

# A HPV-fertőzés hatása a sejtciklus szabályozására a méhnyak laphámelváltozásaiban: immunhisztokémiai és *in situ* hibridizációs megfigyelések

SZENTIRMAI ZOLTÁN

Országos Onkológiai Intézet, Daganatpatológiai Központ, Budapest

**Levelezési cím:**

Dr. Szentirmai Zoltán, Országos Onkológiai Intézet,  
1122 Budapest, Ráth Gy. u. 7–9. E-mail: szentirmai@oncol.hu,  
szentirmai.z@gmail.com, tel.: 06-20-219-6480

**Közlésre érkezett:**

2018. augusztus 21.

**Elfogadva:**

2018. november 25.

A HPV16 E6 génje genomba integrálódott DNS-ének kópiaszámát vizsgáltuk CIN3-ban és méhnyakrákban nem fluoreszcens *in situ* hibridizáció és *in situ* PCR módszerrel. Továbbá a p16, p21 és p27 fehérjék immunhisztokémiai kimutatásával azt is bemutatni kívántuk, hogy a HPV okozta genetikai károsodás hogyan zavarja meg a sejtciklus működését a gazdasejtben. CIN1-ben a sejt koilocitáson átalakul, de a sejtciklus nem károsodik, a p16 nem expresszálódik. A p21 csak a koilociták alsó szélénél szaporodik fel. A p27 a koilocitákban dúsul fel és kifejeződik a limfocitákban is. CIN2/3-ban egy kópia HPV16 E6 DNS integrálódik a gazdasejt genomjába. Mindez kiváltja a p16, p21 és p27 fehérjék fokozott expresszióját, amelyek megváltoztatják a gazdasejt sejtciklusának működését. CIN3-ban a p21 fehérje csak a kóros hám felső kétharmadának sejtjeiben jelenik meg és minimális differenciációt idéz elő, a p27 fehérje a súlyosan atipusos sejtekből felépülő laphám egysoros bazális sejtjeiben nagy mennyiségben szaporodik fel, hogy a sejtek ciklusba lépését blokkolja. *Magy Onkol* 62:264–271, 2018

**Kulcsszavak:** CIN3, HPV16-kópiaszám, p16-, p21-, p27-immunhisztokémia, sejtciklus

*The HPV16 E6 DNA incorporation into the cervical epithelial cell genome was determined. In addition, using p16, p21 and p27 protein immunohistochemistry, we intended to present how the normal cell cycle machinery was disturbed in cervical epithelial cells. In CIN1 the epithelial cells are transformed into koilocytes, p16 is not expressed. p21 is only visible over the parabasal cell layers, while p27 manifests in koilocytes and lymphocytes. In CIN2/3, one copy of HPV16 DNA is integrated in the epithelial cell genome. In CIN3, p16 is expressed in great quantities, while p21 can be seen in the upper 2/3 segment of cervical epithelium causing minimal cell differentiation. p27 is highly expressed in the basal cells of stratified epithelium blocking the autonomous proliferation phases of the cell cycle.*

Szentirmai Z. Influence of HPV infection on cell cycle regulation in epithelial cell alterations of cervix uteri: Immunohistochemical and *in situ* hybridization observations. *Magy Onkol* 62:264–271, 2018

**Keywords:** CIN3, HPV16 copy number, p16, p21, p27 immunohistochemistry, cell cycle

**Rövidítések:**

**CDK:** ciklindependens kináz, **CDKI:** ciklindependens kináz inhibitor, **CIN:** cervikális intraepiteliális neoplázia, **HPV:** humán papillómavírus, **HR:** magas rizikójú (high risk), **HSIL:** magas rizikójú laphám intraepiteliális lézió, **L1 GÉN:** HPV nagy burokfehérjét kódoló gén, **IACR:** International Agency for Cancer Research, **LR:** alacsony rizikójú (low risk), **LSIL:** alacsony rizikójú laphám intraepiteliális lézió, **PCR:** polimeráz láncreakció, **RB:** retinoblasztóma, **TCGA:** The Cancer Genome Atlas

**BEVEZETÉS**

A humán papillómavírus (HPV) perzisztáló fertőzése 95%-ban a cervikális intraepiteliális neoplázia (CIN) és a méhnyakrák okozója (1). A HPV mintegy 8000 nukleotid hosszú, gyűrű alakú DNS-vírus, amelynek több mint 100 altípusa ismert, és ebből legfeljebb 40  $\alpha$ -genotípus képes a genito-anális régiót megfertőzni (2). Ismert, hogy a méhnyak legtöbb HPV-fertőzése hónapok alatt megszűnik, de néhány esetben a fertőzés perzisztál, és ha a vírus bejut a méhnyaklaphámsejtek citoplazmájába, koilocitózist (CIN1, LSIL) okoz, de ekkor még nincs daganatkeltő hatása. Ha a HPV-DNS már integrálódott a gazdasejt DNS-ébe, CIN2/3 alakul ki, és ekkor onkoproteinjeinek fő hatása, hogy inaktíválják a gazdasejt p53 és RB génjeit, amelyek a genomiális károsodások kijavításáért felelősek. Onkogén HPV-fertőzés esetén a szuppresszorgének inaktívációja következhet be és a gazdasejtben genetikai instabilitás alakul ki a mutációk halmozódásával a genomban, ami végül a méhnyakrák kialakulásához vezet (3).

Az L1 gén DNS-szekvenciája alapján a genetikailag rokon HPV-típusok elkülönülő alcsoportokat alkotnak, melyeknek csak egy kisebb része okoz daganatot. Legutóbb az IACR Working Group foglalkozott a HPV-rizikó csoportokkal, és a genetikai hasonlóság, valamint a méhnyakrákban előforduló gyakoriság alapján új HPV-csoportosítást javasolt (4). E szerint döntően 20 HPV-típus lehet felelős a méhnyakrák kialakulásáért. Az onkogén HPV-típusokat a méhnyakrákban való előfordulási gyakoriságuk alapján négy kategóriába lehet beosztani: (i) 1A csoport, karcinogén HPV-k, (ii) 2A valószínűleg karcinogén (HPV68), (iii) 2B csoport, lehetséges, hogy karcinogén HPV-k, (iv) HPV-típusok, amelyek filogenetikailag analógok a karcinogén HPV-típusokkal, de daganatkeltő hatásuk jelenleg nincs kimutatva (5).

