

SROVNÁNÍ DETEKCE HPV INFEKCE U KARCINOMU DĚLOŽNÍHO ČÍPKU POMOCÍ HYBRIDIZACE IN SITU A IMUNOHISTOCHEMICKÉHO PRŮKAZU PAPILOMAVIROVÉHO PROTEINU E6

HPV DETECTION IN CERVICAL CARCINOMA – AN IN SITU HYBRIDISATION OF DNA COMPARED TO HPV E6 PROTEIN IMMUNOHISTOCHEMISTRY

ANTON M.¹, LUKÁŠ Z.², NENUTIL R.³, REJTHAR A.⁴, VOJTĚŠEK B.⁵

¹ II. GYNEKOLOGICKO-PORODNICKÁ KLINIKA, FN BRNO

² II. PATOLOGICKO – ANATOMICKÝ ÚSTAV MASARYKOVY UNIVERSITY V BRNĚ, FN BRNO, DĚTSKÁ NEMOCNICE

³ ODDĚLENÍ PATOLOGIE, FN BRNO – PRACoviSTĚ PORODNICE

⁴ BIOPTICKÁ STANICE FN BRNO

⁵ ODDĚLENÍ BUNĚČNÉ A MOLEKULÁRNÍ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

Souhrn: Úvod: Lidské papilomaviry (HPV) se významně uplatňují v patogenezi cervikální intraepiteliální neoplazie a invazivního spinocelulárního karcinomu děložního čípku. Důležitým činitelem v tomto procesu by měla být zejména funkční inaktivace produktu antionkogenu p53 papilomavirovým proteinem E6. Předkládaná práce sleduje možnosti imunohistochemického průkazu proteinu E6 na materiálu s výskytem HPV infekce prokázaným in situ hybridizací. **Materiál a metody:** Srovnání in situ hybridizace virové DNA a imunohistochemického průkazu proteinu E6 HPV 16 a 18 bylo provedeno na parafrinovém biotickém materiálu od 36 pacientek, zahrnujícím 17 karcinomů a 19 dysplastických lézí CIN I-III. K hybridizaci byla použita standardní metodika (Biohit) s využitím screeningové (pan-HPV) sondy a typově specifických sond. Imunohistologie byla provedena pomocí monoklonální protilátky proti proteinu E6 HPV 16 a 18 s amplifikační reakce biotinylovaným tyramidem. **Výsledky:** In situ hybridizace se screeningovou sondou byla pozitivní u 35, tj. prakticky všech případů. V 19 z 21 blíže typizovaných případů se typy 16 a 18 vyskytly samostatně nebo kombinovaně s jiným typem. Imunohistochemický průkaz proteinu E6 byl úspěšný v 11 případech, a to výhradně HPV 16 nebo 18 pozitivních pomocí in situ hybridizace. **Závěr:** Imunohistologický průkaz papilomavirového proteinu E6 typů 16 a 18 je schůdný a s použitou protilátkou vysoce specifický. Senzitivita je však dosti nízká a je nutno použít detekční metodu s amplifikační signálu biotinylovaným tyramidem. Výsledek je však i tak zajímavý jednak jako částečná náhrada náročnějších hybridizačních metodik, jednak jako možný prognostický ukazatel stupně narušení odpovědi nádoru na radioterapii a chemoterapii zprostředkovanou p53 dependentní dráhou.

Klíčová slova: karcinom čípku, CIN, HPV, E6

Summary: *Introduction:* Human papillomaviruses (HPV) are involved in carcinogenesis of uterine cervical epithelium. Functional inactivation of p53 protein, which is mediated by the HPV protein E6, is thought to be an important feature of this process. We tested the immunohistochemical approach to demonstrate the HPV 16 and 18 E6 protein expression in cervical dysplasias and carcinomas with HPV presence detected by *in situ* hybridisation. *Material and methods:* The study was performed in paraffin embedded biopsy samples from 36 patients consisting of 17 cervical carcinomas and 19 dysplastic lesions ranging from CIN I to CIN III. The *in situ* hybridisation of HPV DNA was done using a commercial kit (Biohit), containing a screening (pan HPV) probe and single type specific probes. The monoclonal antibody against E6 of HPV types 16 and 18 was used for immunohistochemistry. The antibody detection was amplified using biotinylated tyramide. *Results:* The *in situ* hybridisation of pan-HPV probe was positive in 35 cases. The further evaluation of the HPV type was successful in 21 cases, 19 of them containing HPV 16 or 18. The E6 protein immunostaining was successfully detected in 11 cases, all of them being positive for the HPV 16 or 18 specific DNA sequences. *Conclusion:* The immunostaining of HPV 16 and 18 E6 protein is possible and can be highly specific. The sensitivity of this method is not completely satisfactory, despite of highly sensitive biotinylated tyramide detection used. The E6 immunohistochemistry might possibly replace *in situ* hybridisation methods in some instances. The level of E6 expression could be of interest as a marker estimating degree of derangement of p53-mediated cell response to radiotherapy and chemosensitivity of these carcinomas.

