

**Monoclonal Mouse  
Anti-Human  
p63 Protein**  
Clone DAK-p63

**Code M7317**

**ENGLISH**

**Intended use** For in vitro diagnostic use.

Monoclonal Mouse Anti-Human p63 Protein, Clone DAK-p63, is intended for use in immunohistochemistry. Antibodies to p63 protein, a basal epithelial cell proliferation regulator (1), may be useful for the identification of prostate adenocarcinoma as an aid in the differentiation between benign prostate lesions and prostate adenocarcinoma (2, 3). Antibodies to p63 may also be useful as an aid in the differentiation between breast carcinoma in situ and breast carcinoma (4), to differentiate squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung (5, 6) and to differentiate uterine cervical squamous carcinoma from cervical adenocarcinoma (7). The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

**Synonyms for antigen** Tumor protein (p63).

**Summary and explanation** The p63 protein is a member of the p53 family, which also includes p73. The p63 gene encodes multiple isoforms: isoforms containing a potent amino-terminal transactivation domain (TAp63 isoforms) and isoforms lacking that region ( $\Delta$ Np63 isoforms) (8, 9). Although the TAp63 isoforms can transactivate p53 target genes, e.g. Bax and p21<sup>WAF/CEP1</sup> and induce apoptosis and cell cycle arrest (10), p63 is not a tumor suppressor (9). The  $\Delta$ Np63 isoforms act in a dominant-negative manner by competing for the p53 target genes and indirectly promote cell growth by counteracting the apoptosis and cell cycle arrest activation by TAp63 isoforms and p53 (1, 10, 11).

P63 is a marker of non-invasive epithelial tumors, whereas loss of p63 expression is seen in more invasive tumors suggesting that loss of p63 accelerates tumorigenesis and metastasis (10). However, a lack of p63 is not a reliable marker of invasiveness and even though p63 is expressed in the minority of breast carcinomas, rare cases of nuclear p63 expression are found (9).

Frequently, tumors have simultaneous transcriptional up-regulation of both the TAp63 and the  $\Delta$ Np63 isoforms, with  $\Delta$ Np63 being the predominant at protein level. Some lung cancers and squamous cell carcinomas of the head and neck show p63 protein overexpression associated with a modest increase in p63 gene copy numbers, but the major p63 isoforms are  $\Delta$ Np63 isoforms. Similarly, in nasopharyngeal carcinomas and esophageal squamous cell carcinoma,  $\Delta$ Np63 isoforms are the major isotypes (9).

The predominant localization of p63 protein is in basal cells of normal epithelia in ectocervix, esophagus, prostate, skin, tonsil, urothelium, and vagina and in basal cells in glandular structures of breast, bronchi and prostate. p63 protein is also expressed in myoepithelial cells of the breast (9).

Refer to Dako's [General Instructions for Immunohistochemical Staining](#) or the detection system instructions of IHC procedures.

**Reagent provided** Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant (containing fetal calf serum) dialyzed against 0.05 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, and containing 0.015 mol/L sodium azide

Clone: DAK-p63. Isotype: IgG2a, kappa.

Mouse IgG concentration mg/L: See label on vial.

The protein concentration between lots may vary without influencing the optimal dilution. The titer of each individual lot is compared and adjusted to a reference lot to ensure a consistent immunohistochemical staining performance from lot-to-lot.

**Immunogen** Synthetic peptide derived from the core DNA-binding domain of human p63 protein.

**Specificity** In Western blot analysis the antibody detects bands corresponding to the expected molecular weights and according to expression patterns of the various isoforms (TAp63 and  $\Delta$ Np63 isoforms) of p63 in HCC1806 squamous carcinoma lysate and colon cancer.

- Precautions**
1. For professional users.
  2. This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
  3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
  4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
  5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

**Storage** Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

**Quick guide\***

| Step             |   | Comments  |
|------------------|---|---|
| Fixation         | Formalin  |   |
| Pre-treatment    | EnVision FLEX™, High pH (Code K8004)            | 20 min HIER, 3-in-1 using PT Link and PT Link Rinse Station           |
| Dilution         | 1:50  | 20 min incubation   |
| Dilution Buffer  | Dako Antibody Diluent (Code S0809)              | Dilute immediately prior to use                                       |
| Negative Control | Dako Negative Control, Mouse IgG2a (Code X0943) | 20 min incubation   |
| Visualization    | EnVision™ FLEX, High pH (Code K8000/K8010)      | 20 min incubation, 2x5 min DAB+ incubation                            |
| Counterstain     | EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code K8008/K8018)   | 5 min incubation  |
| Control Tissue   | Tonsil, prostate                                | Nuclear staining  |
| Slides           | FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020)         | Recommended for greater adherence of tissue sections to glass slides. |

|                 |  |   |
|-----------------|--|---|
| Mounting        | Non-aqueous, permanent mounting required | After staining, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium. |
| Instrumentation | Autostainer Link 48 and Autostainer Plus | Use instrument-specific vials (Code SK200-SK203 and Code S3425)                                       |

\*The user must always read the package insert for detailed instructions of the staining procedure and handling of the product.

