

## EXPRESSE P16INK4A V DYSPLÁZIÍCH A NÁDORECH DĚLOŽNÍHO ČÍPKU

### THE EXPRESSION OF P16INK4A IN CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA AND INVASIVE CARCINOMA

ROTTEROVÁ P.<sup>1</sup>, NENUTIL R.<sup>1</sup>, HANZELKOVÁ Z.<sup>1</sup>, HELÁNOVÁ Š.<sup>2</sup>, KŘEN L.<sup>1</sup>, CHOVANEC J.<sup>3</sup>, ROTTER L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> PATOLOGICKO-ANATOMICKÝ ÚSTAV, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

<sup>2</sup> ZÁKLADNA EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

<sup>3</sup> GYNEKOLOGICKO-PORODNICKÁ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

**Souhrn.:** *Východisko:* Za fyziologických okolností je produkt antionkogenu p16INK4a inhibítozem cyklin dependentních kináz a reguluje buněčný cyklus na přechodu z G0 do G1 fáze. Protein Rb, produkt retinoblastomového genu, v aktivní formě inhibuje transkripci p16. V dyspláziích a karcinomech děložního čípku papilomaviry transformují epitel mimo jiné inaktivací pRb onkoproteinem E7. V důsledku blokady funkce pRb se neefektivně zvedá hladina p16. *Soubor nemocných a metodika:* Vzhledem k zajímavosti této problematiky a jejímu potenciálu pro screening cervikálních prekanceróz, jsme imunohistologicky vyšetřili 56 biotických vzorků (konizáty, hysterektomie), z toho 10 CIN I-II, 30 CIN III, 8 spinocelulárních karcinomů, 2 adenokarcinomy hrdla a 6 případů s reaktivními změnami epitelu. Pomocí imunoblottingu jsme vyšetřili expresi p16 v buněčných liniích se známou funkcí Rb. *Výsledky:* Difúzní a kompletní pozitivita p16 byla prokázána ve všech CIN III a spinocelulárních karcinomech. CIN I-II byly částečně pozitivní v 7 případech a v adenokarcinomech byla exprese prokázána v 1 ze dvou případů. V buněčných liniích byl p16 prokázán pouze v buňkách s poruchou funkce Rb (HeLa a HS913T). *Závěr:* Naše studie potvrdila zvýšenou expresi p16INK4a u progredientních prekanceróz a karcinomů děložního čípku. Detekce p16 pravděpodobně nalezne uplatnění v biotické diagnostice při stanovení okrajů konizátu a diferenciální diagnóze CIN oproti reaktivním atypiím. Je perspektivní i v onkocytologické diagnostice pro diferenciální diagnózu lézí ASCUŠ, případně i automatizovaný screening nebo kontroly kvality.

**Klíčová slova:** cervix, dysplázie, karcinom, HPV, pRb, p16

**Abstract:** *Background:* The antioncogene p16INK4a inhibits cyclin-dependent kinases and represents a feedback regulation of the cell cycle. Protein Rb, the product of the retinoblastoma antioncogene, in its active form inhibits transcription of p16. In dysplasias and carcinomas of the uterine cervix the papilomaviruses transform the epithelium by inactivation of the pRb by oncoprotein E7, among others. Due to pRb inactivity the level of p16 protein in cells is increased. *Patients and Methods:* An immunohistochemical analysis of 56 cases of formalin-fixed, paraffin embedded samples of the uterine cervix (included cone biopsies and hysterectomies) was performed. The database included 10 cases of CIN I-II, 30 cases of CIN III, 8 invasive squamous cell carcinomas, 2 cases of endocervical adenocarcinoma and 6 cases of reactive epithelial changes. The immunoblotting of p16 was performed in cell lines with known function of Rb. *Results:* Diffuse and intensive positivity was found in all cases of CIN III and squamous cell carcinomas. Cases of the CIN I-II were partially positive in 7 cases and positivity was found in one adenocarcinoma. In cell lines, the p16 expression was restricted to cells with impaired Rb (HeLa and HS913T). *Conclusion:* Our study confirmed increased expression of p16INK4a in high-grade precancerous lesions and in carcinomas of the uterine cervix. The detection of p16 seems to be valuable tool in the surgical pathology of the uterine cervix: possible evaluation of the surgical margins, the differential diagnosis regarding reactive atypia, and it is also perspective in oncocytologic diagnosis regarding differential diagnosis of the ASCUS, or possibly can be used in automated screening or quality assessment.