Key words: cervical carcinoma, CIN, HPV, E6

Teoretický úvod

V patogenezi karcinomu čípku existují tři hlavní známé mechanismy, z nichž dva souvisí s infekcí lidskými papilomaviry (HPV – human papilloma virus). Třetí je na papilomavirech nezávislý a souvisí s dalšími genetickými změnami (1). První příčinou je vliv exprese virových proteinů E6 a E7 a jejich interakce s proteiny, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu. Druhou příčinou je začlenění virové DNA do oblastí chromozomální DNA, které jsou zodpovědné za nádorový fenotyp. Třetí příčina je pak značně heterogenní. Objevuje se zde celá řada genomových změn, z nichž nejčastější je ztráta heterozygosity v chromozomálních oblastech

3p14-22, 4p16, 5p15, 6p21-22, 11q23, 17p13.3, 18q12-22 a 19q13, které jsou místy výskytu antionkogenu a již známých tak celé řady teoreticky předpokládaných. Velmi častou genetickou změnou je pak amplifikace oblasti 3q24-28, se kterou se setkáváme u 90% invazivních karcinomů čípku. Méně častými jsou mutace v rozdílných genech a mikrosatelitní nestabilita. S těmito jevy se setkáváme jen asi u 7% karcinomů čípku. Z celé řady studií je zřejmé, že vývoj karcinomů čípku je mnohastupňový proces při němž dochází k selekci celé řady genetických alterací. Identifikace genů zahrnutých v daném procesu a jejich vztah ke specifickým vlastnostem nádorů v jeho určitém vývojovém stádiu přispívá k přesnému chápání malignity

ního procesu u nádorů čípku a otvírá nové možnosti vývoje diagnostických i terapeutických přístupů.

Prognóza invazivních karcinomů čípku je nejvýrazněji ovlivněna stádiem onemocnění v okamžiku diagnózy. Mezi další důležité faktory, které prognózu ovlivňují patří hloubka invaze a histologický typ nádoru, stupeň diferenciace a invaze lymfatických a krevních cév. Doposud prováděné molekulární a imunohistochemické analýzy neprokázaly žádné onkogeny, antionkogeny a s nimi asociované proteiny, které by byly významným markerem prognózy tohoto onemocnění.

Potenciálně zajímavá je v tomto smyslu detekce lidských papilomavirů ať již na úrovni DNA nebo na úrovni exprese virových proteinů E6 a E7. Bylo opakovaně prokázáno, že lidské papilomaviry jsou úzce spjaty s vývojem cervikálních karcinomů. Rodina HPV obsahuje více jak 100 virových typů, které byly dosud identifikovány (2). Jedná se o poměrně malé DNA viry s genomem o velikosti 8kb, které jsou striktně vázány na epitel a to buď slizniční nebo kožní. DNA vysoce rizikových lidských papilomavirů (typu 16, 18, 31, 33 a 51) byla detekována přibližně u 90 – 95% cervikálních karcinomů (3, 4, 5). Kromě výskytu vysoce rizikových HPV se často setkáváme u cervikálních kondylomů i s výskytem HPV typu 6 a 11, které jsou označovány jako nerizikové, protože u čípků infikovaných tímto typem HPV dochází velmi zřídka k tvorbě nádoru. Výskyt vysoce rizikových forem HPV u převážně většiny pacientů s karcinomem děložního čípku je prokazován serologickými, histopatologickými a molekulárně biologickými metodami (virová DNA je detekovatelná v nádorové tkáni). Vzniklé nádory a z nich ustavené buněčné linie rovněž exprimují dva velmi důležité virové onkoproteiny E6 a E7. Ze získaných výsledků je zřejmé, že tyto onkoproteiny jsou zodpovědné za pokračující růst nádorových buněk (6, 7, 8). Jestliže hovoříme o klinickém významu transformační aktivity určitých HPV typů je nutné si uvědomit, že hlavním cílem virů je zabezpečit svou vlastní replikaci a na transformaci jimi vyvolanou se lze dívat spíše jako na chybu tohoto procesu. K pochopení normálního virového životního cyklu, vzniku chyb vedoucích k neoplastické transformaci a hledání nových potenciálních terapeutických přístupů je nutná detekce proteinů E6 a E7 a studium interakce těchto virových proteinů s buněčnými cílovými proteiny. *In vitro* studie prokázaly že protein E6 vysoce rizikových HPV tvoří komplex s geneticky intaktní formou proteinu p53 a je zodpovědný za jeho funkční inaktivaci a rychlou degradaci přes ubiquitinovou dráhu (9, 10). Výsledkem je porušení funkce proteinu p53 jako jeho aktivity spojené s kontrolou buněčného růstu a programovanou smrtí buněk při poruše integrity genomu. Zároveň protein E7 vysoce rizikových HPV interaguje s proteinem Rb, produktem retinoblastomového genu, a blokuje jeho antionkogenní funkci (11, 12). Porucha regulace buněčného cyklu a mechanismů střežení genomovou integritu je z obecného hlediska jedním z prvotních předpokladů vzniku malignity.