#### Specimen preparation

**Paraffin sections:** The antibody can be used for labeling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

**Pre-treatment:** Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required. Optimal results are obtained by pretreating tissues with HIER using diluted EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8004). Deparaffinization, rehydration and epitope retrieval can be performed in Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to PT Link User Guide. The following parameters should be used for PT Link: Pre-heat temperature: 65 °C; epitope retrieval temperature and time: 97 °C for 20 (±1) minutes; cool down to 65 °C. Remove slide rack from PT tank and immediately dip slides in jar/tank (e.g., PT Link Rinse Station (Code PT109)) containing diluted room temperature EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (Code K8007). Leave slides in Wash Buffer for 1-5 minutes.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended. After staining, the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.

#### Staining procedure

**Dilution:** The recommended dilution of Monoclonal Mouse Anti-Human p63 Protein, Clone DAK-p63, Code M7317, is 1:50. Dilute the antibody in Dako Antibody Diluent (Code S0809). Incubate pretreated tissue sections for 20 minutes at room temperature. These are guidelines only. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be validated individually by each laboratory.

**Negative control:** The recommended negative control reagent Dako Negative Control, Mouse IgG2a (Code X0943), diluted to the same Ig concentration as the primary antibody. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, dilute these reagents immediately prior to use. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens.

**Visualization:** The recommended visualization system is EnVision™ FLEX, High pH (Code K8000/K8010) using a 20 minute incubation at room temperature. Follow the procedure enclosed with the selected visualization system(s).

**Automation:** The antibody is well-suited for immunohistochemical staining using automated platforms, such as Dako Autostainer, Autostainer Plus and Autostainer Link as well as PT Link for pre-treatment.

**Counterstaining:** The recommended counterstain is EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code K8008/K8018). For optimal results, non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

**Controls:** Positive and negative control tissues should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include tonsil and prostate and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in the "Performance characteristics" section.

#### Staining interpretation

The cellular staining pattern is nuclear. Cytoplasmic staining in abnormal tissue has also been reported (12).

#### Performance characteristics

**Normal tissues:** In tonsil, squamous epithelial cells show a moderate to strong staining reaction. In prostate, basal epithelial cells show a weak to moderate staining reaction. Occasionally, cytoplasmic labeling of granulocytes may be observed.

##### Summary of Normal Tissue Reactivity (13).

| Tissue Type (# tested) | Positive Tissue Elements             | Tissue Type (# tested) | Positive Tissue Elements                             |
|------------------------|--------------------------------------|------------------------|--|
| Adrenal (3)            | 3/3 Adrenal cells (30%), cytoplasmic | Ovary (3)              | 0/3  |
| Bone marrow (3)        | 0/3                                  | Pancreas (3)           | 3/3 Islet cells (100%), cytoplasmic                  |
| Breast (3)             | 3/3 Basal cells (90%), nuclear       | Pituitary (3)          | 3/3 Pituitary cells (100%), cytoplasmic              |
| Cerebellum (3)         | 0/3                                  | Placenta (3)           | 1/3 Synsytiothrophoblastic cells (10%), nuclear      |
| Cerebrum (3)           | 0/3                                  | Prostate (3)           | 3/3 Basal cells (100%), nuclear                      |
| Cervix (3)             | 3/3 Basal cells (100%), nuclear      | Salivary gland (3)     | 3/3 Myoepithelial basal cells (90%), nuclear         |
| Colon (3)              | 0/3                                  | Skin (3)               | 3/3 Epithelial cells and basal cells (100%), nuclear |
| Endometrium (3)        | 0/3                                  | Small intestine (3)    | 2/3 Epithelial cells (10%), cytoplasmic              |
| Esophagus (3)          | 3/3 Epithelial cells (100%), nuclear | Spinal cord (3)        | 0/3  |
| Fallopian tube (3)     | 3/3 Basal cells (50%), nuclear       | Spleen (3)             | 0/3  |
| Kidney (3)             | 0/3                                  | Stomach (3)            | 3/3 Glandular cells (30-100%), cytoplasmic           |
| Liver (3)              | 0/3                                  | Testis (3)             | 0/3  |
| Lung (3)               | 1/3 basal cells (100%), nuclear      | Thyroid (3)            | 0/3  |
| Lymph node (3)         | 0/3                                  | Tonsil (3)             | 3/3 Epithelial cells (100%), nuclear                 |
| Muscle, cardiac (3)    | 0/3                                  | Uterus (3)             | 2/3 Epithelial cells (<1%), nuclear                  |
| Muscle, skeletal (3)   | 0/3                                  | Ureter (3)             | 3/3 Epithelial cells (100%), nuclear                 |
| Nerve, peripheral (3)  | 0/3                                  | Urinary bladder (3)    | 3/3 Epithelial cells (100%), nuclear                 |

**Abnormal tissues:** The antibody labeled basal cells in 10/10 prostate hyperplasia and myoepithelial cells in 5/5 breast carcinoma in situ. The antibody labeled 6/6 squamous cell carcinoma of the lung, 6/6 uterine cervical squamous cell carcinoma, 0/10 prostate carcinoma, 3/3 breast carcinoma, 4/6 cervical adenocarcinoma, 4/6 adenocarcinoma of the lung (14).

## FRANÇAIS

#### Intérêt

Pour utilisation diagnostique in vitro.

