, у нашем случају стрептавидин биотин). После око 30 мин. или када се оцени да се реакција потпуно развила препарати се испирају у PBS пуферу 3x5 мин. Затим се на препарате накапљава DAB (хромоген) у трајању од 10 мин. У циљу боље визуелизације испитиваних антигена плочице са ткивом се потапају у Мауеров хематоксилин у трајању од 2-3 мин., потом у дестиловану воду, а на крају се испирају обичном водом у трајању од 5 мин. Резултати имунохистохемијског боје-

ња Wilms-овог тумора добијени су прегледом стандардним светлосним микроскопом (Олумпус, Јапан), а оцењивање је вршено семиквантитативно по следећем принципу: одсутно бојење у свим ћелијама -, мање од 10% позитивних ћелија + (фокална експресија), 10-50% позитивних ћелија ++ (умерена експресија) и преко 50% +++ (дифузна експресија).

РЕЗУЛТАТИ

Ћелије Wilms-овог тумора значајно експримирају б-катенин. У већини случајева експресија је била појачана у односу на нормално ткиво што је приказано на табели 1. Није уочена корелација између стадијума тумора и експресије б-катенина. Такође није уочена корелација између експресије б-катенина и прогностичке групе тумора. Што се тиче хистолошког типа тумора, у анапластичном типу је експресија б-катенина највише повећана у односу на нормално бубрежно ткиво. Мембранска експресија б-катенина је била смањена у свим случајевима. Од свих компоненти епителна компонента је показивала највише очувану мембранску експресију. Цитоплазматска експресија је била присутна у већини случајева како у епителној тако и у бластемској и стромалној компоненти. Међутим, нуклеарна експресија је била присутна само у бластемској компоненти.

ДИСКУСИЈА

б-катенин има две одвојене улоге: у Е-кадхерин повезаној ћелијској адхезији и као активатор транскрипције одређених гена (с-тус и *cyclin D*). Везан за Е-кадхерин, мембрански ограничена фракција б-катенина учествује у ћелијско-ћелијској адхезији. Сматра се да је у карциногенези важнија улога б-катенина као транскрипционог активатора. Наиме мутације APC гена уочене у неким туморима онемогућавају APC-посредовану деградацију б-катенина што доводи до повећања његове концентрације у ћелији. Онкогентици потенцијал б-катенина је изведен из његове нуклеарне фракције, која ступа у везу са члановима TCF (*T cell factor*) фамилије транскрипционих фактора. Настали, транскрипциони комплекс, активира гене као што су с-тус и *ciklin D*, који су укључени у пролиферацију. Новији подаци, међутим, указују да нуклеарна експресија б-катенина није увек у вези са пролиферацијом, али јесте са величином тумора (3). Током ембриогенезе, ниво нуклеарног б-катенина се не разликује од нивоа у карциному. Код одраслог, сва нормална епителна ткива показују само мембранску експресију б-катенина. Међутим, у туморима, долази до смањења експресије мембранског б-катенина, а пораста нуклеарног (4). Смањена мембранска, а повећана нуклеарна експресија б-катенина је повезана са прогресијом тумора како епителног тако и мезенхимног порекла (5,6,7). У случајевима Wilms-овог тумора који су испитивани у овој студији мембранска експресија је била смањена у свим случајевима као и у свим компонентама тумора. Мембранска експе-

сија је била највише очувана у епителној компоненти тумора. Смањење мембранске експресије б-катенина је вероватно последица аберантне локализације протеина. Нуклеарна локализација је била присутна само у бластемској компоненти. Присуство нуклеарне локализације б-катенина указује да је Wnt сигнални пут укључен у развој Wilms-овог тумора. Међутим, у испитиваним случајевима није било корелације између нуклеарне експресије б-катенина и стадијума тумора. Такође, није постојала корелација нуклеарне експресије са хистолошким типом тумора, као ни са прогностичком групом. Brabletz и сарадници сматрају да нуклеарна експресија б-катенина не мора бити у вези са пролиферацијом већ са величином тумора, што је највероватније случај код Wilms-овог тумора.

