Uttrykk av gener for potensielle progresjonsmarkører i cervix prøver med cervical intraepithelial neoplasia 3 forårsaket av humant papillomavirus 16, 18 og 58.

Gene expression from candidate markers for progression in cervical samples diagnosed as cervical intraepithelial neoplasia 3 caused by human papillomavirus 16, 18 and 58.

Hanne Kristiansen-Haugland

Universitetet for miljø- og biovitenskap
Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap
Masteroppgave 60 studiepoeng 2013

Forord

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved Genteknologisk seksjon tilknyttet Tverrfaglig laboratoriemedisin og Medisinsk biokjemi ved Akershus Universitetssykehus i perioden august 2010 til mai 2013. Masteroppgaven inngår som en del av mastergraden ved Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap (UMB).

En stor spesiell takk går til min veileder Christine Monceyron Jonassen, for introduksjon til HPV's verden og muligheten til å gjennomføre denne masteroppgaven. Hun har vært en stor faglig inspirator, en ubegrenset kilde til kunnskap om HPV og ikke minst gitt god hjelp gjennom alle praktiske og faglige utfordringer. Uten din tålmodighet ville denne oppgaven aldri sett dagens lys. En varm takk gis til medstudent og tidligere kollega, Mona L. Hansen ved HPV referanselaboratorium, Ahus. Tusen takk for at du har delt så mye av din erfaring, dine resultater, gode råd, ditt humør og dine mange innspill underveis. En stor takk går også til G. Cecilie Alfsen for gjennomgang av histologisk materiale. Jeg vil takke alle tidligere kollegaer ved Genteknologisk seksjon, Ahus, for deres inkluderende holdninger, gode faglige råd og hyggelige samtaler på lab underveis i arbeidet med oppgaven. May Tove, Chris, Vahid, Roger, Thu, Ellen, Alex, Turid, Cathrine, Beth, Gro, Eva, Yngve, Benoit, Anette, Thulasika, Irmelin og ikke minst seksjonsleder Hege. Dere er fantastiske alle sammen. Og selvfølgelig en spesiell takk til familie og venner som har utvist stor forståelse for min prioritering for å ferdigstille denne oppgaven. Tusen hjertelig takk til 'bestemor' Aase og 'mimmi' Birte. Askil har definitivt fått de beste 'bestemødrene'. Til sist en varm takk til min mann, Halvar, for korrekturlesning og for at du er den du er. Prosessen har vært lang og mer komplisert enn planlagt, men nå er vi i mål. Jeg er så glad i dere.

Oslo, mai 2012

Hanne Kristiansen-Haugland

Sammendrag

Livmorhalskreft er en av de mest forekommende krefttypene hos kvinner. Flere enn 500.000 tilfeller blir diagnostisert hvert år og på verdensbasis dør omtrent 275.000 kvinner årlig av denne kreftformen. Det er nå vist at persisterende infeksjon med bestemte høy risiko typer av HPV, er en nødvendig årsak til utvikling av livmorhalskreft.

HPV assosierte celleforandringer kan gå i regress. 90 % av alle HPV infeksjoner vil klareres innen 2-4 år. Mindre enn 50 % av tilfellene med høygradig celleforandring progredierer til å bli invasivt karsinom og utvikles via forstadier til kreft som regel over 10-20 år. I dag benyttes screeningprogrammer med cytologi i primærscreening og HPV DNA testing i enkelt tilfeller, for å oppdage tilfeller med celleforandring og livmorhalskreft. Å finne molekylære markører som kan skille ut pasienter med en høy risiko for progresjon, vil være svært verdifullt. For eksempel er mRNA testing for HPV E6 og E7 sannsynligvis en bedre progresjonsmarkør enn påvisning av viralt DNA for å finne de tilfeller som vil kunne utvikles til livmorhalskreft.

Hensikten med oppgaven har vært å avdekke mulige forskjeller i genuttrykk av både virale onkogener og cellulære gener med biomarkør potensiale på lesjoner med samme alvorlighetsgrad, som skyldes ulike HPV typer.