**Key words:** uterine cervix, dysplasia, carcinoma, HPV, pRb, p16

## Úvod

Problematice dysplázií a karcinomu děložního čípku je již od dob Papanicolaou věnována velká pozornost v gynekologické onkologii. Přesto, že díky jejich lokalizaci je možná účinná prevence výskytu invazivních nádorů, zůstávají stále velkým zdravotnickým problémem. Pomocí vysoce senzitivních metod detekce se zjistilo, že drtivá většina těchto lézí je kauzálně sdružena s přítomností papilomavirové (HPV) infekce (1). Přes nadějně výsledky v oblasti imunizace proti HPV (2), která by se mohla v budoucnosti stát účinnou primární prevencí, zůstává zatím depistáž cervikálních prekanceróz s odběrem onkologické cytologie a vyhodnocením dle klasifikačního systému Bethesda (3) nadále zlatým standardem v této oblasti.

Vyhodnocení onkologické cytologie je poměrně pracné a screening jako celek je zatížen i nezanedbatelným procentem falešně negativních i pozitivních výsledků. Proto by byla žádoucí komplementární vysoce senzitivní, specifická a spolehlivá metoda k včasné detekci progredientních prekanceróz. Nabí-

zející se průkaz papilomavirové DNA, je však zatížen falešně pozitivními výsledky (4) a obtížností zavedení do rutinního screeningu i vzhledem k vysoké ceně. Určitým metodickým pokrokem je zavedení tzv. tekutých cytologických vzorků (liquid based smears). Jedná se o odběr materiálu z děložního čípku kartáčkem do tekutého média se směsí alkoholů, ve kterém se po určité době buňky fixují a jsou centrifugovány na sklíčka. Výhodou tohoto postupu mimo jiné je, že k rutinnímu vyhodnocení se použije pouze část vzorku a u zbytku je možné další zpracování (např. imunocytochemické metody). Díky tomu připadá v úvahu diagnostické využití proteinových markerů. Proteiny sdružené s proliferací (Ki67, Mcm5, Cdc6) se však neosvědčily vzhledem k nízké specificitě, protože se vyskytují ve všech proliferujících buňkách (5) a rozdíl v jejich expresi mezi normálním epitelem a prekancerózou je pouze kvantitativní. Nadějnější výsledky poskytuje stanovení proteinu p16, funkčně svázaného s regulací buněčného cyklu prostřednictvím proteinu Rb.

Retinoblastomový (Rb) gen je klasický antionkogen, jeho mutace je typicky spojena s výskytem retinoblastomu a části osteosarkomů. Jeho produkt, protein Rb (pRb), je jaderný fosfoprotein, který se dle stadia buněčného cyklu se nachází v různých fosforylovaných formách. V G0 fázi je Rb protein převážně v nefosforylované formě a působí jako supresor buněčného dělení vazbou dalších proteinů, zejména transkripčního faktoru E2F. Stimulací buněk růstovými faktory je pRb inaktivován řadou fosforylací a tyto buňky pak mohou přejít z G1 do S fáze. (6).

p16 (p16INK4a) je popisován jako antionkogen, který je inaktivován mutacemi, delecí nebo hypermetylací u celé řady malignit (např. melanom, karcinom močového měchýře a další) (6). Jeho produkt účinkuje jako inhibitor cyklin dependentních kináz, zejména cyklin dependentní kinázy 4 (CDK 4). p16 odbourává komplex cyklin D/CDK4 které inaktivují pRb fosforylací. Naopak aktivní forma pRb inhibuje transkripci p16. Funkcí systému pRb/p16 je tedy regulace buněčného cyklu na přechodu z G1 do S fáze se zpětnou vazbou.