Kimura и сарадници су показали да се акумуляција слободног, растворљивог б-катенина јавља током карциногенезе (8). Они су показали да је у карциному езофагуса количина цитоплазматског б-катенина четири пута већа у односу на нормално ткиво, али није у корелацији са градусом тумора. У случајевима Wilms-овог тумора, који су испитивани у овој студији цитоплазматска експресија б-катенина је била повећана у већини случајева, како у епителној тако и у стромалној и бластемској компоненти.

Amitay и сарадници су показали да је експресија б-катенина у највећем броју примарних неуробластома очувана, тј. није дошло до смањења експресије б-катенина у неуробластома (9). Код хепатобластома, запажене су б-катенин мутације у сваком хистолошким типу, без корелације са хистолошким типом. У колоректалном карциному експресија б-катенина је била очувана, што указује на врло важну улогу б-катенина у сигналним путевима (10). Aiman и сарадници су нашли повећану експресију б-катенина у дезмоидним туморима (11). Насупрот томе, Билим и сарадници су показали да је експресија б-катенина смањена у карциному бубрежних ћелија и транзициоцелуларном карциному и да је у корелацији са стадијумом тумора и присуством метастаза у лимфним чворовима код карцинома бубрежних ћелија, односно транзициоцелуларног карцинома (12). Баста-Јовановић и сарадници су такође, показали корелацију између експресије бета и алфа катенина са стадијумом у карциному бубрежних ћелија (13). Између смањене експресије б-катенина и појаве рецидива није уочена корелација. Такагата и сарадници су запазили смањену експресију б-катенина у неколико тумора гастроинтестиналног тракта (14). Нака и сарадници су показали изражен губитак експресије б-катенина у хондросаркому (15).

Ћелије Wilms-овог тумора експримирају б-катенин. Експресија б-катенина је била повећана у већини случајева у односу на нормално ткиво бубрега. Три случаја нефробластома у којима б-катенин није био присутан спадали су у стадијуме I и IV. Међутим, у одређеном броју тумора истог стадијума потврђена је јака и дифузна експресија б-катенина, па

се из резултата који су приказани у овом раду не може закључити да је смањење експресије β -катенина повезано са стадијумом тумор (16). Сви хистолошки типови, осим анаплазног Wilms-овог тумора су показивали углавном очувану експресију β -катенина. У случају анаплазије, експресија је била повећана у односу на нормално ткиво бубрега. Наши резултати су у сагласности са резултатима Amitay-а и сарадника, који су испитивали експресију β -катенина у неуробласту и показали да је експресија β -катенина углавном очувана у примарном неуробласту, али није било значајне корелације између експресије β -катенина и хистопатолошких фактора.

Повећање експресије β -катенина у случајевима анаплазије, која представља познат лош прогностички фактор у Wilms-овом тумору и присуство нуклеарне експресије у бластемској компоненти, која је најмање диферентована компонента тумора, показује да повећање експресије β -катенина може бити повезано са лошом прогнозом Wilms-овог тумора. С обзиром да је према нашим сазнањима, ово прво истраживање које се односи на имунохистохемијску експресију β -катенина у Wilms-овом тумору, даља испитивања експресије β -катенина у већем броју тумора различитих хистолошких типова, стадијума и прогностичких група, ће показати да ли имунохистохемијски налаз повећане експресије β -катенина, као и налаз експресије β -катенина у нуклеусу може бити коришћен као маркер за лошу прогнозу Wilms-овог тумора.

ЗАКЉУЧЦИ

Ћелије Wilms-овог тумора експримирају β -катенин. Експресија је у већини случајева очувана у односу на нормално ткиво бубрега. Неки случајеви Wilms-овог тумора, као што је анаплазичан тип, показују повећану експресију у односу на нормално ткиво.

Не постоји никаква правилност између испољавања β -катенина и стадијума анатомског развоја, хистолошког типа и прогностичке групе тумора. Нуклеарна експресија је присутна у Wilms-овом тумору, што указује на активацију Wnt сигналног пута током развоја тумора