Masteroppgaven er basert på analyse av konisert vev fra livmorhalsen som er samlet inn i forbindelse med et tverrfaglig HPV prosjekt ved Akershus Universitetssykehus i tidsrommet 2005-2009. Pasienter hvor cytologisk prøve er positiv for kun en HPV type, enten 16, 18 eller 58, og histologiprøven er diagnostisert med CIN3 ble valgt ut. For å studere det spesifikke genuttrykket for områder med lesjon, ble det benyttet lasermikrodisseksjon (LCM). De virale onkogenene HPV E6 og E7, samt de humane genene p16/CDKN2A, Serpin B5, TMEM 45A og hTERT ble undersøkt i studien.

Resultatene viser at det relative uttrykket av de to onkogener skiller seg markant ut mellom HPV 16 positive prøver, og de to andre HPV typene. Det var til gjengjeld ingen signifikante forskjeller for uttrykkene mellom prøver positive for HPV 18 og 58. For de cellulære genene p16/CDKN2A og TMEM45 ble det avdekket et signifikant høyere uttrykk i HPV 58 positive prøver sammenlignet mot HPV 16. De andre cellulære genene, Serpin B5, viste ingen signifikante forskjeller mellom de ulike HR HPV typene mens

hTERT ikke ble konsekvent uttrykt i de ulike HR HPV positive prøver. Våre funn viser at studier for identifisering av progresjonsmarkører utført på HPV 16 positive prøver bør verifiseres for andre HR-HPV.

Abstract

Cervical cancer is one of the most commonly occurring cancer types in women. More than 530,000 cases are diagnosed each year worldwide and close to 275,000 women die of this cancer each year. It is now known that persistent infection with certain high-risk types of HPV is a necessary cause of cervical cancer.

HPV-associated cervical dysplasia, can go to regress. 90 % of all HPV infections will be cleared within 2-4 years. Less than 50 % of cases with high-grade cervical dysplasia progress to become invasive carcinoma and that develop normally over 10-20 years. Today in Norway, currently used screening programs with cytology in primary screening and HPV DNA testing in individual cases, are used to detect precancerous lesions and cervical cancer. To find molecular markers that can distinguish patients with a high risk of progression, will be very valuable. For example will mRNA testing for HPV E6 and E7 probably be a better marker for progression than the detection of viral DNA in order to detect cases who will be at more risk to develop cervical cancer.

The purpose of the study was to study gene expression of viral oncogenes and candidate biomarker cellular genes in lesions with the same histological diagnosis, but caused by different HPV types, with different association to progression.

The thesis is performed on analysis of cervical tissue after conisation that is collected in connection with an interdisciplinary HPV project at Akershus University Hospital in the period 2005-2009. Patients in whom cervical smear is positive for only one HPV type, either 16, 18 or 58, and histology is diagnosed with CIN3 were selected. To study the gene expression of specific areas of the lesion, there were used lasercapturemicrodissection (LCM). The viral oncogenes E6 and E7 HPV and the human genes p16/CDKN2A, Serpin B5, TMEM 45A and hTERT were examined in the study.

The results indicate that the relative expression of the two oncogenes differs markedly from HPV 16 positive samples and the other two HPV types. There were no significant differences in return for expressions between HPV 18 and 58. The cellular genes p16/CDKN2A and TMEM45 revealed a significant higher expression in HPV 58 positive samples compared to HPV 16. The other human genes, Serpin B5, showed no significant difference between the different HR HPV types while hTERT were not consistently

expressed in samples of different HR HPV type. Our findings indicate that studies for identification of progression markers for HPV 16 positive samples should be verified for other HR HPV types.

Ordliste

AHUS	Akershus Universitetssykehus
ASC-H	Atypical Squamous Cells-cannot rule out a High grade lesion
ASC-US	Atypical Squamous Cells of Undetermined lesion
CDK4/6	Cyclin Dependent Kinase 4/6
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
cDNA	Complementary Deoxyribonucleinacid
CIN	Cervical Intraepithelial Neoplasia
CIS	Cancer *In Situ*
DNA	Deoxsyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase
HE	Hematoxylin-Eosin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPS	Hematoxylin-Phloxine-Safran
HR HPV	High Risk Human Papilloma Virus
HSIL	High Grade Squamous Intraepithelial Lesion
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
LCM	Lasercapturemicrodissection
LR HPV	Low Risk Human Papilloma Virus
LSIL	Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion
MDM2	Mouse Double Minute 2 homolog (E3 ubiquitin-protein ligase)
MgCl2	Magnesium chloride
NCR	Non Coding Region
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
Rb	Retinoblastoma
REK	Regional Etisk Komite
RNA	Ribonucleic acid
SCJ	Squamo Columnar Junctions
TMEM 45A	Transmembrane Protein 45A
WHO	World Health Organisation