HPV (lidské papilomaviry) jsou značně rozšířené a výrazně epitelotropní DNA viry. Hrají zásadní roli v patogenezi většiny nádorů děložního čípku a jejich prekurzorových lézí. Po integraci virové DNA do genomu hostitelské buňky dochází k interakci virových onkoproteinů E6 a E7 vysoce rizikových HPV typů s produkty onkosupresorických genů (p53, p105Rb) a jejich funkční inaktivaci. E7 zde jednak uvolňuje transkripční faktor E2F z vazby na pRb, jednak zrychluje degradaci pRb a příbuzných proteinů (7). Již v roce 1995 byla zaznamenána (8), tehdy nevysvětlitelná nízká hladina komplexů cyklin D/CDK4 v buňkách s mutovaným nebo viry inaktivovaným Rb. Důvodem je později zjištěná vysoká exprese inhibitoru cyklin-dependentních kináz p16 (5) v buňkách s inaktivací Rb, a to zejména v HPV transformovaném epitelu, včetně dysplázií děložního čípku (9). Nefunkční pRb v těchto lezích umožňuje nekontrolovatelnou proliferaci a nepotlačuje ani transkripci p16. V cervikálních prekancerózách a nádorech způsobených HPV se tedy nejedná o mutaci nebo inaktivaci p16, ale naopak zjišťujeme jeho zvýšenou expresi s vysokou hladinou proteinu. Ten sice snižuje hladinu komplexů cyklin D/CDK4 ale funkčně se díky inaktivaci pRb neuplatní.

Vzhledem k zajímavosti této problematiky a jejímu potenciálu pro screening a diagnostiku cervikálních prekanceróz, jsme v této práci ověřovali expresi p16 na vlastním materiálu z biopsií hlava děložního a na buněčných liniích.

## Materiál a metody

*Tkáňové kultury, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu a imunobloting.*

Buňky nádorových linií HeLa, A431, HS913T, MCF7 a BT474 byly kultivovány v modifikovaném Dulbecco mediu (DMEM) obsahujícím 10% FBS (fetální hovězí sérum), glutamin a antibiotika penicilin a streptomycin, při teplotě 37 °C s 5% obsahem CO<sub>2</sub>. 80% konfluentní buňky byly 3x opláchnuty na 4 °C vychlazeným PBS a sklizeny seškrabáním do PBS, centrifugovány 7 minut při 1200 rpm. Buněčný sediment byl lyzován v lyzačním roztoku NET. (150 mM NaCl, 1% NP-40 (nonidet = ethylfenylPEG), 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM NaF, 5 mM EDTA (pH 8,0), před použitím přidány inhibitory proteáz: PMSF do výsledné koncentrace 2mM, směs inhibitorů proteáz Sigma P8340 (AEBSF 104 mM, Aprotinin 0,08mM, Leupeptin 2,1 mM, Bestatin 3,6 mM, PepstatinA 1,5 mM, E-64 1,4 mM) v poměru 1:100. Proteinová koncentrace byla stanovena metodou BioRad (Bio Rad, USA). Vzorky byly ředěny ve 2x koncentrovaném Laemmli vzorkovém roztoku pro elektroforetickou analýzu do výsledné koncentrace 100μg.