Velmi překvapivým je rozdílné chování vysoce rizikových (high-risk) a nerizikových (low-risk) HPV, protože lze předpokládat, že obě skupiny virů musí obejít stejné buněčné překážky, aby mohl proběhnout celý cyklus virové replikace. Příkladem rozdílné funkce u obou typů HPV je protein E6, který u vysoce rizikových virů efektivně interaguje s proteinem p53 zatímco u nerizikových virů tato interakce neexistuje. Dá se předpokládat, že rozdíly mezi těmito skupinami virů mohou být způsobeny místem jejich replikace. Všechny HPV infikují keratinocyty v bazální vrstvě epidermis, ale jsou schopny replikace pouze v epitelu, který proliferuje, protože pro svůj cyklus vyžadují replikaci buněčné DNA. Za daných podmínek viry musí vytvořit rovnováhu mezi stimulací replikace a inhibicí terminální diferenciace, případně apoptózy. Obě skupiny HPV se dají rozlišit podle místa jejich DNA replikace v maturujícím dlaždicovém epitelu (13). Replikace DNA HPV s nízkým rizikem probíhá převážně ve spodních vrstvách kde

keratinocyty stále procházejí buněčným dělením, zatímco vysoce rizikové HPV replikují svůj genom ve vyšších vrstvách epitelu kde se nacházejí keratinocyty za normálních okolností již terminálně diferencované. Pro vysoce rizikové HPV je tedy nezbytnou nutností stimulovat replikaci DNA v nepřirozeném prostředí a je tedy nutno aby jejich E7 protein efektivně moduloval indukci DNA syntézy (14, 15) a rovněž aby E6 protein efektivně inaktivoval funkce proteinu p53.

Cílem předkládané práce bylo srovnání detekce HPV infekce pomocí hybridizace in situ a imunohistochemického průkazu proteinu E6 a ověření možnosti jeho detekce pomocí komerčně dostupných protilátek s využitím amplifikace signálu biotinylovaným tyramidem.

Materiál a metody

Soubor pacientek

Do studie byl zařazen histopatologický parafinový materiál od 36 pacientek ve věku od 19 do 76 let. Studované vzorky byly získány z diagnostických excizi, konizátů, eventuálně z hysterektomií. Histopatologická diagnóza zahrnovala parakeratózu bez dysplazie (1 případ), CIN I (3 případy), CIN II (7 případů), CIN III (8 případů), dlaždicobuněčný karcinom (16 případů) a nediferencovaný karcinom (1 případ).