Innholdsfortegnelse

Forord **1**

Sammendrag **2**

Abstract **4**

Innledning **9**

1.1 Livmorhalskreft 9

1.1.1 Livmorhalsens anatomi og transformasjonssonen *10*

1.1.2 Humant papillomavirus og livmorhalskreft *11*

1.1.3 HPV infeksjon, celleforandringer og progresjon til kreft *11*

1.1.4 Påvisning, oppfølging og behandling av celleforandring *13*

1.1.5 HPV vaksinering *14*

1.2 Humant papillomavirus (HPV) 15

1.2.1 Viral struktur og DNA *15*

1.2.2 Klassifisering *17*

1.2.3 Virus replikasjon og de ulike virale geners funksjon *19*

1.2.4 Syntese av viralt mRNA *21*

1.2.5 Tumorsupressorgener TP53 og Retinoblastomaprotein (RB1) *23*

1.3 Potensielle biomarkører for progresjon 25

1.3.1 Valg av biomarkører *27*

1.3.2 P16/CDKNA-2A *27*

1.3.3 SERPIN B5 ..... *28*

1.3.4 TMEM45A *29*

1.3.5 hTERT *29*

1.3.6 Husholdningsgenet GAPDH *30*

2 Formål med studien **31**

3 Materialer og metoder **32**

3.1 Studiepopulasjonen 32

3.2 Snitting av parafinblokker 33

3.3 Hematoxylin/Phloxine/Safran (HPS) farging av vevsnitt 33

3.4 TaqMan teknologi 34

3.5 Deteksjon av DNA 36

3.5.1 Isolering av DNA *36*

3.5.2 Kvantifisering av DNA *36*
3.5.3 DNA verifisering av HPV diagnose *37*
3.6 Relativ kvantitering av mRNA 38
3.6.1 Lasermikrodisseksjon *38*
3.6.2 Isolering av RNA *39*
3.6.3 cDNA syntese ved revers transkripsjons PCR *40*
3.6.4 Primerdesign *40*
3.6.5 Kvantitering av de to HPV gener for de valgte genotyper *42*
3.6.6 Tillaging av standardmateriale ved kloning *43*
3.6.7 Verifisering av insert *44*
3.6.8 Agarose gel elektroforese *45*
3.6.9 DNA sekvensering *45*
3.6.10 Isolering av plasmid med Purelink™ Quick Plasmid Miniprep Kit *46*
3.6.11 Måling med Nanodrop™ 1000 Spektrofotometer *46*
3.6.12 Tillaging av standardkurve *47*
3.7 Preamplifikasjon av cDNA 48
3.8 Real Time PCR amplifisering av preamplifisert cDNA 49
3.9 Relativ kvantitering med ΔCt mot referansegenet GAPDH 50
3.9.1 Korrigert Ct *51*
3.9.2 Statistisk analyse ved relativ komparativ metode *52*

4 Resultater 54

4.1 Verifisering av HPV type og CIN3 diagnose 54
4.2 Resultat for HPV E6 og E7 55
4.3 Resultat for de cellulære genene 58

5 Diskusjon 61

6 Konklusjon 69

7 Referanser 70

Innledning

1.1 Livmorhalskreft

Kreft er en fellesbetegnelse for ondartet og ukontrollert vekst av celler og vev. Det dannes tumorer som kan invadere omkringliggende og mer distale deler av kroppen. Disse ødelegger normalt vev og opptar næring og oksygen. Metastaser forekommer når små grupper av celler blir frakoblet den originale tumoren og blir fraktet til andre steder ved blod og lymfesystemet. Her gir de utgangspunkt for nye tumorer som er lik opphavstumor (Wolpert 2007).