Proteiny byly separovány SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (SDS-PAGE) v 15% gelu a přeneseny na nitrocelulózovou membránu (s využitím Bio-Rad Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell) po dobu dvou hodin při

4 °C a 150 mA v blotovacím roztoku (25 mM Tris, 190 mM glycin a 20% metanol). Nitrocelulózová membrána s přenesenými proteiny byla blokována po dobu dvou hodin v blokovacím roztoku 5% mléka a 0.1% Tween 20 v PBS. Primární protilátky byly nanášeny na tuto membránu v koncentraci 1 μg na 1 ml blokovacího roztoku a inkubovány při 4 °C přes noc. Membrána byla po inkubaci s primární protilátkou promyta třikrát 10 minut v roztoku PBS obsahujícím 0.1% Tween 20. Po promytí byla nanášena sekundární protilátka (králičí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křefenovou peroxidázou, DAKO, Denmark), ředěná 1:1000 v blokovacím roztoku. Sekundární protilátka byla inkubována při pokojové teplotě po dobu dvou hodin. Peroxidázová aktivita byla vizualizována pomocí ECL kitu (Amersham, UK).

## *Tkáňové vzorky a imunohistologie:*

56 bioptických vzorků z konizátů a hysterektomií. Z toho 10 CIN I-II, 30 CIN III, 8 spinocelulárních karcinomů, 2 adenokarcinomy hrdla a 6 bez dysplastické léze. Materiál byl fixován v 10% formalínu, tkáňové bloky byly zpracovány standardní histologickou technikou a zality do parafínu. Rutinně připravené vzorky v parafinových blocích byly nakrájeny na tloušťku 5μm a zachyceny na elektrostaticky upravená skla (Superfrost Plus, Menzel), řezy odparafinovány v xylenu a rehydratovány. Endogenní peroxidázová aktivita byla blokována po dobu 15 minut 3% roztokem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v PBS (fyziologický roztok pufovaný fosfátem na pH 7,2). Odmaskování antigenního epitopu bylo provedeno zahříváním skel s řezy po dobu 40 minut při 94 °C v 1mM pufru EDTA-tetrasodná sůl EDTA, pH 8,0. Po promytí v PBS (3x5 minut) byly z důvodu zablokování nespecifické vazebné aktivity řezy převrstveny na dobu 15 minut roztokem 5% nízkotučného mléka v PBS. Komerční monoklonální protilátka proti p16 NCL-P16-432 (Novocastra), ředěná 1:50 v DAKO antibody diluent byla aplikována na řezy při teplotě 40C přes noc. Po trojím promytí v PBS byla nanášena anti-myší sekundární protilátka značená biotinem a následně ABC reagentie (Vector Elite ABC kit, Vector) dle návodu výrobce. Peroxidázová aktivita byla vizualizována kitem DAB+ (DAKO). Po promytí v destilované vodě byly řezy dobarveny Gillovým hematoxylinem, dehydratovány, projasněny a zamontovány pro mikroskopické zhodnocení.