A „The Cancer Genome Atlas” (TCGA) projekt keretében a konzorcium részletesen analizálta 228 invazív méhnyakrák genetikáját a lehetséges terápiás markerek azonosítása céljából (6). A 95%-ban HPV-pozitív méhnyakrákokban tizennégy gén mutációját találták, amelyek közül 9 génmutáció korábban is ismert volt, míg 5 génmutációt új felismerésként írtak le. Ezek a mutációk a szignálok és a sejtciklus működését úgy befolyásolták, hogy méhnyakrák alakult ki. A talált genetikai eltérések típusai a következők:

a) Szomatikus mutációk: missense, nonsense, silent, non-coding, splice site, nonstop, frameshift indel, in-frame indel; lásd a hivatalos mutációs nomenklatúrát (7).

b) Génpromoter (CpG-sziget) hipermetiláció, génkópiaszám-változás, mRNS- és miRNS-, valamint többféle szignálútelterés.

A TCGA konzorcium a vizsgált méhnyakrákok 5%-át HPV-negatívnak találta. A HPV-negatív méhnyakrákokban a genetikai eltérések különböznek a HPV-pozitív tumoroktól és az egyéb tumorokra jellemző KRAS-, ARID1A- és PTEN-génkárosodások a gyakoriak.

A rákmegelőző állapotokban talált HPV-gyakoriságokra vonatkozó saját megfigyeléseink (8) összehasonlítva a méhnyakrákban előforduló HPV-típusok gyakorisági eloszlásával (5) azt mutatják, hogy elsősorban az 1A filogenetikai csoportba tartozó magas rizikójú karcinogén HPV-típusok okoznak méhnyakrákot. Ezért nem fluoreszcens *in situ* hibridizáció és *in situ* PCR módszerrel vizsgáltuk a HPV16 E6 DNS kópiaszámát CIN3-ban és invazív méhnyakrákban, továbbá a p16, p21 és p27 immunhisztokémiai vizsgálatával azt kívántuk bemutatni, hogy a HPV okozta genetikai károsodás hogyan zavarja meg a sejtciklus működését különböző súlyosságú CIN-ben és karcinómában. Ezzel további adatokat kívántunk szolgáltatni a HPV-fertőzés malignus transzformációt okozó hatásának jobb megértéséhez.

**BETEGMINTÁK ÉS MÓDSZEREK****HPV-típezés és genetikai csoportosítás**

A HPV-típezést a Linear Array HPV Genotyping Test (Roche) segítségével a gyártó utasításai szerint rutin cervixcitológiai mintákon végeztük. Az alábbi típusokat különböztettük meg: HPV6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 és CP6108.

A HPV-típusok genetikai csoportosítása úgy történt, hogy a HPV-DNS-adatbázisból kikerestük a humán fertőzést okozó vírusok L1 génjeinek szekvenciáit és a HIBIO DNASIS, Hitachi DNA Sequence Analysis System segítségével egymással összehasonlítottuk. Az eredmények bemutatásánál a Bernard és mtsai (2) által ajánlott rendszertani osztályozás elnevezéseit vettük át. Az immunhisztokémiai és a HPV-DNS sejten belüli kimutatásához legalább 10-10 különböző beteg előzőleg diagnosztizált szövettani mintáit használtuk.

**Immunhisztokémia**

A p16 (CINtec p16 Histology, Clone EGH4, Ventana) kimutatását és a reakció láthatóvá tételét ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit segítségével, Ventana Benchmark Ultra immunhisztokémiai automatában végeztük. A p21 (Dako, Clone SX118) és p27 (Dako, Clone SX53G8) sejtciklusfehérjék immunhisztokémiai reakciója a gyártó javaslata szerint, vizualizációja EnVision+ kittel történt.

**HPV-kimutatás szövettanban**

A HPV-DNS *in situ* kimutatását olyan szövettanmintákon végeztük, amelyeknél előzőleg a HPV-típezést Linear Array HPV Genotyping Test adta meg, amelyet szövettani minták izolált DNS-én is alkalmazhatónak találtunk.

**In situ PCR:** Méhnyakrák formalinfixált, paraffinba ágyazott szövettani metszetéből általunk kidolgozott módszerrel izolált sejtmagokon végeztük. A sejtmagizolálás lépései: három darab 10–30 µm vastag metszetet Eppendorf-csőben deparaffináltunk, majd leszálló alkoholsorban és desztillált vízben rehidráltunk. Ezt követően a szöveteket fiziológiás NaCl-ban oldott, 2 mg/ml koncentrációjú pepszinnel (Sigma) 37 °C-on emésztettük. A megfelelő emésztési időt (átlagosan 20–30 perc) minden egyes mintánál többszöri próbálkozással állítottuk be. Enzimemésztés után rövid centrifugálás következett, majd az emésztetlen szövettörmelékét csipesszel kiszedtük a tubusból, a maradék sejtszuspenziót 8000 g fordulaton 7-8 percig centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk, az üledéket kétszer mostuk PBS-ben és ebből 10 µl-t Superfrost plus tárgylemezre cseppentve kenetet készítettünk, amit 65 °C-on 10 percig szárítottunk. Az *in situ* PCR a GeneAmp In Situ PCR Core Kit (Perkin Elmer) felhasználásával, a gyártó utasításait figyelembe véve történt. A HPV16 E6-specifikus PCR-primerek a következők: forward: 5'-GAGGTATATGACTTTGCTTTTCG-3' (Tm 61,5°), reverse: 5'-TC-TACGTGTTCTTGATGATCTGC-3' (Tm 62°). Ezeket az oligonukleotid egyszálú PCR-primereket Photoprobe Biotinnal (Vector Laboratories) jelöltük a gyártó utasításai szerint. A biotinilálás határfokát úgy teszteltük, hogy a primereket nitrocellulóz filterhez rögzítettük és avidin-biotinilált alkalikus foszfatáz komplex (Vector Laboratories) segítségével tettük láthatóvá (9, 10). Ezt követően a próbák már használhatóak voltak a genomba integrálódott HPV16-DNS kimutatására méhnyakrákban. Az eljárás során AmpliTaq DNA Polymerase, IS (Hoffmann-La Roche) enzimet használtunk és 20 PCR-ciklust végeztünk.