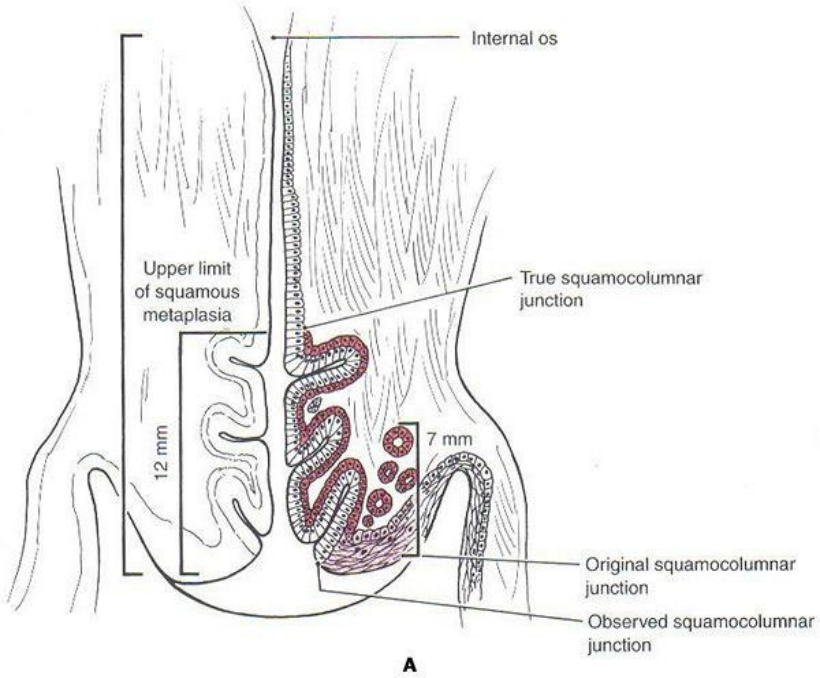
Livmorhalskreft er en av de mest forekommende krefttypene hos kvinner. Flere enn 500.000 tilfeller blir diagnostisert hvert år og på verdensbasis dør omtrent 275.000 kvinner årlig av denne kreftformen. 85 % av tilfellene forekommer i utviklingsland hvor det ikke finnes tiltak som screeningsprogrammer, tilbud om vaksine og behandling. Livmorhalskreft rammer spesielt unge kvinner og nye preventive strategier for å hindre utbredelsen av denne kreftformen i global sammenheng bør igangsettes (Arbyn et al. 2011).

I Norge diagnostiseres omtrent 300 nye tilfeller av livmorhalskreft årlig. I 2010 døde 78 kvinner av denne kreftformen (Kreftregisteret 2010). Før 1995, var det i Norge ingen organisert screening, noe som førte til at noen kvinner på eget initiativ fulgte opp med ny celleprøve hvert år mens andre aldri tok celleprøve. I 1995 ble det etablert et omfattende organisert screeningsprogram i regi av Kreftregisteret ved masseundersøkelsen mot livmorhalskreft. Screeningen består av å ta jevnlige cytologiske celleprøver fra livmorhalsen med 3 års intervall for alle kvinner mellom 25 til 69 år. Kvinnene får invitasjon fra Kreftregisteret til programmet når de fyller 25 år, og senere påminnelse om å delta om de ikke følger de anbefalte intervallene. At denne screeningen nytter er bekreftet ved Nygard, Skare et al. (2002), hvor det ble vist en 22 % nedgang av invasive krefttilfeller ved å sammenligne to år før og to år etter oppstart av screeningsprogrammet. Det vises i tillegg at kvinner som ikke jevnlig tar celleprøve, har 3 ganger så stor risiko for å utvikle høygradig celleforandring, og 20 ganger så stor risiko for kreft i forhold til de som er inkludert i screeningprogrammet (Nygard et al. 2002).

1.1.1 Livmorhalsens anatomi og transformasjonssonen

Livmorhalsen (cervix) er den nedre delen av kvinners forplantningsorgan, livmoren (uterus). Dette er en muskulær kanal hvor nederste del omtales som ectocervix (portio) og den øverste delen som ikke er i kontakt med skjeden (vagina) kalles endocervix.