L'anticorps Monoclonal Mouse Anti-Human p63 Protein, Clone DAK-p63, est destiné à une utilisation en immunohistochimie. Les anticorps dirigés contre la protéine p63, un régulateur de la prolifération des cellules épithéliales basales (1), peuvent s'avérer utiles pour identifier l'adénocarcinome de la prostate et différencier les lésions prostatiques bénignes des adénocarcinomes de la prostate (2, 3). Ils peuvent également être utiles pour différencier le carcinome du sein *in situ* du carcinome du sein (4), le carcinome épidermoïde de l'adénocarcinome pulmonaire (5, 6) et le carcinome épidermoïde du col utérin de l'adénocarcinome cervical (7). L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques réalisés par un pathologiste.

## Synonymes de l'antigène

Protéine tumorale (p63).

## Résumé et explication

La protéine p63 appartient à la famille p53, qui inclut également la p73. Le gène p63 code pour plusieurs isoformes : les isoformes possédant un domaine de transactivation N-terminal puissant (isoformes TAp63) et les isoformes ne possédant pas ce domaine (isoformes ΔNp63) (8, 9). Bien que les isoformes TAp63 puissent transactiver les gènes cibles p53 (par ex., Bax et p21<sup>WAF1/CEP1</sup>) et induire une apoptose et un arrêt du cycle cellulaire (10), p63 n'est pas un suppresseur tumoral (9). Les isoformes ΔNp63 ont un effet dominant négatif dans la compétition pour les gènes cibles p53, et ils favorisent indirectement la croissance cellulaire en s'opposant à l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire par les isoformes TAp63 et p53 (1, 10, 11).

La protéine p63 est un marqueur des tumeurs épithéliales non invasives. L'absence d'expression de p63 s'observe dans les tumeurs davantage invasives, suggérant que la perte de p63 accélère l'oncogénèse et la métastase (10). Néanmoins, l'absence de p63 ne constitue pas une indication fiable d'invasion tumorale et, bien qu'elle ne soit exprimée que dans une minorité de carcinomes du sein, de rares cas d'expression nucléaire de p63 ont été observés (9).

Les tumeurs présentent souvent une régulation positive de la transcription des deux isoformes en même temps (TAp63 et ΔNp63), les isoformes ΔNp63 étant prédominantes au niveau des protéines. Dans certains cancers du poumon et carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou, une surexpression de la protéine p63 associée à une augmentation modérée du nombre de copies du gène p63 a été observée, mais les isoformes majoritaires sont les isoformes ΔNp63. De la même manière, les isoformes ΔNp63 sont majoritaires dans les carcinomes nasopharyngés et les carcinomes épidermoïdes de l'œsophage (9).

La protéine p63 est principalement présente dans les cellules basales des épithéliums normaux de l'exocol, de l'œsophage, de la prostate, de la peau, de l'amygdale, de l'urothélium et du vagin, ainsi que dans les cellules basales des structures glandulaires du sein, des bronches et de la prostate. La protéine p63 est également exprimée dans les cellules myoépithéliales du sein (9).

Se référer au document *General Instructions for Immunohistochemical Staining* (Instructions générales de coloration immunohistochimique) de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC.

## Réactif fourni

Anticorps monoclonal de souris fourni sous forme liquide comme surnageant de culture cellulaire (contenant du sérum fœtal de veau) dialysé en utilisant 0,05 mol/L de tampon Tris-HCl, à pH 7,2 et contenant 0,015 mol/L d'azide de sodium.

Clone : DAK-p63. Isotype : IgG2a, kappa.

Concentration (mg/L) en IgG de souris : Voir l'étiquette sur le flacon.

La concentration de protéines peut varier d'un lot à l'autre sans que cela n'ait d'influence sur la dilution optimale. Le titre de chaque lot est comparé et ajusté par rapport à un lot de référence pour assurer des performances de coloration immunohistochimiques analogues d'un lot à l'autre.

## Immunogène

Peptide synthétique dérivé du domaine du noyau liant l'ADN de la protéine humaine p63.

## Spécificité

L'analyse par Western blot d'un lysat de carcinome épidermoïde HCC1806 et de cancer du côlon révèle que l'anticorps détecte des bandes correspondant aux poids moléculaires attendus et aux schémas d'expression des différents isoformes (TAp63 et ΔNp63) de p63.

## Précautions d'emploi

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
4. Porter un équipement de protection individuelle approprié pour éviter tout contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

## Conservation

Conservé entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption imprimée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Aucun signe évident n'indique l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. En cas de coloration inattendue, ne pouvant être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et de suspicion d'un problème avec l'anticorps, contacter l'assistance technique Dako.