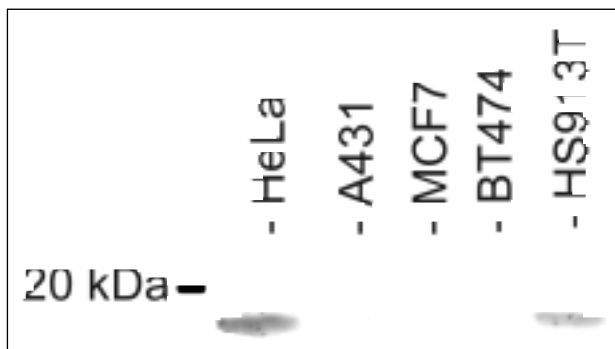
## Výsledky

Imunobloting na buněčných liniích (Obr. 1) ukázal přítomnost proteinu p16 (molekulová hmotnost 16-18 kDa) v buňkách HeLa (linie odvozená z cervikálního karcinomu s přítomností HPV) a v buňkách HS913T (osteosarkom s mutací Rb) a potvrdil specifitu použité protilátky proti studovanému proteinu. Na rozdíl od buněk HeLa a HS913T, linie odvozené z HPV negativního spinocelulárního karcinomu vulvy (A431), a mamárního karcinomu (MCF7 a BT474) nevykazovaly dle našeho předpokladu specifickou interakci s proteinem p16, který v daném buněčném systému není exprimován. Imunohistologicky (Tab. 1) byla difúzní a kompletní exprese proteinu p16 prokázána ve všech třiceti CIN III (Obr. 2, Obr. 3) a osmi spinocelulárních karcinomech (Obr. 4). CIN I-II byly částečně pozitivní v 7 případech (Obr. 5) a v adenokarcinomech byla exprese prokázána v jednom ze dvou případů (Obr. 6). V nepostíženém ekto- i endocervixu, včetně reaktivních změn (hyperplazie rezervních buněk, dlaždicová metaplazie), protein p16 nebyl prokázán.

## Diskuse

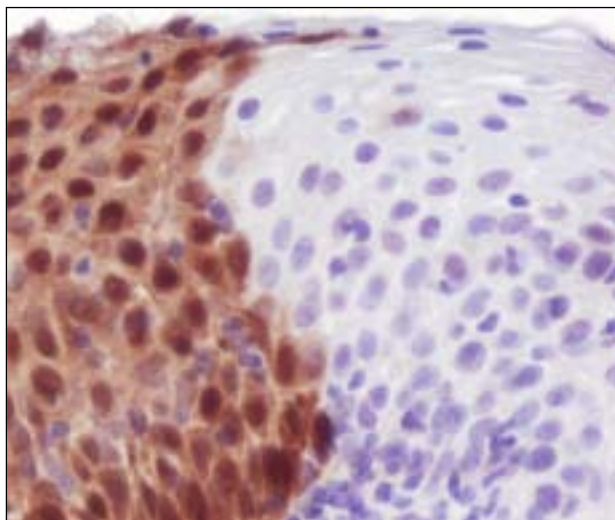
I přes úspěchy běžných screeningových programů vyvstávají otázky týkající se spolehlivosti konvenční cytologie a histologie čípku děložního. To zdůrazňuje potřebu zdokonalení screeningových metod a hledání použitelných markerů sdružených s progredientními prekancerózami jako doplňku ke kolposkopii a onkologické cytologii a histologii. Tyto postupy by měly

Obr. 1: Immunobloting p16 na lyzátech z buněčných linií.



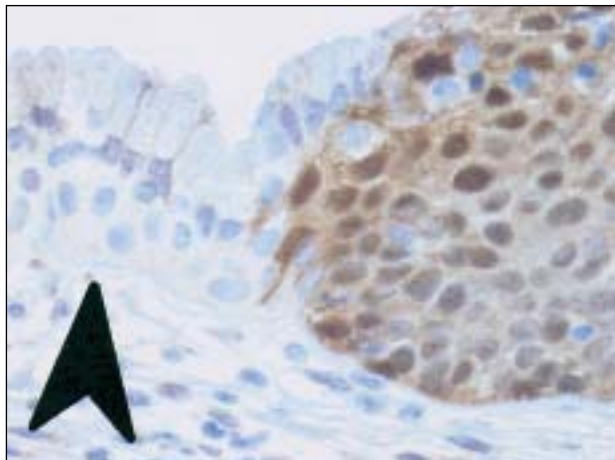
Pozitivita s protilátkou proti p16 v oblasti kolem 18kDa byla zřejmá v buňkách HeLa (inaktivace pRb papilomavirem) a HS913T (mutace Rb). Ostatní testované linie jsou p16 negativní.

Obr. 2: Imunohistologie p16 v CIN III.