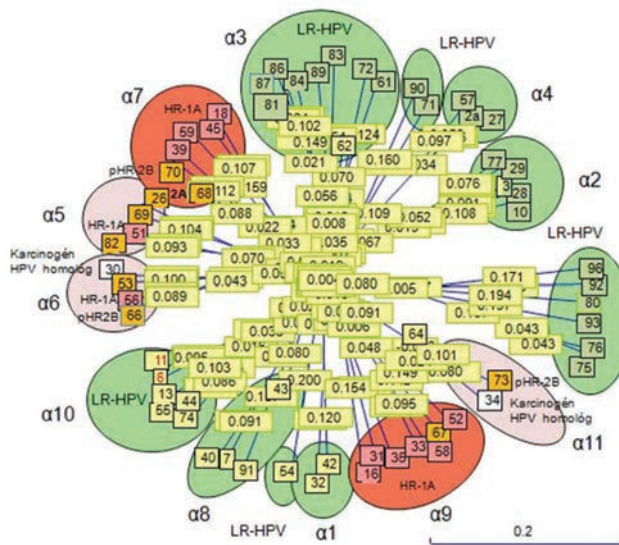
**Nem fluoreszcens in situ hibridizáció:** A vizsgálat CIN3 HPV16-pozitív méhnyakelváltozások rutin szövettani metszetén történt (9). A szövettani metszetek permeabilizálását 37 °C-ra előmelegített metszeteken 2 mg/ml koncentrációjú pepszinnel végeztük. A legkedvezőbb emésztési időt minden mintánál többszöri próbálkozással egyedileg határoztuk meg. Pepszines emésztés után RNáz-os emésztés és ezt követően hideg paraformaldehiddel utófixálás történt a szöveti DNS stabilizálása céljából. Az *in situ* hibridizációnál ugyanazt a fotobiotinnal jelölt oligonukleotid egyszálú HPV16 E6-specifikus DNS-primereket, mint próbát alkalmaztuk, amit az *in situ* PCR-nél is használtunk. Az oligonukleotid DNS-DNS hibridizációs keverék pH 9,2 Tris-HCl pufferben oldott NaCl-ot és Na-citrátot tartalmazó SSC-t, formamidot, dextrán-szulfátot, EDTA-t, Triton X100-at, ultrahangozott heringspermium-DNS-t és a próbát tartalmazta. A megfelelően előkezelt metszetekben a DNS-t elődenaturáltuk, majd a denaturációs hőmérsékletről jég hideg vízben lehűtöttük, ami megakadályozta a DNS-szálak újra összekapcsolódását. Az *in situ* hibridizáció a próba olvadásponjtja alatti 5–10 °C-on, éjszakán át történt.

A mindkét fajta HPV-DNS-kimutatási eljárás láthatóvá tételét az általunk korábban kidolgozott nagy felbontású szignálamplifikációs eljárással végeztük (10). A hibridizációs reakciók végeztével a sejtmagokra, illetve a metszetekre közvetlenül avidin-biotinilált alkalikus foszfatáz komplexet

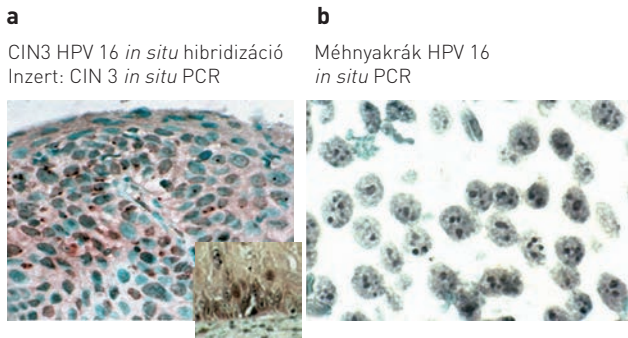
tettünk (ABC-AP kit, Vector Laboratories) és 37 °C-on 1 óráig inkubáltuk. Ezt követően mosás kétszer 10-10 percig 42 °C-on 2×SSC + 0,05% Triton X-100-tartalmú pufferben, majd erős mosás 10 percig 42 °C-on 0,1×SSC + 0,5% Triton X-100 + 5 mM EDTA összetételű pufferben. A mosás után a lemezeket BN-pufferben (0,1 M nátrium-bikarbonát + 0,05% Nonidet P-40) oldott 5 µg/0,1 ml biotinilált avidin-anti-avidin (BAAV) komplexszel inkubáltuk 37 °C-on 1 óráig. Ezután a lemezeket BN-pufferben mostuk háromszor 3 percig, majd avidin-biotin-alkalikus foszfatáz komplexet (ABC-AP) raktunk rá 40 percig. A BAAV – ABC-AP szignálfelelősítést még egyszer megismételtük, végül a reakciót alkalikus foszfatáz szubsztlát kittel (Vector Laboratories) hívtuk elő. A kontrasztfestés PBS-ben oldott 2%-os metilzölddel történt.

## EREDMÉNYEK

A Linear Array Genotyping HPV-teszt (Roche) segítségével 37 α-genotípusba tartozó olyan HPV-típust lehetett kimutatni, amely Magyarországon előfordulhat. Az így meghatározott



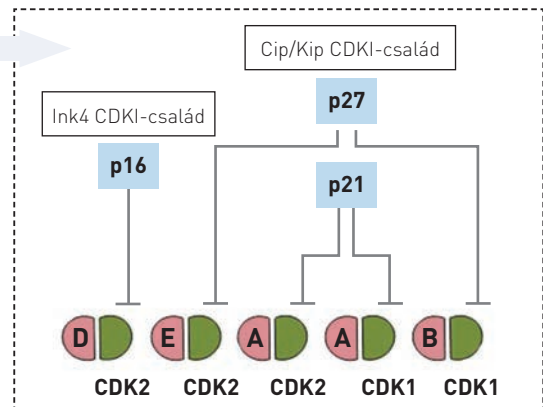
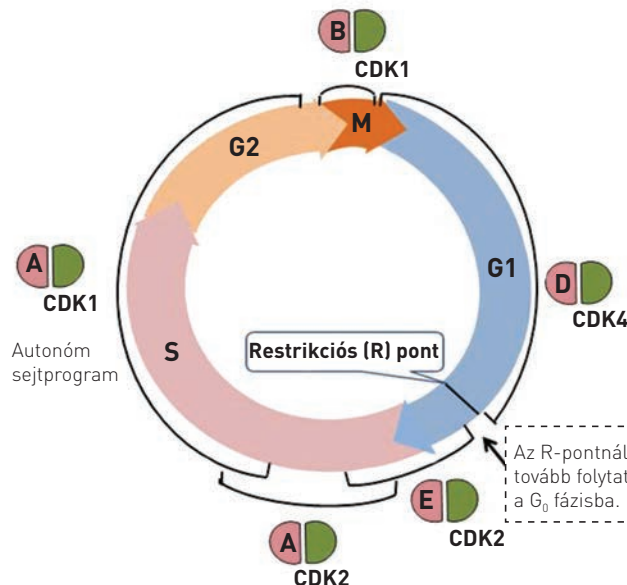
**1. ÁBRA.** Összesen 37 α-HPV-típus filogenetikai csoportosítása L1-gén-szekvenciák összehasonlítása segítségével, az IARC Working Group felosztása alapján (4). A piros háttérrel jelzett csoportok (α7 és α9) főleg az 1A HR-HPV-típusú vírusokat tartalmazzák. A rózsaszín kockákban számmal jelzett HPV, függetlenül attól, hogy milyen filogenetikai csoportban fordul elő, 1A HR-HPV-nek felel meg. A valószínűleg vagy lehetségesen karcinogén 2A és 2B HPV-típusokat narancssárga kockákba beírt számmal jelöltük és elsősorban az α5, α6 és α11 filogenetikai csoportban találhatók. Két olyan vírus is előfordult (HPV30, HPV34), amelyek filogenetikailag nagyon hasonlítanak 2B típusú HPV-kre, de jelenleg karcinogén hatásokról nem tudunk (fehér kockába írt számmal feltüntetve). A zöld háttérű körökkel jelzett csoportokban alacsony rizikójú vagy Magyarországon elő nem forduló vírusok találhatóak. A HPV6 és 11 is az alacsony rizikójú HPV α10-es csoportba tartozik. Az egyes víruscsoportokat jelző vonalak hossza és a rajtuk lévő világossárga táblácskákban lévő számok a víruscsoport egyes tagjai közötti genetikai hasonlóságot fejezik ki. Minél nagyobb ez a szám, annál nagyobb a genetikai hasonlóság.