ЛИТЕРАТУРА

1. Khurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze, ev A: Plakoglobin and beta-catenin protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Science* 2000, 113: 3127-3139
2. Polakis P: The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin in Gen* 1999, 9:15-21
3. Brabletz T, Juny A, Reus R, et al: Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98(18): 10356-61
4. Hao X, Towlinson I, Piyas M: Reciprocity between membranous and nuclear expression of beta-catenin in colorectal tumours. *Virchows Arch* 1997, 431(3): 167-72
5. Bohm J, Niskanen L, Kiraly K: Exprssion and prognostic value of alpha, beta and gamma -catenins in differentiated thyroid carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrin and Metabolisms* 2000, 85(12): 4806-4811
6. Eberhart CG, Argani P: Wnt signaling in human development: beta-catenin nuclear translocation in fetal lung, kidney, placenta, capillaries, adrenal, and cartilage. *Pediatr Dev Pathol*

ADHESION MOLECULES IN WILMS TUMOR , BETA-CATENIN EXPRESSION AND SIGNIFICANCE (PART II)

Gordana BASTA-JOVANOVIC¹, Sanja RADOJEVIC¹, Slaviša DJURICIC², Marina SAVIN³, Stevo SKODRIC¹, Gordana BUNJEVACKI², Jovan HADZI-DJOKIC³, Vida NESIC³

1. Institute of Pathology, University School of Medicine, Belgrade; 2. Institute for health protection of mother and child of Serbia "Dr Vucan Cupic"; 3. Institute of Nephrology and Urology, Clinical Centre of Serbia

Beta-catenin is a glycoprotein which has an important role in cell-cell adhesion, as well as in cell signal transmittion, in u regulation of gen expression and in interaction with axin and APC (adenomatous poliposis coli). Its oncogenic role in several types of carcinomas in human population is well known. It is very likely that β -catenin as an protooncogen plays an importante role in genesis of Wilms tumor. It is well known that in 15% Wilms tumors there are β -catenin mutations, which indicates that there is a disorder in Wnt signal paththat plays an important role in Wilms tumor genesis. The aim of

our study was to investigate b-catenin expression in Wilms tumor, to compaire it with the expression in normal renal tissue as well as to see if there is a positive correlation between b-catenin expression in Wilms tumor with tumor stage, histologic type and/ or prognostic group.

Key words: Wilms tumor, adhesion molecules, β -catenin.

Dr Gordana Basta-Jovanovic
Takovska 21,
11000 Beograd

- 2001,4(4): 351-7
7. Eberhart CG, Tihan T, Burger PC: Nuclear localiyation and mutation of beta-catenin in medulloblastomas. *J Neropathol Exp Neurol* 2000, 59: 333-7
 8. Kimura J, Schiozaki H, Doki J, et al: Cytoplasmic beta-catenin in esophageal cancers. *Int J Cancer* 1999, 84: 174-8
 9. Amitay R, Nass D, Meitar D, et al: Reduced expression of plakoglobin correlates with adverse outcome in patients with neuroblastoma. *American Journal of Pathology* 2001,159: 43-49
 10. Ghadimi BM, Behrens J, Hoffmann I, et al: Immunohistological analysis of E-cadherin, alpha, beta and gamma catenin expression in colorectal cancer :Implications for cell adhesion and signaling. *Eur J Cancer* 1999, 35(1):60-5
 11. Alman B, Ali C, Pajerski M E, Diaz-Cano S, et al: Increased beta-catenin protein and somatic APC mutations in sporadic aggressive fibromatoses (desmoid tumors). *Am J Pathol* 1997, 151:329-34
 12. Bilim V, Kawasaki T, Katagiri A, et al: Altered expression of beta-catenin in renal cell cancer and transitional cell cancer with the absence of beta-catenin gene mutations. *Clin Cancer Res* 2000, 6:460-6
 13. Basta-Jovanovic, S. Radojevic, Lj. Djordjevic, et al: Alpha and beta catenin expression in renal cell carcinoma. *Archive of Oncology* 2002, 10: 51
 14. Takayama T, Shiozaki H, Shibamoto S, et al: Beta-catenin expression in human cancer. *Am J Pathol* 1996, 148: 39-46
 15. Naka T, Oda Y, Iwamoto Y, et al: Immunohistochemical analysis of E-cadherin, alfa-catenin, beta-catenin and gama-catenin, and neural cell adhesion molecule (NCAM) in chordoma. *J Clin Pathol* 2001, 54: 945-950
 16. S. Radojevic, G. Basta-Jovanovic, S. Djuricic, et al: Beta-catenin expression in Wilms tumor. *Archive of Oncology* 2002, 10: 56