Ectocervix består av plateepitel lik det som finnes i skjeden, mens endocervix består av slimproduserende sylinderepitel. Forbindelsen mellom disse to epitellag kalles for squamocolumnar junction (SCJ). Dette er en overgangssone som ikke er fiksert men som endrer seg gjennom livet. Under pubertet vil den alltid være posisjonert mot ectocervix og med økt alder beveger denne sonen seg mot endocervix. Denne migreringen forekommer ved en prosess som kalles plateepitelmetaplasi, noe som medfører at sylinderepitel av endocervical type, blir erstattet av lagdelt plateepitel. Denne sonen kalles transformasjonssonen (*IARC Press* 2005), figur 1.1.



Figur 1.1 a) Livmorhalsens anatomi med transformasjonssonen og SCJ
(Figur hentet fra: www.womenshealthsection.com)

1.1.2 Humant papillomavirus og livmorhalskreft

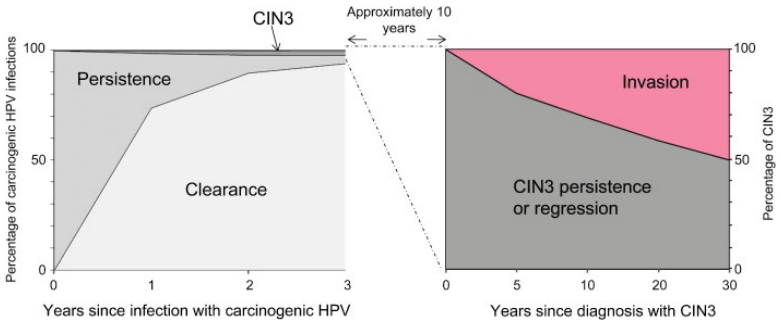
Den første sammenhengen mellom infeksjon med det seksuelt overførbare humant papillomavirus (HPV) og livmorhalskreft, ble publisert på slutten av 1970 tallet (zur Hausen 1994). Det er nå kjent at persisterende infeksjon med bestemte høyrisko (HR) typer av HPV, spesielt i transformasjonssonen, er en nødvendig årsak til utvikling av livmorhalskreft (*IARC Press* 2005; Munoz et al. 2006; Walboomers et al. 1999; zur Hausen 2002).

Gjennom pubertet og graviditet, og ved bruk av orale prevensjonsmidler er transformasjonssonen i ectocervix forstørret. I faser med en forstørret transformasjonssone kan eksponering for HPV viruset føre til en persisterende HPV- infeksjon som kan bidra til utvikling av livmorhalskreft. At HPV er seksuelt overførbar forklarer sammenhengen mellom tidlig seksuell debut, antall seksualpartnere, multiple svangerskap, lang tids bruk av orale prevensjonsmidler (et fåtall) med forekomst av livmorhalskreft. I tillegg til infeksjon med HPV virus er infeksjon med andre seksuelt overførbare sykdommer som chlamydia trachomatis (CT), herpes simplex virus type 2 (HSV2) vist å ha innvirkning ved kreftutviklingspotensialet. Kvinner som er human immunodeficiency virus (HIV) -positive har også større risiko for HPV-infeksjon, som igjen gir økt risiko for kreft (Bosch & de Sanjose 2007).

90 % av all livmorhalskreft er plateepitel karsinom som oppstår i det metaplastiske plate epitelet i transformasjonssonen. De andre 10 % er cervikale adenokarsinomer som oppstår i sylinderepitelet i endocervix (WHO 2006).