Imunohistochemická detekce proteinu E6

Rutinně připravené vzorky v parafinových blocích byly nakrájeny a přeneseny na silanizovaná skla, řezy odparafinovány a rehydratovány. Odmaskování antigenních epitopů bylo provedeno povařením vzorků v po dobu 2x5 minut v mikrovlnné troubě v 0.01M citrátovém pufru pH 6,0. Po promytí v destilované vodě byly z důvodu zablokování endogenní peroxidázy řezy přeneseny na dobu 20 minut do 1% roztoku H₂O₂ v PBS (fyziologický roztok, pufovaný fosfátem na pH 7,4). Nespecifická vazebná aktivita byla zablokována převrstvením řezů roztokem 5% nízkotučného mléka s 0.01% Tween 20 v TBS (fyziologický roztok pufovaný Tris na pH 7,6). Takto zablokované řezy byly osušeny, a byla na ně na jednu hodinu při pokojové teplotě aplikována monoklonální protilátka (C1P5, Santa Cruz) rozlišující protein E6 papilomavirů 16 a 18, ředěná 1:50 (na 2μg/ml) v TBS s 1% obsahem BSA (bovinního sérového albuminu). Po trojím promytí roztokem 0.01% Tween 20 v PBS byla na 30 minut nanesena anti-mýší sekundární protilátka značená biotinem (Amersham) ředěná 1:200 v roztoku 1% BSA v TBS. Po opakovaném trojím promytí roztokem 0.01% Tween 20 v PBS byl na dobu 30 minut aplikován avidin-peroxidázový komplex (Vector-Elite). Po následném trojím promytí roztokem 0.01% Tween 20 v PBS byl aplikován na dobu 10 minut amplifikační systém (biotinylovaný tyramid) ředěný 1:50 v pracovním roztoku (DUPONT). Po trojím promytí roztokem 0.01% Tween 20 v PBS následovalo znovu nanesení komplexu avidin-peroxidáza na dobu 30 minut. Peroxidáza byla pak následně detekována pomocí 0,01% DAB (diaminobenzidinu) v PBS s 0,03% H₂O₂. Řezy bylyobarveny hematoxylinem, dehydratovány, projasněny a zamontovány pro mikroskopické zhodnocení.

Stanovení infekce HPV

Biohit HPV in situ skrining test byl využit pro detekci DNA lidského papilomaviru v parafinových vzorcích tkání metodou in situ hybridizace.

Rutinně připravené vzorky v parafinových blocích byly nakrájeny a přeneseny na silanizovaná skla, řezy odparafinovány a rehydratovány. Metoda hybridizace in situ byla provedena s využitím komerčně dostupného kitu od firmy Biohit a hybridizace in situ provedena dle doporučeného firmního manuálu. Pro skriningové stanovení infekce HPV byla využita DNA proba, která se váže na DNA všech HPV bez rozlišení typu viru. V případě její pozitivity byla dále provedena typizace HPV dalšími sondami umožňujícími specifickou detekci DNA lidského papilomaviru typů 6, 11, 16, 18, 31 a 33.

Na souboru 36 pacientek se stanovenou diagnózou dlaždicobuněčný karcinom (16 případů), nediferencovaný karcinom (1 případ), parakeratóza (1 případ) a CIN I – CIN III (18), jsme analyzovali HPV infekci pomocí hybridizace *in situ* a tuto korelovali s expresí proteinu E6. S využitím screeningové testovací sady od firmy Biohit se nám podařilo detekovat HPV infekci u 35 pacientek a 1 pacientka byla na výskyt HPV negativní (tabulka I, obrázek 1). Předcházející metodou jsme určili výskyt HPV infekce bez stanovení přesného typu viru. K bližšímu určení HPV jsem využili typizační sadu téže firmy, která nám umožnila přesné stanovení typu DNA HPV 6, 11, 16, 18, 31 a 33 (obrázek 2). Ve 21/35 (60%) případech byla typizace úspěšná a podařilo se nám nalézt alespoň jeden z výše uváděných typů. U 14 pacientek se nám podařilo prokázat typ 16, v pěti případech typ 18, ve čtyřech případech typ 33, ve

dvou případech typ 6, typ 11 a typ 31. Současný výskyt 16 a 18 jsme nenalezli u žádné z pacientek, kombinaci typů 16 a 18 u dvou pacientek. Kombinace typů 16 a 33, 16 a 31 i nalezeny ve dvou případech a v jednom případě jsme našli kombinaci typů 11 a 31. Jedna pacientka měla kombinaci typů 16, 31 a 33. U 15 pacientek se nám nepodařilo stanovit HPV viru, přestože jsme výskyt HPV prokázali screeningovou sondou. Výskyt HPV 16 a 18 byl u 19 pacientek a z toho v 11 (58%) případech imunohistochemická detekce proteinu E6 kopírovala výskyt HPV 16 a 18 (obrázek 3, obrázek 4). (42%) případech nebyla hladina E6 detekována. Situace k nebyl potvrzen výskyt HPV 16 a 18 nebyly pozitivní s protilátkou rozlišující E6 protein v žádném z případů. Typizace HPV a imunohistochemická detekce jsou rovněž dokumentovány na obrázcích 1 a 2.