## Guide rapide\*

| Étape              |   | Commentaires   |
|--------------------|---|--|
| Fixation           | Formol  |  |
| Prétraitement      | EnVision FLEX™, High pH (réf. K8004)            | HIER de 20 minutes, 3 en 1 avec PT Link et PT Link Rinse Station   |
| Dilution           | 1:50  | Incubation de 20 minutes   |
| Tampon de dilution | Dako Antibody Diluent (réf. S0809)              | Diluer immédiatement avant utilisation   |
| Contrôle négatif   | Dako Negative Control, Mouse IgG2a (réf. X0943) | Incubation de 20 minutes   |
| Visualisation      | EnVision™ FLEX, High pH (réf. K8000/K8010)      | Incubation de 20 min, 2 incubations de 5 minutes avec le DAB+  |
| Contre-coloration  | EnVision™ FLEX Hematoxylin (réf. K8008/K8018)   | Incubation de 5 minutes  |
| Tissu de contrôle  | Amygdale, prostate                              | Coloration nucléaire   |
| Lames              | FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020)         | Recommandées pour une meilleure adhérence des coupes de tissus aux lames de verre.   |
| Montage            | Milieu de montage permanent non aqueux requis   | Une fois la procédure de coloration terminée, les coupes doivent être déshydratées, éclaircies et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent. |
| Appareillage       | Autostainer Link 48 et Autostainer Plus         | Utiliser les flacons propres à l'instrument (réf. SK200-SK203 et S3425)  |

\*L'utilisateur doit toujours lire la notice pour obtenir des instructions détaillées sur la procédure de coloration et sur la manipulation du produit.

## Préparation des échantillons

Coupes en paraffine : L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus incluses en paraffine et fixées au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons tissulaires doit être d'environ 4 µm.

Prétraitement : Le prétraitement des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine par restauration d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus par la méthode HIER à l'aide de la solution diluée EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (réf. K8004). Le déparaffinage, la réhydratation et la restauration d'épitope peuvent être réalisés sur l'appareil Dako PT Link (réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du

PT Link. Les paramètres suivants doivent être utilisés pour le PT Link : température de préchauffage : 65 °C ; température et durée de la restauration d'épitope : 97 °C pendant 20 (±1) minutes ; laisser refroidir jusqu'à 65 °C. Retirer le portoir à lames de la cuve et plonger immédiatement les lames dans une jarre/cuve (ex. : PT Link Rinse Station, réf. PT109) contenant du EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (réf. K8007) dilué à température ambiante. Laisser les lames dans le tampon de lavage pendant 1 à 5 minutes.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique qui suit. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser les lames FLEX IHC Microscope Slides (réf. K8020). Après la coloration, les sections doivent être déshydratées, éclaircies et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.

#### Procédure de coloration

**Dilution :** La dilution recommandée pour l'anticorps Monoclonal Mouse Anti-Human p63 Protein, Clone DAK-p63, réf. M7317, est de 1:50. Diluer l'anticorps dans le diluant Dako Antibody Diluent (réf. S0809). Incuber les coupes de tissu prétraitées pendant 20 minutes à température ambiante. Il ne s'agit là que de conseils. Les conditions optimales peuvent varier en fonction de l'échantillon et de la méthode de préparation, et doivent être validées individuellement par chaque laboratoire.

**Contrôle négatif :** Le réactif de contrôle négatif recommandé est le Dako Negative Control, Mouse IgG2a (réf. X0943), dilué à la même concentration en IgG que l'anticorps primaire. À moins que la stabilité de l'anticorps dilué et du contrôle négatif n'ait été établie lors de la procédure de coloration en cours, diluer ces réactifs immédiatement avant utilisation. Les contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient.

**Visualisation :** Le système de visualisation recommandé est le système EnVision™ FLEX, High pH (réf. K8000/K8010) avec une durée d'incubation de 20 minutes, à température ambiante. Suivre la procédure incluse dans le ou les systèmes de visualisation choisis.

**Automatisation :** L'anticorps est bien adapté à la coloration immunohistochimique sur les plates-formes automatisées, telles que les systèmes Dako Autostainer, Autostainer Plus et Autostainer Link ainsi que le PT Link pour le prétraitement.

**Contre-coloration :** Le contre-colorant recommandé est le produit EnVision™ FLEX Hematoxylin (réf. K8008/K8018). Pour des résultats optimaux, l'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

**Contrôles :** Des tissus de contrôle positif et négatif doivent être testés en même temps et en suivant le même protocole que les échantillons de patient. Le tissu de contrôle positif doit comprendre l'amygdale et la prostate, et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que décrits pour ces tissus dans la section "Performances".

#### Interprétation de la coloration

Le motif de coloration cellulaire est nucléaire. Une coloration cytoplasmique dans les tissus anormaux a également été rapportée (12).

#### Performances

**Tissus sains :** Dans l'amygdale, les cellules épidermoïdes de l'épithélium présentent une coloration modérée à forte, tandis que dans la prostate, les cellules épidermoïdes basales présentent une coloration faible à modérée. Occasionnellement, un marquage cytoplasmique au niveau des granulocytes peut être observé.