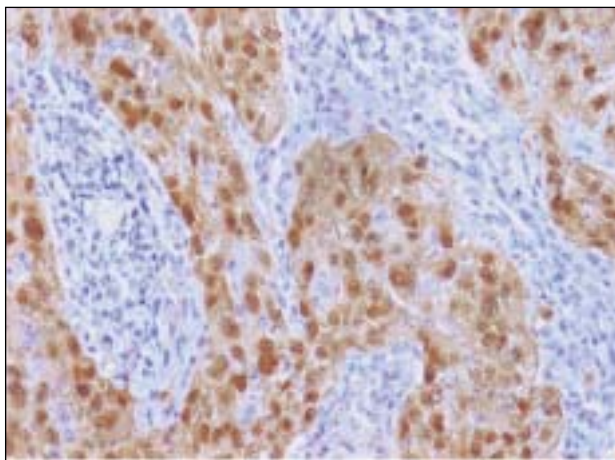
Atypický epitel CIN III (vlevo) je silně pozitivní ve všech buňkách, zatímco původní dlaždicový epitel (vpravo) je negativní.

Obr. 3: Imunohistologie p16 v CIN III.



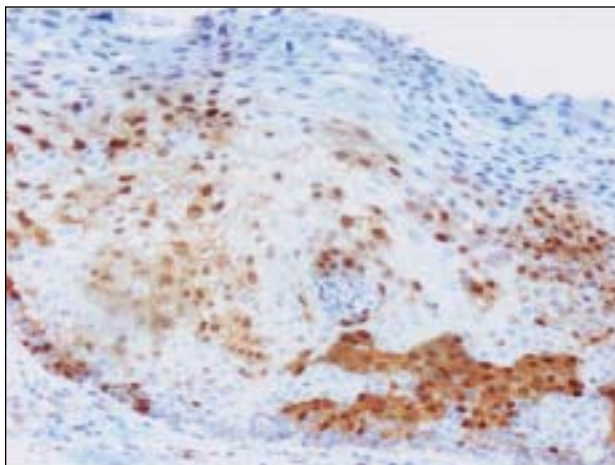
Atypický epitel CIN III (vpravo) je pozitivní, zatímco cylindrický epitel endocervixu (vlevo) je negativní, včetně hyperplastických rezervních buněk (šipka).

Obr. 4: Imunohistologie p16 ve spinocelulárním karcinomu čípku.



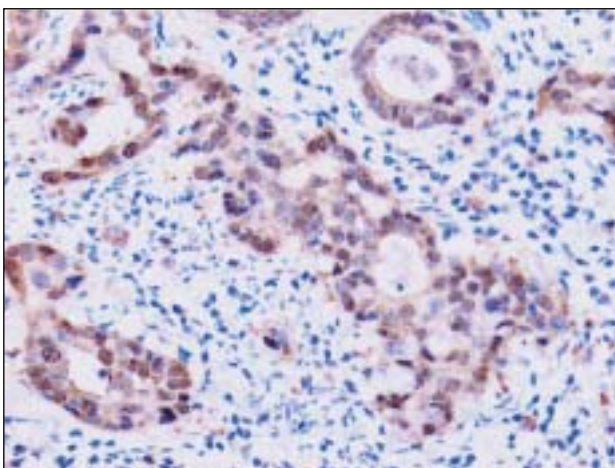
Nádorové buňky jsou silně pozitivní, stroma negativní.

Obr. 5: Imunohistologie p16 v CIN II/HPV.



Pozitivita p16 v atypickém epitelu je pouze ložisková.

Obr. 6: Imunohistologie p16 v adenokarcinomu hrdla.



Nádorové buňky jsou silně pozitivní, stroma negativní.

**Tab. 1: Expres p16 v dyspláziích, nádorech a normálních tkáních děložního čípku.**

Tkáň	P 16 pozitivní	P 16 negativní
Ektocervix	0	6
Endocervix	0	6
Hyperplazie rezervních buněk	0	2
Metaplastický epitel	0	4
CIN I-II	10	3
CIN III	30	0
Spinocelulární karcinom	8	0
Adenokarcinom	1	1

redukovat falešně pozitivní i negativní výsledky, v celkovém důsledku pak eliminovat nepotřebné kontroly a zákroky, snížit stresování pacientek i lékařů, případně přinést i finanční úspory ve screeningových programech.