Srovnání HPV infekce pomocí hybridizace *In Situ* a imunohistochemické detekce proteinu E6.

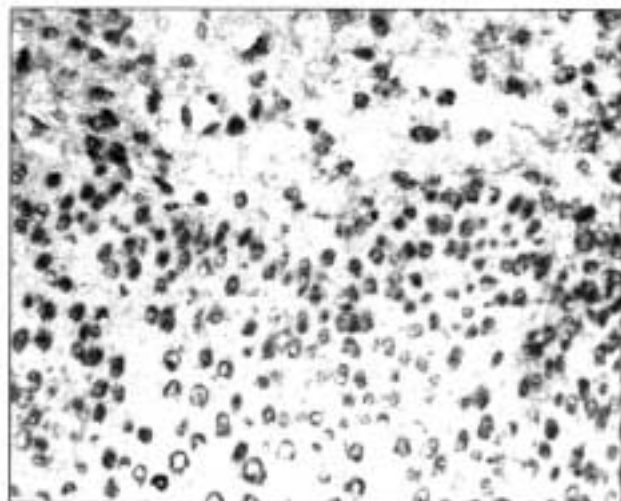
Pacient	Věk	Diagnóza	HPV scr	HPV typ	E6
1	22	kondylom, CIN I	+	16	+
2	37	CINII	+	-	-
3	40	dlaždicobuněčný karcinom	+	-	-
4	37	dlaždicobuněčný karcinom	+	16	+
5	38	CINII	+	16	-
6	30	CINII	+	16	+
7	33	dlaždicobuněčný karcinom	+	6, 18	+
8	30	CINII	+	-	-
9	52	dlaždicobuněčný karcinom	+	11	-
10	76	dlaždicobuněčný karcinom	+	-	-
11	39	CINII	+	16	+
12	37	CINII	+	-	-
13	40	dlaždicobuněčný karcinom	+	-	-
14	37	dlaždicobuněčný karcinom	+	16	-
15	38	CINIII	+	16	-
16	56	dlaždicobuněčný karcinom	+	16	-
17	42	dlaždicobuněčný karcinom	+	16, 31, 33	-
18	32	parakeratóza	+	18	+
19	31	CINI	+	-	-
20	51	dlaždicobuněčný karcinom	+	18	-
21	35	dlaždicobuněčný karcinom	+	16	+
22	35	CINIII	+	-	-
23	31	CINIII	+	-	-
24	40	dlaždicobuněčný karcinom	+	16, 33	+
25	28	CINII	+	-	-
26	39	CINII	+	-	-
27	48	dlaždicobuněčný karcinom	+	16, 33	-
28	48	dlaždicobuněčný karcinom	+	16, 31	-
29	44	CINIII	+	-	-
30	33	dlaždicobuněčný karcinom	+	6, 18	-
31	70	dlaždicobuněčný karcinom	+	-	-
32	29	CINIII	+	-	-
33	34	CINII	+	-	-
34	19	CINII	+	16	+
35	22	CINI	+	11, 33	-
36	38	dlaždicobuněčný karcinom	+	18	-

HPV scr: testování HPV infekce pomocí kitu „Biohit HPV *In Situ* Screening test“
 HPV typ: typizace HPV pomocí kistu „Biohit HPV *In Situ* Typing Test“
 E6: imunohistochemická detekce proteinu E6 pomocí protilátky CIP5 (Santa Cruz).