**2. ÁBRA.** *In situ* hibridizáció HPV16-pozitív CIN3 szövettani metszeten (a) és *in situ* PCR HPV16-pozitív méhnyakrákból izolált sejtmagokon (b). CIN3-ban a hibridizációs szignál egyetlen kis fekete pont formájában a többrétegű laphám felső harmadában jelenik meg és a genomba integrálódott HPV16-DNS E6 génjére specifikus. Az inzerten egy másik CIN3 szövettani metszet bazális régiója látható, amelynek egyes sejtjeiben már itt megjelenik a sejtmag fölött az a kis fekete pont, ami a bazális-parabazális sejtekbe integrálódott HPV-DNS hibridizációs szignálja (240x nagyítás). A méhnyakrákból izolált sejtmagokon végzett *in situ* PCR 480x-os nagyítású felvételén jól látszik, hogy a HPV16 E6 DNS 2-3 kópiája épült be minden daganatsejt genomjába

37 HPV-típusból úgy képeztünk filogenetikai csoportokat, hogy mindegyik vírus irodalomból ismert L1 génjének teljes DNS-szekvenciáját a megadott komputerprogram segítségével egymással összehasonlítottuk. A nagyon hasonló L1 DNS-szekvenciákat mutató HPV-típusok kerültek egy filogenetikai csoportba (1. ábra). A méhnyakrákot előidéző HPV-típusok 67%-a az α9 filogenetikai csoportba, 25%-a az α7 filogenetikai csoportba, 8%-a egyéb HPV-csoportba tartozik. Az 1A karcinogén vírusok két kivétellel az α7 és α9 filogenetikai csoportba kerültek. Az α7 csoportba négyféle 1A karcinogén vírus, köztük a Magyarországon ritkábban előforduló HPV18 került, és mellette egy-egy valószínűleg (2A), illetve lehetségesen karcinogén (2B) vírust (HPV68 és HPV70) találtunk. Az α9 filogenetikai csoport hat 1A karcinogén típust, közöttük HPV16 típust tartalmaz. Saját korábban közölt adataink szerint ezek Magyarországon gyakrabban fordulnak elő (8), mellettük egy filogenetikailag rokon 2B típus (HPV67) is megtalálható volt. Az α5, α6 és α11 filogenetikai csoport tartalmazza a többi 2B HPV-típust, e mellett az α5 csoportban fordul elő az 1A karcinogén HPV51, az α6 csoportban találjuk az 1A típusú HPV56-ot és a vele genetikailag rokon,

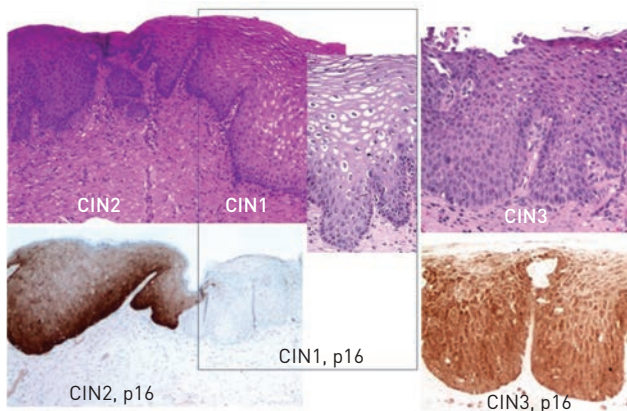
A genomba integrálódott HPV-DNS kiváltja a CDK-inhibitorok aktiválását, ezek komplexet képeznek ciklindependens kinázokkal (CDK1/2) és leállítják a sejtciklust.



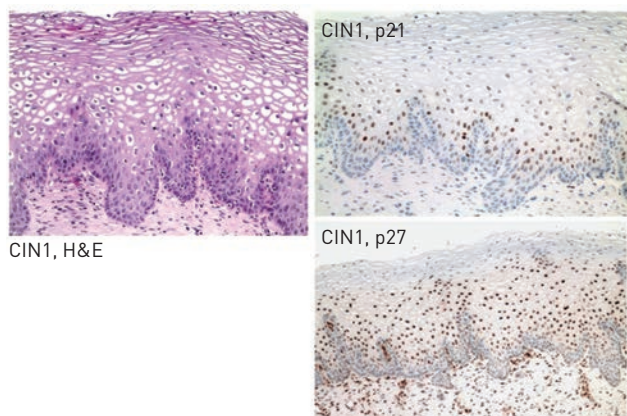
Extracelluláris szignál által befolyásolt program. Ekkor a sejtciklus még reagál a külső stimuláló vagy gátló ingerekre (GF-ok, TGF-β, p16)

A sejtciklus fiziológiás szabályozása

**3. ÁBRA.** A sejtciklus szabályozása fiziológiás körülmények között és HPV-DNS gazdasejtbe történő genomiális integráció hatására Weinberg [2007] ábrájának kisciklú módosítása alapján. Az extracelluláris szignálok (GF: növekedési faktorok, TGF: transzformáló növekedési faktor) megemelik a D-típusú ciklinek szintjét az egész G1 fázis során és a ciklin-D/CDK4 komplex aktiválódik. A restriktív (R) pontnál a sejt vagy kilép a G<sub>0</sub> fázisba, vagy átlépve az R-ponton különböző típusú ciklin-CDK komplexek hatására az autonóm sejtprogram lép életbe függetlenül az extracelluláris fiziológiás szignáltól. A genomba integrálódott HPV-DNS kiváltja az Ink4 és Cip/Kip CDKI fehérjék expresszióját, melyek a ciklin-CDK fehérjekomplexhez kapcsolódva meggátolják annak katalitikus aktivitását és ezzel leállítják a sejtciklus működését. A, B, D és E: különböző típusú ciklinek, CDK: ciklindependens kináz, CDKI: CDK-inhibitor. A Cip/Kip CDKI-családban két típusú CDKI, a p21 és p27 található, amelyek különböző ciklin/CDK fehérjékkel képeznek komplexeket. A p16/Ink4A fehérje a ciklin D/CDK2 komplexhez kapcsolódva fejt ki sejtcikluszgátló hatását