| Type de tissu (nb. testés) | Éléments tissulaires positifs                           | Type de tissu (nb. testés) | Éléments tissulaires positifs  |
|----------------------------|---|----------------------------|--|
| Surrénale (3)              | 3/3 cellules surrénales (30%), coloration cytoplasmique | Ovaire (3)                 | 0/3  |
| Moelle osseuse (3)         | 0/3   | Pancréas (3)               | 3/3 cellules des îlots pancréatiques (100%), coloration cytoplasmique      |
| Sein (3)                   | 3/3 cellules basales (90%), coloration nucléaire        | Hypophyse (3)              | 3/3 cellules adénohypophysaires (100%), coloration cytoplasmique           |
| Cervelet (3)               | 0/3   | Placenta (3)               | 1/3 cellules syncytiotrophoblastiques (10%), coloration nucléaire          |
| Cerveau (3)                | 0/3   | Prostate (3)               | 3/3 cellules basales (100%), coloration nucléaire                          |
| Col de l'utérus (3)        | 3/3 cellules basales (100%), coloration nucléaire       | Glande salivaire (3)       | 3/3 cellules basales myoépithéliales (90%), coloration nucléaire           |
| Côlon (3)                  | 0/3   | Peau (3)                   | 3/3 cellules épithéliales et cellules basales (100%), coloration nucléaire |
| Endomètre (3)              | 0/3   | Intestin grêle (3)         | 2/3 cellules épithéliales (10%), coloration cytoplasmique                  |
| Œsophage (3)               | 3/3 cellules épithéliales (100%), coloration nucléaire  | Moelle épinière (3)        | 0/3  |
| Trompe de Fallope (3)      | 3/3 cellules basales (50%), coloration nucléaire        | Rate (3)                   | 0/3  |
| Rein (3)                   | 0/3   | Estomac (3)                | 3/3 cellules glandulaires (30-100%), coloration cytoplasmique              |
| Foie (3)                   | 0/3   | Testicule (3)              | 0/3  |
| Poumon (3)                 | 1/3 cellules basales (100%), coloration nucléaire       | Thyroïde (3)               | 0/3  |
| Ganglion lymphatique (3)   | 0/3   | Amygdale (3)               | 3/3 cellules épithéliales (100%), coloration nucléaire                     |
| Muscle, cardiaque (3)      | 0/3   | Utérus (3)                 | 2/3 cellules épithéliales (< 1%), coloration nucléaire                     |
| Muscle, squelettique (3)   | 0/3   | Uretère (3)                | 3/3 cellules épithéliales (100%), coloration nucléaire                     |
| Nerf périphérique (3)      | 0/3   | Vessie (3)                 | 3/3 cellules épithéliales (100%), coloration nucléaire                     |

Tissus anormaux : L'anticorps a marqué les éléments suivants : cellules basales de 10/10 hyperplasies de la prostate et cellules myoépithéliales de 5/5 carcinomes du sein *in situ*, 6/6 carcinomes épidermoïdes pulmonaires, 6/6 carcinomes épidermoïdes du col utérin, 0/10 carcinomes de la prostate, 3/3 carcinomes du sein, 4/6 adénocarcinomes du col de l'utérus et 4/6 adénocarcinomes pulmonaires (14).

**Verwendungszweck**

Zur In-vitro-Diagnostik.

Monoclonal Mouse Anti-Human p63 Protein, Clone DAK-p63, ist zur Verwendung in der Immunhistochemie bestimmt. Antikörper gegen Protein p63, das die Proliferation basaler Epithelzellen reguliert (1), können für die Erkennung von Adenokarzinomen der Prostata eingesetzt werden, wo sie als Hilfsmittel bei der Differenzierung zwischen gutartigen Prostataläsionen und Adenokarzinomen der Prostata dienen (2, 3). Antikörper gegen das Protein p63 können auch als Hilfsmittel bei der Differenzierung zwischen In-situ-Brustkarzinomen und Brustkarzinomen dienen (4), zur Unterscheidung eines Plattenepithelkarzinoms von einem Adenokarzinom der Lunge (5, 6) und zur Unterscheidung eines Plattenepithelkarzinoms der Zervix von einem Adenokarzinom der Zervix (7). Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit geeigneten Kontrollen ergänzt und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer diagnostischer Tests des Patienten vorgenommen werden.

**Synonyme  
Bezeichnungen  
des Antigens**

Tumorprotein (p63).

**Zusammenfassung  
und Erklärung**

Das Protein p63 gehört ebenso wie p73 zur p53-Familie. Das p63-Gen kodiert für verschiedene Isoformen: Isoformen mit einer potenten aminoterminalen Transaktivierungsdomäne (TAp63-Isoformen) und Isoformen ohne diese Domäne (ΔNp63-Isoformen) (8, 9). Obwohl die TAp63-Isoformen p53-Zielgene, wie z. B. Bax und p21<sup>WAF1/CEP1</sup> transaktivieren und eine Apoptose und einen Zellzyklusarrest induzieren können (10), handelt es sich bei p63 nicht um einen Tumorsuppressor (9). Die ΔNp63-Isoformen konkurrieren auf dominant-negative Weise um die p53-Zielgene und fördern indirekt das Zellwachstum, indem sie die Apoptose- und Zellzyklusarrest-Aktivierung durch TAp63-Isoformen und p53 konterkarieren (1, 10, 11).

p63 ist ein Marker für nicht-invasive epitheliale Tumoren, während bei invasiveren Tumoren ein Ausfall der p63-Expression festgestellt wird, was darauf hindeutet, dass ein Ausfall der p63-Expression die Entstehung von Tumoren und Metastasen beschleunigt (10). Das Fehlen von p63 ist jedoch kein zuverlässiger Marker für Invasivität, und obwohl p63 bei dem wenigsten Brustkarzinomen exprimiert wird, kommt es in seltenen Fällen zu einer nuklearen p63-Expression (9).