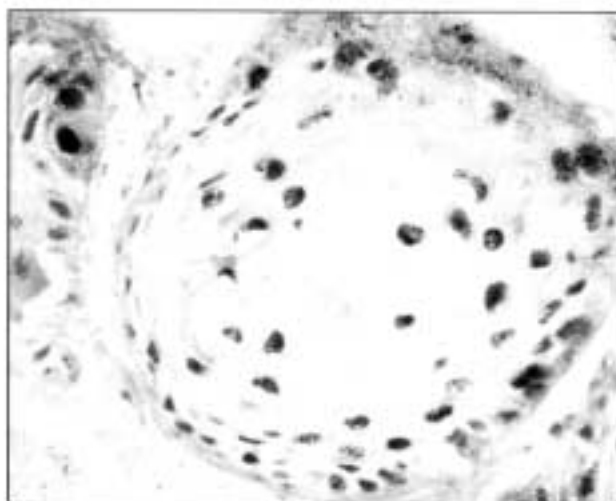
Diskuse

Karcinom čípku děložního je druhým nejčastěji se vyskytujícím typem nádorů u žen v celosvětovém měřítku a existující epidemiologické studie jednoznačně prokázaly, že příčinou vzniku této maligní transformace jsou sexuálně přenášené HPV (16). Schopnost vysoce rizikových HPV vyvolat maligní progresy čípku děložního závisí na expresi proteinů E6 a E7, které jsou odpovědné za inaktivaci proteinu p53 (E6) a E7, které jsou odpovědné za inaktivaci proteinu p53 a retinoblastomového genu. Protein E6 vysoce rizikových HPV je především zodpovědný za inhibici biologických aktivit proteinu p53, mezi něž patří i) blok v G1 fázi buněčného cyklu, ii) transaktivace genové exprese a iii) proces apoptózy. Inaktivace všech výše jmenovaných funkcí antionkogenu p53 má za následek poruchu regulace genomové integrity a umožňuje vznik karcinomu čípku děložního.

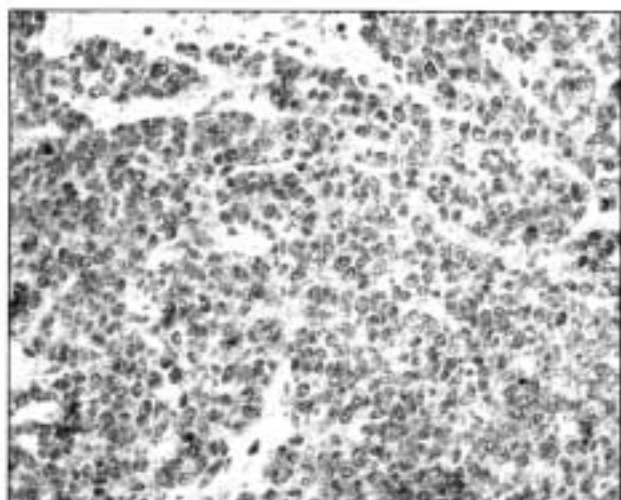
Detekce HPV infekce je v současné době běžně prováděna pomocí hybridizace *in situ* a PCR technik, které jsou zaměřeny na detekci virové DNA jak ve stěrech, tak rovněž v tkáňovém materiálu. Metodická a finanční náročnost výše jmenovaných technik je činí nedostupnými pro většinu rutinních laboratoří a je tedy vhodné se snažit o zavedení jejich levnějších a snadnějších alternativ, které by měly obdobnou výpovědní hodnotu. V současné době přitom existuje velmi málo údajů o expresi proteinu E6 z integrované HPV DNA, protože většina prací se zabývá pouze detekcí virové DNA pomocí srovnání exprese proteinu E6 a detekci HPV pomocí hybridizace s cílem srovnat výpovědní hodnotu obou metodik. Výsledky potvrdily výskyt proteinu E6 u 58% pacientek pozitivních na HPV 16 a 18. Ve zbývajících 42 procentech nebylo možno protein E6 imunohistochemicky prokázat, přestože se nám podařilo metodou hybridizace *in situ* stanovit výskyt HPV 16 a 18. Hladina proteinu E6 doposud nebyla uspokojivě analyzována pomocí imunohistochemických metod na rozsáhlých souborech nádorového materiálu, přestože by tyto údaje mohly být velmi zajímavé z hlediska možné predikce odpovědi na radioterapii a chemoterapii vzhledem k interakci proteinu E6 s mechanismem zastavujícím buněčné dělení, případně indukujícím apoptózu po genotoxickém inzultu. Příčinou může být jak nedostupnost kvalitních protilátek s vysokou afinitou k proteinu E6 vysoce rizikových HPV, tak velmi nízká hladina proteinu E6 v nádorových buňkách (17). Výskyt nízké hladiny proteinu E6 v HPV pozitivní nádorové tkáni a buněčných liniích je podpořena výsledky, které jednoznačně prokazují velmi nízkou hladinu mRNA kodující kompletní E6 protein (18, 19). Z těchto poznatků jednoznačně vyplývá, že pro imunohistochemické studie je nutno požit pouze protilátky s vysokou afinitou proti proteinu E6 a speciální amplifikační metodu, která je popsána v metodice. Nedetekovatelnou hladinu E6 proteinu u 42% případů v našem souboru lze tedy vysvětlit výše popisovanými problémy. Při imunohistochemické studii jsme použili de facto jediné komerčně dostupné protilátky proti proteinu E6 HPV typů 16 a 18 (ten-