**4. ÁBRA.** p16-immunhisztokémia CIN1-2-3 súlyosságú méhnyakelváltozásokban. A külső méhszájból származó H&E metszetben egymás mellett CIN1 és CIN2 súlyosságú hámelváltozás látható (100× nagyítás). CIN1-ben a p16 fehérje nem expresszálódik, CIN2-ben az egész elváltozás területén, de legkifejezettebben a parabazális régióban jelenik meg. CIN3-ban a p16 fehérje immunhisztokémiai festődése még kifejezettebb a diszplázias hám alsó 4/5 részében (200×)



**5. ÁBRA.** CIN1 méhnyakelváltozás sorozatmetszetén végzett p21- és p27-immunhisztokémiai vizsgálat. A többrétegű laphám középső szakasza koilocitásan átalakult. A p21 fehérje csak a parabazális sejtekben fejeződik ki, de nem jelenik meg a koilocitákban. A p27 CDKI fehérje viszont csak a koilocitákban és a limfocitákban fejeződik ki (200× nagyítás)

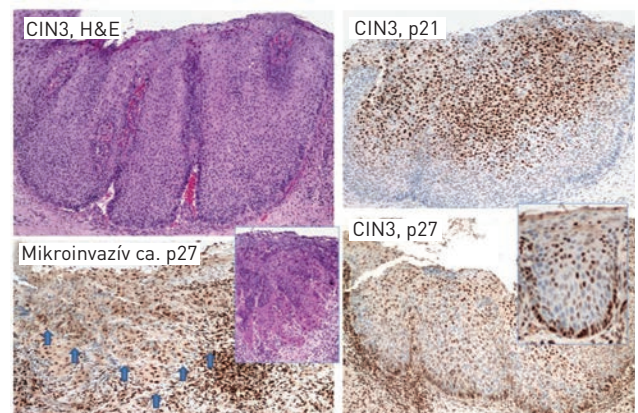
de ismeretlen tulajdonságú HPV30-at, amelynek rákkeltő hatását jelenleg nem igazolták. Külön filogenetikai csoportot képez a 2B típusú HPV73 és a HPV34, amely utóbbi vírusnál – csakúgy, mint a HPV30 esetében – karcinogén hatás jelenleg nem bizonyított. Az alacsony rizikójú, gyakorlatilag nem karcinogén HPV-típusok különböző filogenetikai csoportokban oszlanak meg, ezek között a HPV6 és HPV11 papillómákat előidéző, egymáshoz genetikailag nagyon hasonló vírus az q10 filogenetikai csoportban van több, genetikailag rokon nem karcinogén HPV-típussal együtt.

A CIN3 méhnyakelváltozás *in situ* hibridizációja azt mutatja, hogy döntően egy kópia HPV16-DNS integrálódott

a hámsejtgenomba, ami CIN2/3-ban már a bazális hámsejtek genomjában is megtalálható (2. ábra inzert). Ezzel szemben a méhnyakrákban 2-3 kópia HPV16 épült be a hámsejtekbe (2. ábra). Az itt bemutatott HPV16-adatokkal összefüggésben a 20 onkogén HPV-típus genomialis integrációs tulajdonságait a diskusszióban részletesen tárgyaljuk.

A 3. ábrán a sejtciklus normális szabályozását és a HPV-fertőzés indukálta ciklindependens kináz inhibitorok (CDKI) hatását foglaltuk össze Weinberg adatai segítségével (11). Ennek alapján mutatjuk be, ahogyan a p16Ink4A, p21Cip1 és p27Kip1 CDKI fehérjék a ciklindependens kinázokkal (CDK) komplexet képezve blokkolják a sejtciklust. A CDK csak a ciklinnel együtt képes katalitikus aktivitásra.

A sejtciklus működési zavarának vizsgálatára a p16Ink4A, p21Cip1 és p27Kip1 fehérjék immunhisztokémiai kimutatását végeztük el CIN2/3-ban és méhnyakrákban. A 4. ábrán ugyanazon a szövettani metszeten a p16 fehérje expresszióját mutatjuk be CIN1/2/3-ban. CIN1-ben a p16 fehérje az ép hám és CIN1 koilocitás fázisában nem szintetizálódik (a HPV nem épült be a sejtek genomjába), CIN2-ben a p16 CDK-inhibitor fehérje elsősorban a laphám parabazális régiójában jelenik meg nagy mennyiségben, a magasabb hámrégióban a p16 fehérje sokkal kevesebb (a festődési intenzitás sokkal halványabb). CIN3-ban a többrétegű laphámelváltozás alsó 3/4 részében a p16 fehérje nagy mennyiségben, a felső 1/4 részben kisebb mennyiségben van jelen a hámsejtekben. A p21 és p27 CDKI fehérje CIN1-ben nem jelenik meg a méhnyak



**6. ÁBRA.** CIN3 méhnyakelváltozás sorozatmetszetén és mikroinvazív karcinómán végzett p21- és p27-immunhisztokémiai vizsgálat. Az említett CDK-inhibitor fehérjék megjelenési mintázata egészen más, mint CIN1-ben. A p21 fehérje – szemben a CIN1-ben látott kifejeződési mintázattal – a CIN3 súlyosságú méhnyak-laphámelváltozás felső kétharmadában a sejtmagokban látható. A p27 fehérje CIN3-ban a bazális sejtsorban nagyon felszaporodik, a parabazális régióban nem látható, a magasabb hámrégióban kisebb mennyiségben és nem minden sejtben látható (100×). Az inzertben egy másik CIN3 eset p27-immunhisztokémiai vizsgálata, ami jobban mutatja a p27 eloszlási mintázatát (200×). Mikroinvazív karcinómában a CIN3 p27-pozitív bazális sejtsora feltöredezik, majd eltűnik (nyomait a kék nyilak jelzik), és a p27 fehérje a ráksejtekben jelenik meg. Az inzert H&E-festett metszete a mikroinvaziót mutatja (100×)