Naše studie potvrdila slibnost využití zvýšené exprese proteinu p16 k tomuto účelu. Ve všech normálních cervikálních tkáních (vyšetřeny epiteliální, metaplastické, endocervikální reaktivní a zánětlivé okrsky) nebyla zjištěna reakce s monoklonální protilátkou proti proteinu p16. Naopak všechny případy CIN III a invazivní karcinomy čípku byly kromě jednoho adeno-

karcinomu silně p16 pozitivní. Výsledky imunoblotingu na buněčných liniích rovněž výrazně podporují hypotézu že p16 je zvýšeně exprimován v buňkách postrádajících funkční anti-onkogen Rb. V analogických studiích (9, 10) bylo prokázáno, že je dobře proveditelná i imunocytochemie proteinu p16 na tenkých nátěrech, a že všechny HPV pozitivní případy jsou i p16 pozitivní, včetně dysplazií cylindrického epitelu hrdla. Pro aplikaci stanovení proteinu p16 v histopatologické diagnostice připadá v úvahu diferenciální diagnostika vystupňovaných reaktivních změn epitelu oproti CIN II-III a vyšetření okrajů konizátů. V oblasti onkologické cytologie se nabízí imunocytochemická aplikace na rezervním materiálu z tekutých cytologických vzorků v diferenciální diagnostice náleží atypii nejistého významu, ke kontrole kvality screeningu a případně i k jeho automatizaci. Toto použití je však v českých podmínkách zatím problematické vzhledem k tomu, že současná úhrada onkologické cytologie zdravotními pojišťovnami nemůže pokrýt technologický přechod na „liquid based smears“. Teoreticky si lze představit dokonce i nahrazení klasické onkologické cytologie semikvantitativním stanovením proteinu p16 na imunoanalytickém principu (ELISA, případně proužkový test). Naše další práce bude zaměřena na prověření možností těchto aplikací.

**Poděkování:** Práce byla financována z výzkumného záměru MZ ČR č. 06526970501.

#### Literatura

1. Stoler MH.: Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. Arch Pathol Lab Med 2003; 127 (8): 935-9.
2. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU: Proof of Principle Study Investigators: A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. N Engl J Med 2002; 347(21): 1645-51.
3. Stoler MH.: New Bethesda terminology and evidence – based management guidelines for cervical cytology findings. JAMA 2002; 287(16): 2140-1.
4. Hubbard RA.: Human papillomavirus testing methods. Arch Pathol Lab Med 2003; 127 (8): 940-5.
5. Klaes R., Friedrich T., Spitkovsky D., Ridder R., Rudy W., Petry U., Dallenbach-Hellweg G., Schmidt D. and Von Knebel Doeberitz M.: Overexpression of p16INK4a as specific marker for dysplastic and neoplastic cells of the cervix uteri. Int. J Cancer 2001; 92(2): 276-284.
6. Rejthar A., Vojtěšek B.: Obecná patologie nádorového růstu. Grada Publishing 2002.
7. Helt AM., Galloway DA.: Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the RB family of pocket proteins. Carcinogenesis 2003; 24 (2): 159-69.
8. Bates S., Parry D., Bonetta L., Vousden K., Dickson C. and Peters G.: Absence of cyclin D/Cdk complexes in cells lacking functional retinoblastoma protein. Oncogene 1994; 9(6): 1633-1640.
9. Murphy N., Ring M., Killalea A.G., Uhlmann V., O'Donovan M., Mulcahy F., Turner M., McGuinness E., Griffin M., Martin C., Sheils O., O'Leary J.J.: p16 INK4a as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. J.Clin. Pathol. 2003; 56(1): 56-63.
10. Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ.: Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens. Acta Cytol 2002; 46(1): 25-29.