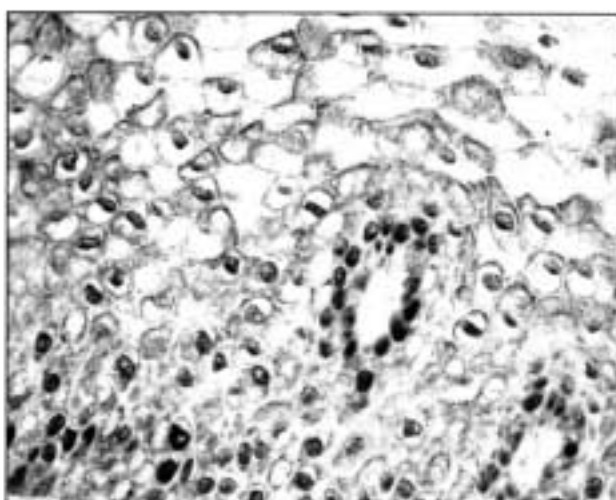
Obrázek 1: In situ hybridizace – HPV screening u spinocelulárního karcinomu (400x).



Obrázek 2: In situ hybridizace – HPV 18 detekovaný u spinocelulárního karcinomu (400x).



Obrázek 3: Imunohistologie – protein E6 detekovaný protilátkou C1P5 u spinocelulárního karcinomu (400x).



Obrázek 4: Imunohistologie – protein E6 detekovaný protilátkou C1P5 u CIN I (400x).

tyž hybridom je rovněž v nabídce firmy Oncogene Science, jiné firmy protilátky proti E6 proteinu nenabízí). V našem souboru jsme nenalezli jediný případ kdy bychom protein E6 detekovali v případě, že nebyl prokázán výskyt DNA HPV 16 nebo 18, což svědčí o její vysoké specificitě, senzitivitu a afinitu je však nemožné spolehlivě hodnotit. Kombinovaný výskyt jednotlivých typů HPV je rovněž v souladu s publikovanými údaji jak po stránce typů HPV tak jejich procentuálního zastoupení (20). U 14(40%) případů, kde nebyl stanoven typ HPV, lze předpokládat výskyt HPV jejichž typizační sondy nebyly k dispozici v naší používané typizační sadě. Nemusí se tedy jednat o nedostatečnou citlivost metody hybridizace *in situ*. Ze získaných výsledků jednoznačně vyplývá, že kombinací několika protilátek rozlišujících různé epitopy proteinu E6

s vyšší afinitou a amplifikační metody by mělo být možné protein E6 detekovat v buňkách infikovaných HPV 16 a 18. Detekce proteinu E6 by pak mohla sloužit jako jednoduchý test na výskyt dvou vysoce rizikových HPV, který by v některých aplikacích nahradil doposud používané techniky detekce virové DNA. Sledování exprese tohoto proteinu, který je zodpovědný za inaktivaci antionkogenu p53, a stanovení jeho hladiny v nádorových buňkách, by mohlo rovněž přispět k využití tohoto proteinu jako potenciálního markeru odpovědi nádoru na radioterapii, případně genotoxickou chemoterapii.

Podpora grantů: Tato práce byla podporována IGA MZ ČR číslo 4256-3 a 4783-3.

Literatura:

1. Lazo P.A.: The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br. J. Cancer* 80, 1999, 2008-2018.
2. de Villiers E.M., Lavergne D., McLaren K., Benton E.C.: Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *Int J Cancer* 73, 1997, 356-361.
3. Lorincz A.T., Temple G.F., Kurman R.J., Jenson A.B., Lancaster W.D.:

Oncogenic association of specific human papilloma-virus types with cervical neoplasia. *J. Nat. Cancer Inst.* 79, 1987, 671-677.

4. Das B.C., Sharma J.K., Gopalkrishna V., Das D.K., Singh V., Gissmann L., Zur Hausen H., Luthra U.K.: A high frequency of human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinomas of Indian women as revealed by Southern blot hybridization and polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 36, 1992, 239-245.