Häufig liegt bei Tumoren eine simultane transkriptionale Hochregulation der TAp63-Isoformen sowie der ΔNp63-Isoformen vor, wobei ΔNp63 auf der Proteinebene vorherrscht. Einige Lungenkarzinome und Plattenepithelkarzinome des Kopfs und Nackens weisen eine p63-Protein-Überexpression auf, verbunden mit einem leichten Anstieg der p63-Genkopienzahlen. Größtenteils handelt es sich bei p63-Isoformen jedoch um ΔNp63-Isoformen. Auch bei nasopharyngealen Karzinomen und Plattenepithelkarzinomen der Speiseröhre machen ΔNp63-Isoformen den Großteil der Isoformen aus (9).

Das p63-Protein kommt überwiegend in den Basalzellen von normalem Epithel in Ektozervix, Speiseröhre, Prostata, Haut, Mandeln, Urothel und Vagina sowie in Basalzellen in Drüsenstrukturen der Brust, Bronchien und Prostata vor. Daneben wird das p63-Protein in Myoepithelzellen der Brust exprimiert (9).

Folgende Angaben bitte den [General Instructions for Immunohistochemical Staining](#) (Allgemeine Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung) von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen:

**Delivered Reagent**

Monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form als Zellkulturüberstand (mit fetalem Rinderserum), gegen 0,05 mol/L Tris-HCl, pH 7,2 und 0,015 mol/L Natriumazid dialysiert

Klon: DAK-p63. Isotyp: IgG2a, kappa.

Konzentration Maus-IgG mg/L: Siehe Behälteretikett.

Die Proteinkonzentration kann bei den Chargen verschieden ausfallen, ohne die optimale Verdünnung zu beeinflussen. Der Titer wird bei jedem einzelnen Los mit einem Referenzlos verglichen und diesem angeglichen, um konstante immunhistochemische Färbeargebnisse zwischen den Losen zu gewährleisten.

**Immunogen**

Synthetisches Peptid aus der DNA-bindenden Kerndomäne des humanen Tumorproteins p63

**Spezifität**

Beim Western-Blotting weist der Antikörper Banden nach, die dem jeweiligen erwarteten Molekulargewicht und Expressionsmuster der verschiedenen Isoformen (TAp63- und ΔNp63-Isoformen) von p63 bei einem HCC1806-Plattenepithelzellkarzinom-Lysat und bei Dickdarmkrebs entsprechen.

**Hinweise und  
Vorsichtsmaßnahmen**

1. Für geschultes Fachpersonal.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (Na<sub>3</sub>), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Ansammlungen von Natriumazid können auch in Konzentrationen, die nicht als gefährlich klassifiziert sind, mit Blei- und Kupferabflussrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
3. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden.
4. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend der örtlichen, staatlichen und EU-rechtlichen Bestimmungen zu entsorgen.

**Lagerung**

Bei 2 bis 8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Behälter aufgedruckten Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien nicht entsprechend den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen die Bedingungen vom Anwender geprüft werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Falls eine unerwartete Färbung auftritt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

**Kurzanleitung\***

| Schritt           |   | Anmerkungen  |
|-------------------|---|--|
| Fixierung         | Formalin  |  |
| Vorbehandlung     | EnVision FLEX™, High pH (Code-Nr. K8004)            | 20 Min. HIER, 3-in-1 mit PT Link und PT Link Rinse Station                       |
| Verdünnung        | 1:50  | 20 Min. Inkubation   |
| Verdünnungspuffer | Dako Antibody Diluent (Code-Nr. S0809)              | Unmittelbar vor Verwendung verdünnen   |
| Negativkontrolle  | Dako Negative Control, Mouse IgG2a (Code-Nr. X0943) | 20 Min. Inkubation   |
| Detektionssystem  | EnVision™ FLEX, High pH (Code-Nr. K8000/K8010)      | 20 Min. Inkubation, 2 x 5 Min. DAB+ Inkubation                                   |
| Gegenfärbung      | EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code-Nr. K8008/K8018)   | 5 Min. Inkubation  |
| Kontrollgewebe    | Tonsille, Prostata                                  | Nukleare Färbung   |
| Objektträger      | FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020)         | Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte an den Glas-Objektträgern empfohlen. |

|           |  |   |
|-----------|--|---|
| Eindecken | Nichtwässriges, permanentes Eindecken erforderlich | Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und unter Verwendung eines permanenten Eindeckmediums auf Objektträger eingedeckt werden. |
| Geräte    | Autostainer Link 48 und Autostainer Plus           | Gerätespezifische Behälter verwenden (Code-Nr. SK200-SK203 und Code-Nr. S3425)  |

\*Der Anwender muss stets die Packungsbeilage lesen, um sich über die detaillierten Anweisungen für das Färbeverfahren und die Handhabung des Produkts zu informieren.