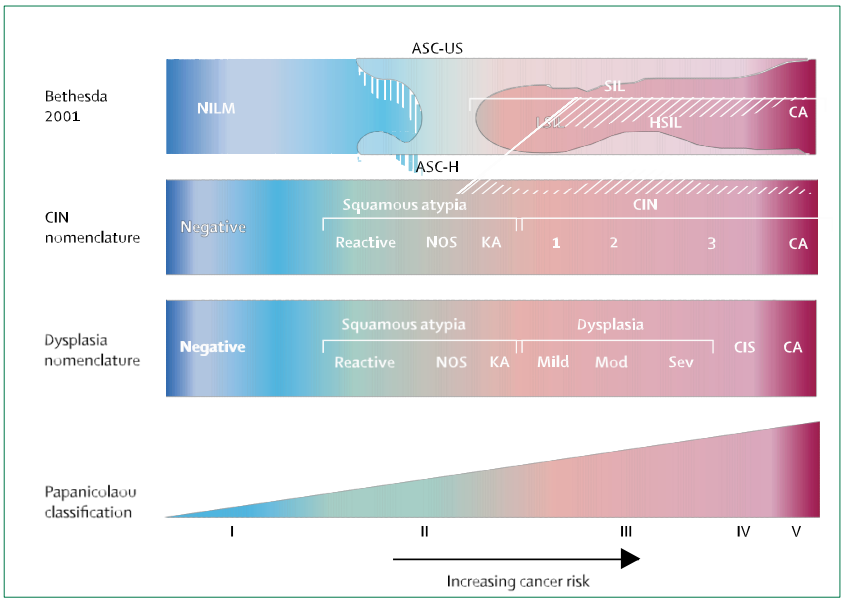
1.1.3 HPV infeksjon, celleforandringer og progresjon til kreft

HPV assosierte celleforandringer, kan gå i regress. 90 % av alle HPV infeksjoner vil klareres innen 2-4 år. Kun 10 % av tilfellene vil persistere og kunne føre til utvikling av høygradig celleforandring. Mindre enn 50 % av tilfellene med høygradig celleforandring progredierer til å bli invasivt karsinom og spesielt blant unge kvinner er denne prosentandelen lav. Det tar som regel 10-20 år for en lesjon å progrediere fra lavgradig celleforandring til invasivt karsinom, noe som gjør dette til en sykdom det er mulig å forebygge ved screening (Schiffman et al. 2007; Schiffman et al. 2011; WHO 2006), figur 1.2.



Figur 1.2 Oversikt over persistens versus klarering, venstre graf viser prosentandel som klareres, persisterer og progredierer til høygradig celleforandring innen 3 år etter første HPV infeksjon. Høyre graf viser andel av høygradig celleforandring som progredierer til kreft hvis ingen behandling utføres (Schiffman et al. 2011).

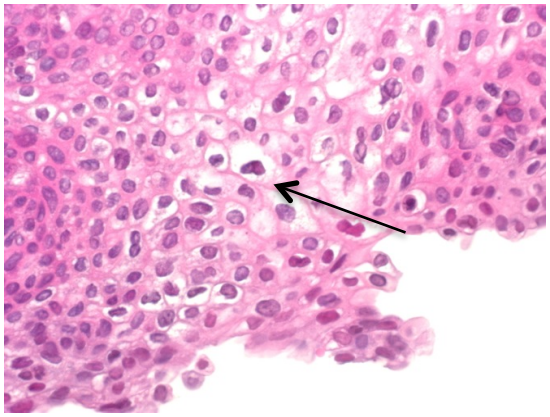
Celleforandringene som kan oppstå som følge av persisterende HPV infeksjon, er tradisjonelt blitt diagnostisert og klassifisert på ulike måter i ulike land. For å få en internasjonal standard for diagnostisering av celleforandringer og kreft ble Bethesda systemet utviklet. Dette ble tatt i bruk for første gang i 1988 og har ført til enklere samarbeid mellom forskningsgrupper i ulike land (Davey 2003), figur 1.3.



Figur 1.3 Oversikt over de ulike klassifiseringer av celleforandringer med Bethesda systemet øverst. CIN: cervical intraepithelial neoplasia LSIL: Low-grade squamous intraepithelial lesion HSIL: High-grade squamous intraepithelial lesion ASC-US: Atypical squamous cells of undetermined significance ASC-H: Atypical squamous cell-cannot rule out a high grade lesion CIS; Cancer in situ (Schiffman et al. 2007).