laphámja bazális és parabazális sejteinek sejtmagjában. A p21 fehérje közvetlenül a parabazális réteg fölött, a középső koilociták alsó szélénél szaporodik fel a sejtmagokban, de a koilocitákban már nem látható, a p27 fehérje a koilociták sejtmagjában dúsul fel, és mindenütt kifejeződik a limfoid sejtekben is (5. ábra). A sejtciklus-szabályozás ekkor még az ép sejteknek megfelelően működik. CIN3-ban a p21 és p27 fehérje elváltozáson belüli eloszlása egészen más képet mutat, mint a sejtciklus fiziológias működésekor. A p21 fehérje csak a kóros hám felső kétharmadának sejteiben jelentkezik. A p27 fehérje a súlyosan atípusos sejtekből felépülő többrétegű laphám egysoros bazális sejteiben nagy mennyiségben szaporodik fel, a parabazális sejtekben gyakorlatilag nem, a felső kétharmadban pedig a bazális sejtekhez viszonyítva kisebb mértékben fejeződik ki (6. ábra). A limfociták szintén p27-pozitívak. Mikroinvaszív karcinómában a diszplázias laphám bazális sejtsora feltöredezik, majd eltűnik, és a p27 fehérje a ráksejtekben is megjelenik. A p16, p21, p27 fehérjék kifejeződésének fent leírt mintázata a sejtciklus-szabályozás felborulásának eredménye az érintett sejtekben (lásd a diszkussziót is).

### MEGBESZÉLÉS

A méhnyakrákok 95%-a HPV-pozitív és a genomba integrálódott HPV egy vagy több kópiaszáma erősen összefügg a vírus transzformáló képességével. A „The Cancer Genome Atlas” (TCGA) projekt során kimutatták, hogy az a7 és elsősorban az a9 csoportba tartozó HPV-típusok fertőzik a méhnyak laphámsejtjeit (6). A vírus-sejt fúziós transzkriptumok jelzik a genomiális integrációt különböző forró pontok területén, mint pl. 3q28 és 8q24. Az integrálódott HPV képes a gazdasejt p53 és RB szuppresszorgénjeit részlegesen vagy teljesen inaktíválni, továbbá genomiális mutációkat, szegmentális duplikációkat és transzlokációkat előidézeni. A TCGA konzorcium a HPV16, HPV18 és HPV35 típust azonosította a leggyakoribb integrálódott vírusokként.

Több magyar munkacsoport is vizsgálta a különböző HPV-típusok eloszlását különböző lokalizációjú laphám-elváltozásokban. Hettmann és mtsai a fej-nyaki laphámrákokat PCR-módszerrel vizsgálták, a HPV-pozitív tumorokban a HPV16 genotípus fordult elő leggyakrabban (12). Sápy és mtsai 1997 és 2002 között a méhnyakráksűrési célből vett rutin citológiai mintákon Digene Hybrid Capture módszerrel HPV-kimutatást végeztek, és a HR-HPV-típusok jelenlétét gyakrabban találták 35 éves kor fölött (13). Legújabbán Bognár és mtsai egy 94 éves nőbeteg bal kolonfélben kialakult laphámrákjában és négy áttéti nyirokcsomóban PCR- és Southern blot hibridizációs technikával HPV16 jelenlétét mutatták ki (14). Az idézett adatok arra utalnak, hogy különböző lokalizációjú laphám-elváltozásokban a leginkább transzformáló HR-HPV genotípus a HPV16.

Viszonylag kevés *in situ* vizsgálat történt CIN2/3-ban a gazdasejt genomjába integrálódott HPV-DNS kimutatására és sejtenkénti kópiaszámának meghatározására. Kelesidis

és mtsai (15) nem fluoreszcens *in situ* hibridizációt és folyadékalapú PCR-t hasonlítottak össze, és azt találták, hogy paraffinos szövetszövetmintában az *in situ* hibridizáció szenzitivitása és specifitása jobb, mint a hagyományos PCR-módszeré. Swan és mtsai (16) fluoreszcens alapú PCR-módszert és a HPV16, HPV18, HPV31 és HPV45 kimutatására a vírusok L1 génjére tervezett PCR-primereket használtak, és a kópiaszámot µg DNS-hez viszonyítva adták meg. Azt találták, hogy a HPV-kópiaszám a méhnyak-hám-elváltozások súlyosságával párhuzamosan nő és legmagasabb a HPV16-pozitív méhnyakrákban. Wang és mtsai (17) a méhnyak-elváltozásaiban történő HR-HPV genomiális beépülés integrációs helyeit vizsgálták és fluoreszcens *in situ* hibridizációval meghatározták a vírus sejtenkénti kópiaszámát is. Azt találták, hogy a beépült HPV-DNS kópiaszáma a CIN súlyosságával párhuzamosan emelkedett és méhnyakrákban elérte a sejtenkénti 2-3 kópiaszámot. Saját megfigyeléseink ezekkel az adatokkal teljes egészében megegyeznek. Wang és mtsai (17) további fragilis helyeket találtak, ahová a HPV egy kópiaszámmal beépült. Ilyen hely a 3p14.2 régió, ahol a fragile histidine triad (FHIT) gén, mint integrációs hely is megtalálható. Ezek a gének a HPV-beépülés során sérülnek, funkcióik megváltoznak, és egyebek mellett a ciklin D1 és más sejtciklusgének fokozott expresszióját és a sejtciklus működési zavarát okozzák, ami végül a károsodott sejtek darwini szelekcióhoz hasonló kiválasztódási mechanizmusa révén a méhnyakrák kialakulásához vezet.

HPV16 E6-specifikus primereket, nagy felbontású *in situ* hibridizációt használva mi is azt találtuk, hogy a HPV16-DNS általában egy kópiaszámmal van beépülve a CIN3 sejteinek genomjába. Schurter és mtsai (18) szerint, ha a retrospektív *in situ* genetikai vizsgálatoknál hagyományos szövettani metszetekből indulunk ki, előnyösebb a vizsgálatokat a szövetekből izolált sejtmagokon végezni, mert ilyenkor sokkal jobb a kis mennyiségű próba penetrációja, ami által csökken a nem specifikus hibridizációs reakció lehetősége és csökken a háttér, valamint az elmetezett sejtmagok zavaró hatása is, amit a metszeteken történő vizsgálatoknál figyelembe kell venni. Méhnyakrákból izolált sejtmagokon végzett *in situ* PCR-rel nagyon konzekvensen és egyértelműen 2-3 HPV-DNS-kópiaszámot találtunk, ami Schurter és mtsai (18) adatait támasztja alá.