## Probenvorbereitung

**Paraffinschnitte:** Der Antikörper kann für die Markierung von formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten verwendet werden. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

**Vorbehandlung:** Es ist eine Vorbehandlung der formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitte durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) erforderlich. Optimale Ergebnisse können durch HIER-Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8004) erzielt werden. Entparaffinierung, Rehydrierung und Epitopdemaskierung können in Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) durchgeführt werden. Weitere Informationen hierzu: siehe PT Link Benutzerhandbuch. Für PT Link sollten die folgenden Parameter verwendet werden: Vorwärmtemperatur: 65 °C; Temperatur und Zeit für Epitopdemaskierung: 20 (±1) Minuten bei 97 °C; auf 65 °C abkühlen. Das Objektträgergestell mit den Objektträgern aus dem Behälter herausnehmen und die Objektträger sofort in einen Behälter (z. B. PT Link Rinse Station, Code-Nr. PT109) mit verdünntem, auf Zimmertemperatur gebrachttem EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (Code-Nr. K8007) eintauchen. Die Objektträger 1 bis 5 Minuten lang im Waschpuffer belassen.

Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern wird die Verwendung von FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen. Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und unter Verwendung eines permanenten Eindeckmediums auf Objektträger eingedeckt werden.

## Färbeverfahren

**Verdünnung:** Die empfohlene Verdünnung des Monoclonal Mouse Anti-Human p63 Protein, Clone DAK-p63, Code-Nr. M7317, ist 1:50. Den Antikörper in Dako Antibody Diluent (Code-Nr. S0809) verdünnen. Die vorbehandelten Gewebeschnitte 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren. Diese Angaben sind nur Richtlinien. Optimale Bedingungen können je nach Probe und Vorbereitungsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor einzeln validiert werden.

**Negativkontrolle:** Als Negativkontrollreagenz wird Dako Negative Control, Mouse IgG2a (Code-Nr. X0943), empfohlen, das auf dieselbe Ig-Konzentration wie der primäre Antikörper verdünnt wurde. Falls die Stabilität des verdünnten Antikörpers und der Negativkontrolle für das verwendete Färbeverfahren nicht erwiesen ist, wird empfohlen, diese Reagenzien unmittelbar vor der Verwendung zu verdünnen. Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit wie die Patientengewebe getestet werden.

**Detektionssystem:** Das empfohlene Detektionssystem ist EnVision™ FLEX, High pH (Code-Nr. K8000/K8010) mit 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Das für das ausgewählte Detektionssystem beschriebene Verfahren befolgen.

**Automatisierung:** Der Antikörper eignet sich sehr gut für immunhistochemische Färbungen mit automatisierten Systemen, z. B. mit Dako Autostainer, Autostainer Plus und Autostainer Link sowie PT Link für die Vorbehandlung.

**Gegenfärbung:** Als Gegenfärbung wird EnVision™ FLEX Hematoxylin (Code-Nr. K8008/K8018) empfohlen. Für optimale Ergebnisse wird ein nichtwässriges permanentes Eindeckmedium empfohlen.

**Kontrollen:** Positiv- und Negativkontrollgewebe sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientengewebe getestet werden. Das Positivkontrollgewebe sollte Mandeln und Prostata enthalten und die Zellen/Strukturen müssen die unter „Leistungseigenschaften“ für dieses Gewebe beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen.

## Auswertung der Färbung

Das zelluläre Färbemuster ist nuklear. Eine zytoplasmatische Färbung bei anormalem Gewebe ist ebenfalls beschrieben worden (12).

## Leistungseigenschaften

**Normale Gewebe:** In Mandelgewebe weisen die Plattenepithelzellen eine mäßige bis starke Färbereaktion auf. In Prostatagewebe weisen die Basalepithelzellen eine schwache bis mäßige Färbereaktion auf. Gelegentlich kann eine zytoplasmatische Markierung von Granulozyten auftreten.









| Gewebetyp (Anz. getestet) | Positive Gewebe-Elemente                         | Gewebetyp (Anz. getestet) | Positive Gewebe-Elemente                              |
|---------------------------|--|---------------------------|---|
| Nebenniere (3)            | 3 von 3 Nebennierenzellen (30%), zytoplasmatisch | Eierstöcke (3)            | 0 von 3   |
| Knochenmark (3)           | 0 von 3  | Pankreas (3)              | 3 von 3 Inselzellen (100%), zytoplasmatisch           |
| Brust (3)                 | 3 von 3 Basalzellen (90%), nuklear               | Hypophyse (3)             | 3 von 3 Hypophysenzellen (100%), zytoplasmatisch      |
| Zerebellum (3)            | 0 von 3  | Plazenta (3)              | 1 von 3 Synzytiotrophoblastzellen (<10 %), nuklear    |
| Zerebrum (3)              | 0 von 3  | Prostata (3)              | 3 von 3 Basalzellen (100%), nuklear                   |
| Zervix (3)                | 3 von 3 Basalzellen (100%), nuklear              | Speicheldrüse (3)         | 3 von 3 Myoepithelzellen (90%), nuklear               |
| Dickdarm (3)              | 0 von 3  | Haut (3)                  | 3 von 3 Epithelzellen und Basalzellen (100%), nuklear |
| Endometrium (3)           | 0 von 3  | Dünndarm (3)              | 2 von 3 Epithelzellen (10%), zytoplasmatisch          |
| Speiseröhre (3)           | 3 von 3 Epithelzellen (100 %), nuklear           | Rückenmark (3)            | 0 von 3   |
| Eileiter (3)              | 3 von 3 Basalzellen (50%), nuklear               | Milz (3)                  | 0 von 3   |
| Niere (3)                 | 0 von 3  | Magen (3)                 | 3/3 Drüsenzellen (30-100%), zytoplasmatisch           |
| Leber (3)                 | 0 von 3  | Hoden (3)                 | 0 von 3   |
| Lunge (3)                 | 1 von 3 Basalzellen (100%), nuklear              | Schilddrüse (3)           | 0 von 3   |
| Lymphknoten (3)           | 0 von 3  | Tonsille (3)              | 3 von 3 Epithelzellen (100%), nuklear                 |
| Herzmuskel (3)            | 0 von 3  | Uterus (3)                | 2 von 3 Epithelzellen (<1%), nuklear                  |
| Skelettmuskulatur (3)     | 0 von 3  | Ureter (3)                | 3 von 3 Epithelzellen (100%), nuklear                 |
| Nerv, peripher (3)        | 0 von 3  | Harnblase (3)             | 3 von 3 Epithelzellen (100 %), nuklear                |