5. Schoell W.M., Janicek M.F., Mirhashemi R.: Epidemiology and biology of cervical cancer. *Semin. Surg. Oncol.* 16, 1999, 203-211.
6. Schwarz E., Freese U.K., Gissmann L., Mayer W., Roggenbuck B., Stremmel A., zur Hausen H.: Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314, 1985, 111-114.
7. Androphy E.J., Hubbert N.L., Schiller J.T., Lowy D.R.: Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *EMBO J* 6, 1987, 989-992.
8. Banks L., Matlashewski G., Pim D., Churcher M., Roberts C., Crawford L.: Expression of human papillomavirus type 6 and type 16 capsid proteins in bacteria and their antigenic characterization. *J Gen Virol* 68, 1987, 3081-3089.
9. Werness B.A., Levine A.J., Howley P.M.: Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248, 1990, 76-79.
10. Scheffner M., Werness B.A., Huibregtse J.M., Levine A.J., Howley P.M.: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1990, 1129-1136.
11. Banks L., Barnett S.C., Crook T.: HPV-16 E7 functions at the G1 to S phase transition in the cell cycle. *Oncogene* 5, 1990, 833-837.
12. Zur Hausen H.: Molecular pathogenesis of cancer of the cervix uteri and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 186, 1994, 131-156.
13. Doorbar J., Foo C., Coleman N., Medcalf L., Hartley O., Prospero T., Napthine S., Sterling J., Winter G., Griffin H.: Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology* 238, 1997, 40-52.
14. Sato H., Furuno A., Yoshiike K.: Expression of human papillomavirus type 16 E7 gene induces DNA synthesis of rat 3Y1 cells. *Virology* 168, 1989, 195-199.
15. Banks L., Edmonds C., Vousden K.H.: Ability of the HPV16 E7 protein to bind RB and induce DNA synthesis is not sufficient for efficient transforming activity in NIH3T3 cells. *Oncogene* 5, 1990, 1383-1389.
16. Zur Hausen H.: Human genital cancer: Synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events. *Lancet* 18, 1982, 1370-1372.
17. Butz K., Shahabuddin L., Geisen C., Spitkovsky D., Ullmann A., Hoppe-Seyler F.: Functional p53 protein in human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene* 10, 1995, 927-936.
18. Schneider-Gadicke A., Schwarz E.: Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J* 5, 1986, 2285-2292.
19. Bohm S., Wilczynski S.P., Pfister H., Iftner T.: The predominant mRNA class in HPV16-infected genital neoplasias does not encode the E6 or the E7 protein. *Int J Cancer* 55, 1993, 791-798.
20. Tachezy R., Hamsikova E., Hajek T., Mikyskova I., Smahel M., Van Ranst M., Kanka J., Havrankova A., Rob L., Guttner V., Slavik V., Anton M., Kratochvil B., Kotrsova L., Vonka V.: Human papillomavirus genotype spectrum in Czech women: correlation of HPV DNA presence with antibodies against HPV-16, 18, and 33 virus-like particles. *J Med Virol* 58, 1999, 378-386.

informace

Dovolujeme si Vás pozvat na konferenci
ADJUVANTNÍ TERAPIE KARCINOMU PRSU PO ROCE 2000
 konanou dne 11. října 2000 od 10.00 hod.

pořádá
 Onkologická klinika VFN 1. LF UK v Praze, posluchárna na ORL klinice

Konference bude spojena se setkáním řešitelů studie ATLAS

Setkání pořádá Onkologická klinika VFN 1. LF UK a Early Breast Cancer Collaborative Group

Program:

Richard Peto, Christina Davies: *Overview of the world-wide evidence on tamoxifen, ovarian ablation, polychemotherapy, and radiotherapy*

Richard Peto: *Implications of the Overview for the ATLAS trial*

Christina Davies: *Progress of the ATLAS trial world-wide*

Luboš Petruželka: *Overview of ATLAS in Czech republic*

Předpokládané ukončení setkání v 16.00 hod.

Sponzor akce: **ASTRA ZENECA**

Přihlášku k účasti zasílejte do 30. září 2000

na adresu: Onkologická klinika VFN 1. LF UK, U nemocnice 2, 128 08 Praha 2, faxem: (02) 2492 1716, e-mailem: tomdag@vfn.cz