Itt szeretnénk rámutatni arra, hogy a 20 onkogén HPV típusától függően nem egyformán transzformáló hatású. Ha ugyanis összehasonlítjuk e vírusok előfordulási gyakoriságát méhnyakrákban és LSIL-HSIL-ben (CIN1/2/3), egészen eltérő gyakorisági eloszlásokat találunk (1. táblázat). A HPV16, HPV18, HPV45 és HPV35 gyakrabban fordul elő méhnyakrákban, mint CIN1/2/3-ban. Továbbá saját korábban közölt, összesen 591 CIN-pozitív citológiai mintánk között HSIL-t (CIN2/3) 191 esetben találtunk, és ezekben a mintákban a HPV16 108 esetben, vagyis 56,5%-ban fordult elő (8). Ez az arányszám nagyon közel van Arbyn és mtsai (5) megfigyeléséhez, akik 530 méhnyakrákban 60,9%-ban HPV16-ot

**1. TÁBLÁZAT.** Rákkeltő (1A), valószínűleg rákkeltő (2A) és esetleg rákkeltő (2B) HPV-típusok előfordulása méhnyakrákban és rák megelőző állapotokban (LSIL és HSIL)

HPV-típusok	Karcinogeneziscsoport	Méhnyakrák [A]	LSIL + HSIL [B]
		Előfordulási gyakoriság %	Előfordulási gyakoriság %
16*	1A	60,6	29,8 ↓
18*	1A	10,2	4,0 ↓
45*	1A	5,9	3,6 ↓
33	1A	3,8	4,1 ↑
31	1A	3,7	6,5 ↑
52	1A	2,8	7,9 ↑
58	1A	2,3	4,4 ↑
35	1A	1,9	0,9 ↓
39	1A	1,6	3,6 ↑
51	1A	1,3	7,7 ↑
59	1A	1,1	3,0 ↑
68	2A	1,0	2,3 ↑
56	1A	0,8	2,4 ↑
73	2B	0,5	3,1 ↑
26	2B	0,3	0,2
67	2B	0,3	0,4
53	2B	0,3	7,3 ↑
70	2B	0,1	1,1 ↑
66	2B	0,1	5,5 ↑
82	2B	0,1	1,1 ↑

Az [A] oszlop Arbyn és mtsai adatait tartalmazza [5], a [B] oszlopban saját, korábban közölt adataink vannak feltüntetve [8]. A táblázatban a HPV-típusok gyakorisági sorrendjét a méhnyakrákban való előfordulásuk sorrendje szerint rendeztük. Mintaszám: karcinóma 530, HPV-pozitív (LSIL+HSIL) 591. Az LSIL-HSIL oszlopban lefelé vagy felfelé mutató nyílak a méhnyakrákhoz viszonyított alacsonyabb vagy magasabb előfordulási arányt mutatják. A \*-gal jelzett HPV-típusokat tekintjük a legerősebben transzformáló vírusoknak

mutattak ki. Mindez azt jelenti, hogy a legerősebb karcinogén hatása a HPV16-nak van, ami egyezik az *in situ* genetikai vizsgálatok adataival. A HPV18, HPV45 és HPV35 szintén erős karcinogén tulajdonságú, gyakrabban fordul elő méhnyakrákban, mint rák megelőző állapotokban. Az összehasonlító táblázatban szereplő 1A rizikócsoportba tartozó HPV39, 51, 59, 56 és a 2A-2B rizikócsoportba tartozó HPV68, 73, 26, 67, 53, 70, 66 és 82 egyenként 0,1–1,6%-os gyakorisággal található méhnyakrákban, ami jóval alacsonyabb, mint a SIL-ben történő előfordulási gyakoriságuk. Saját megfigyeléseink teljes összhangban vannak a TCGA konzorcium által közölt adatokkal [6] és az idézett magyar adatokkal is [12–14], vagyis adataink azt mutatják, hogy az egyes HPV-típusok

között a gazdasejt genomjába történő integrációs, ezáltal daganatkeltő képességük tekintetében nagy különbségek vannak, és ez a különbség eltérő biológiai viselkedéssel függ össze. Ezt a megfigyelést érdemes figyelembe venni a méhnyakrák szűrésénél és megelőzésénél (PubMed OMIM).

A sejtciklus szabályozásában a CDK-inhibitor család fehérjéi, közöttük a p16, p21 és p27 fehérje kiemelkedő szerepet játszik. A p16 az Ink4 CDKI-fehérjecs család tagja, és két kritikus sejtciklus-szabályozó szignálúton, a p53 és RB1 génműködés szabályozásán keresztül közvetve, de közvetlenül is szabályozza a sejtciklus működését és a genom épségének őrzőjeként is ismert [19]. A CINtec Plus teszt olyan immunhisztokémiai koktél, amelyben együtt van jelen a P16Ink4 CDKI fehérje és a Ki67 proliferációs marker, és használatával el lehet különíteni az ASC-US-t (ismeretlen jelentőségű atípusos laphámsejtek) a súlyos fokú laphámdispláziától [20]. A p21 fehérje a Cip/Kip fehérjecs család tagja, a szerin/treonin kinázokhoz tartozik, a HRAS-hoz hasonló fehérje, és többféle szignálut és ezen keresztül a sejtciklus progresszióját is szabályozza (PubMed OMIM).

A sejtciklus-szabályozás fiziológiás működését Weinberg [11] nyomán a 3. ábrán foglaltuk össze. Az extracelluláris szignálok, mint a növekedési faktorok (GF) vagy a TGF- $\beta$ , megemelik a D-típusú ciklinek szintjét az egész G1 fázis során, ami önmagában beindítja a sejtproliferációt. Az Ink4 CDK-inhibitor család fehérjéi, közöttük a p16 azonban nagyon pontos szabályozó (gátló) hatást fejtenek ki azzal, hogy szorosan hozzákötődnek a ciklin D/CDK4 komplexhez és elfordítják az ATP-kötő helyeket, megszüntetve ezzel annak katalitikus aktivitását. A restriktív (R) pontnál eldől, hogy a sejt vagy kilép a G0 fázisba, vagy átlépve az R-pontot az autonóm sejtprogram lép életbe. Ekkor először a ciklin E-CDK2, majd a korai S-fázisban a ciklin A-CDK2 komplex aktiválódik, a középső S-fázisban és a G2-fázisban a ciklin A-CDK1 komplex lesz gátló hatású, a sejtosztódást a ciklin B-CDK1 komplex szabályozza, függetlenül az extracelluláris fiziológiás szignáltól [21].