**Anormale Gewebe:** Der Antikörper markierte Basalzellen bei 10 von 10 Prostatahyperplasien und Myoepithelzellen bei 5 von 5 In-situ-Brustkarzinomen. Der Antikörper markierte 6 von 6 Plattenepithelkarzinomen der Lunge, 6 von 6 Plattenepithelkarzinomen der Gebärmutterzervix, 0 von 10 Prostatakarzinomen, 3 von 3 Brustkarzinomen, 4 von 6 Adenokarzinomen der Zervix und 4 von 6 Adenokarzinomen der Lunge (14).

## References/ Bibliografie/ Literaturnachweis

1. Di Como CJ, Marshall J, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, et al. p63 expression profiles in normal and tumor tissues. Clin Cancer Res 2002;8:494-501.
2. Leong Ng WV, Koh M, Tan SY, Tan PH. Is triple immunostaining with 34βE12, p63, and racemase in prostate cancer advantageous? A tissue microarray study. Am J Clin Pathol 2007;127:248-53.
3. Parsons JK, Gage WR, Nelson WG, De Marzo AM. p63 protein expression is rare in prostate adenocarcinoma: Implications for cancer diagnosis and carcinogenesis. Urology 2001;58:619-24.
4. Werling RW, Harry Hwang H, Yaziji H, Gown AM. Immunohistochemical distinction of invasive from noninvasive breast lesions. A comparative study of p63 versus calponin and smooth muscle myosin heavy chain. Am J Surg Path 2003;27:82-90.
5. Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. Mod Pathol 2011;24:1348-59.
6. Conde E, Angulo B, Redondo P, Toldos O, Garcia-Garcia E, Suarez-Gauthier A, et al. The use of P63 immunohistochemistry for the identification of squamous cell carcinoma of the lung. PLoS One 2010;5:e12209.
7. Wang T-Y, Chen, B-F, Yang Y-C, Chen H, Wang Y, Cviko A, et al. Histologic and immunophenotypic classification of cervical carcinomas by expression of the p53 homologue p63: a study of 250 cases. Human Path 2001;32:479-86.
8. Marin MC, Kaelin WG, Jr. p63 and p73: old members of a new family. Biochimica et biophysica acta. 2000;1470(3):M93-M100.
9. Moll UM, Slade N. p63 and p73: Roles in Development and Tumor Formation. Mol Cancer Res 2004;2:371-86.
10. Melino C. p63 is a tumor suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53. Cell Death and Diff. 2011;18:1487-99.
11. Courtois S, de Fromentel CC, Hainaut P. p53 protein variants: structural and functional similarities with p63 and p73. Oncogene 2004;23, 631-8.
12. Narahashi T, Niki W, Wang T, Goto A, Matsubara D, Funata N, et al. Cytoplasmic localization of p63 is associated with poor patient survival in lung adenocarcinoma. Histopathology 2006;49:349-57.
13. Dako in-house documentation D13339
14. Dako in-house documentation D14507

## Explanation of symbols / Explication des symboles / Erläuterung der Symbole

|   |  |   |   |   |  |
|---|--|---|---|---|--|
|  REF   | Catalogue number<br>Référence du catalogue<br>Katalognummer  |  2°C - 8°C | Temperature limitation<br>Limites de température<br>Zulässiger Temperaturbereich  |    | Use by<br>Utiliser avant<br>Verwendbar bis |
|  IVD | In vitro diagnostic medical device<br>Dispositif médical de diagnostic in vitro<br>In-vitro-Diagnostikum |  LOT     | Batch code<br>Réf. du lot<br>Chargenbezeichnung   |  | Manufacturer<br>Fabricant<br>Hersteller    |
|      | Consult instructions for use<br>Consulter les instructions d'utilisation<br>Gebrauchsanweisung beachten  |  EC REP  | Authorized representative in the European Community<br>Représentant agréé dans la Communauté européenne<br>Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft |   |  |



Agilent Technologies Singapore (International) Pte Ltd.  
No. 1 Yishun Avenue 7  
Singapore, 768923  
Tel. +44 161 492 7050  
www.agilent.com

Revision / Révision / Revision 2020.11