HPV-fertőzésnél a méhnyak laphámsejtjeiben a sejtciklus a következőképpen működik: alacsony rizikójú HPV- (LR-HPV) fertőzés, illetve a CIN1 fázis nem zavarja meg a sejtciklus fiziológiás működését és nem okozza a p16, p21 és p27 megváltozott expresszióját, mert nem okoz károsodást a méhnyak hámsejtjeinek genomjában [4. és 5. ábra] [22]. CIN2/3-ban és méhnyakrákban az integrálódott HPV-DNS következtében genomális DNS-károsodás jön létre a gazdasejtben, amit a sejt megpróbál kijavítani úgy, hogy leállítja a sejtciklust, hogy a p53 és RB fehérjék apoptózist idézhessenek elő. A kiemelten HR-HPV, mint a HPV16 esetén a p16 fehérje termelése magas szintet ér el, és minél nagyobb a p16 fehérje mennyisége, annál jobban eltorzítja a CDK4-kötőhelyet, ezzel a ciklin D/CDK4-p16 CDKI fehérje komplex egyensúlya megbomlik, hipofoszforyláció jön létre, és a folyamat áttöri az R-pontot [11]. Ekkor először a ciklin E-CDK2 komplex fiziológiás működése sérül, a p21 és p27

CDKI fehérjék mennyisége megnő. A ciklin E a HR-HPV E7 fehérjéje hatására magas szinten stabilizálódik, a G1 fázis megrövidül és a sejtciklus az S, G2 és M fázisba lép [21]. Az ilyen módon felülregulált autonóm sejtciklus-szabályozás paradox módon stimulálja G1 fázisban a ciklin D-CDK4 komplex működését, ami visszahatva tovább súlyosbítja a sejtciklus működési zavarát [11]. CIN3-ban a p21 fehérje a többrétegű laphám középső és felső harmadában szaporodik fel, eredeti funkciója a sejtdifferenciáció előidézése, ami azonban ebben az esetben már alig-alig működik. Mindezt a HPV16-pozitív CIN3 méhnyakelváltozáson mutatjuk (6. ábra). A HR-HPV, esetünkben a HPV16 először a laphám bazális sejteibe lép be, és egy kópia HPV-DNS integrálódik a sejt genomjába (2. ábra). Ennek hatására a p27Kip1 CDKI a bazális sejtekben nagyon erősen felszaporodik és a parabazális réteg fölött elszórtan a többrétegű laphám sejteiben is megjelenik, hogy gátló hatást fejtson ki a laphámsejtek proliferációjára.

Ha 2-3 kópia HPV-DNS integrálódik a sejtgenomba, a p27 fehérje sejtciklust gátló hatása már nem tud érvényesülni és a malignus transzformáció bekövetkezik (6. ábra). Más típusú onkogén HPV-fertőzésnél az integrálódott HPV-DNS kezdeti egy kópiaszáma több esetben is sokáig megmaradhat és így érvényesülhet a p53 és RB, valamint a CDK-inhibitorok sejtciklust blokkoló és hibakijavító hatása.

A HPV elterjedése globális probléma, az egyes országok sokat tesznek a fertőzések eredetű méhnyakrák megelőzése és a leghatékonyabb szűrővizsgálati módszerek bevezetése érdekében [23]. Tekintve, hogy Magyarországon a méhnyakrák előfordulási gyakorisága évről évre fokozatosan nő [8], vizsgálatainkkal további szöveti szintű adatokat kívántunk szolgáltatni a különböző HPV-típusok egymástól eltérő daganatkeltő hatásának jobb megértéséhez. Megfigyeléseink segítséget nyújthatnak a HPV-fertőzés megelőzéséhez és a már fertőzött betegek jobb klinikai ellátásához.

#### IRODALOM

- Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology Screening Guidelines for the Prevention and Early Detection of Cervical Cancer. *J Low Genit Tract Dis* 16:175–204, 2012
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401:70–79, 2010
- Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 10:550–560, 2010
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. In: IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 100B:1–44, 2012
- Arbyn M, Tommasino M, Depuydt C, Dillner J. Are 20 human papillomavirus types causing cervical cancer? *J Pathol* 234:431–435, 2014
- The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature* 543:378–384, 2017
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Human Mut* 15:7–12, 2000
- Szentirmay Z, Veleczki Zs, Kásler M. Humán papillomavírus asszociált méhnyak-megbetegedések Magyarországon: epidemiológia és a HPV-típusok összefüggése a párhuzamosan végzett citológiai diagnózissal. *Orv Hetil* 158:1213–1221, 2017
- Orosz Z, Udvarhelyi N, Szentirmay Z. Non-isotopic in situ hybridization of human papillomavirus on histologic sections: an amended protocol. *Anticancer Res* 14:1991–1994, 1994
- Szentirmay Z, Ishizaka Y, Ohgaki H, et al. Demonstration by in situ hybridization of ret proto-oncogene mRNA in developing placenta during mid-term of rat gestation. *Oncogene* 5:201–205, 1990
- Weinberg EA. The biology of cancer. Garland Science, Taylor & Francis Group 2007, pp. 255–273
- Hettmann A, Demcsák A, Bach Á, et al. Prevalence and genotypes of human papillomavirus in saliva and tumor samples of head and neck cancer patients in Hungary. *Infect Genet Evol* 59:99–106, 2018
- Sapy T, Poka R, Szarka K, et al. Age-specific prevalence of high-risk human papillomavirus infection in a Hungarian female population with positive cytology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 138:194–198, 2008
- Bognár G, István G, Ledniczky G, Ondrejka P. Humán papillomavírus (HPV-16) kimutatása a colon laphámsejtes carcinomájából és annak nyirokcsomó-metastasisaiból. *Magy Seb* 61:225–229, 2008
- Kelesidis T, Aish L, Steller MA, et al. Human papillomavirus (HPV) detection using in situ hybridization in histologic samples. Correlations with cytologic changes and polymerase chain reaction HPV detection. *Am J Clin Pathol* 136:119–127, 2011
- Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J Clin Microbiol* 37:1030–1034, 1999
- Wang L, Shen H, Feng B, et al. Reduction in the copy number and expression level of the recurrent human papillomavirus integration gene fragile histidine triad (FHIT) predicts the transition of cervical lesions. *PLoS ONE* 12:e0175520, 2017
- Schurter MJ, LeBrun DP, Harrison JK. Improved technique for fluorescence in situ hybridization analysis of isolated nuclei from archival, B5 or formalin fixed, paraffin wax embedded tissue. *Mol Pathol* 55:121–124, 2002
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366:704–707, 1993
- Egerton N, Cohen C, Siddiqui MT. Evaluation of CINtec PLUS® testing as an adjunctive test in ASC-US diagnosed SurePath® preparations. *Diagn Cytopathol* 41:35–40, 2013
- Russo AA, Tong L, Lee JO, et al. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* 395:137–243, 1998
- Martin LG, Demeres GW, Galloway DA. Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E. *J Virol* 72:975–985, 1998
- World Cancer Report 2014. Eds: Stewart BW, Wild CP, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2014