CIN klassifisering er normalt sett blitt benyttet for histologipreparater mens SIL-

terminologien benyttes for cytologiprøver. Et eksempel på histologisk diagnostisert CIN 3 med HPV infeksjon, farget med HE, sees i figur 1.4. Ved CIN 3 sees store kjerner av uregelmessig størrelse, HPV infeksjon sees ofte som koilocytose; skarpt avgrenset, uregelmessig oppklaring av varierende størrelse rundt kjernene (Solomon 2004)



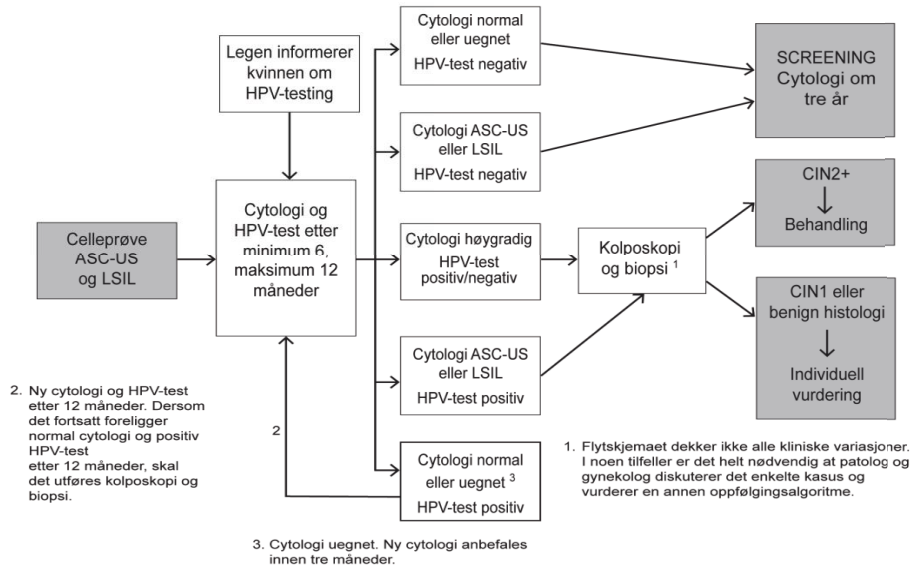
Figur 1.4 Histologisk vevsnitt diagnostisert med CIN 3 og HPV infeksjon. Pil viser en celle med forstørret kjerne og koilocytose, CIN 3 vises i hele bildet.

1.1.4 Påvisning, oppfølging og behandling av celleforandring

I Norge blir kvinner med normale celleprøver henvist til ny rutine screening om 3 år, mens kvinner med celleprøver med høygradige forandringer blir henvist til kolposkopi og biopsi. Masseundersøkelsen mot livmorhalskreft har utarbeidet et flytdiagram for hvilke tester som skal gjøres og hvilken oppfølging kvinner med usikre eller lavgradige forandringer i celleprøven skal ha. Det er kun ved et slikt handlingsforløp at HPV testing ved DNA genotyping benyttes i screeningprogrammet per i dag, (Kreftregisteret 2012)a figur 1.5.

Ved diagnostisering av CIN 2+ i biopsiprøven er behandling påkrevet i Norge. Generelt benyttes konisering som behandling. To ulike teknikker benyttes; kryoterapi eller 'loop electrosurgical excision prosedure' (LEEP).

Behandling ved videreutviklet celleforandring og kreft krever en individuell vurdering og innebærer i tillegg til konisering annen kirurgi samt strålebehandling og cellegift (Sellors 2003).



Figur 1.5 Flytdiagram ved cytologisk/histologisk diagnostisert celleforandring av usikker betydning eller lavgradig celleforandring (Kreftregisteret 2012).

1.1.5 HPV vaksinering

I dag finnes to ulike profylaktiske vaksiner mot HPV som har markedsføringstillatelser. De består begge av viruslignende partikler (VLP) spontant dannet fra det rekombinante kapsid proteinet L1. Den ene, Gardasil® (Merck og Co, Inc., West Point, Pennsylvania, USA), inneholder VLP fra HPV type 6, 11, 16 og 18. HPV type16 og 18 fordi disse forårsaker 70 % av livmorhalskreft på verdensbasis (Wheeler 2008) mens HPV type 6 og 11 forårsaker kjønnsvorter (Howley & Lowy 2007). Den andre vaksinen, Cervarix®, (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium), beskytter mot HPV type 16 og 18.

Oppfølgingsrapporter viser at disse vaksinene er nærmere 100 % effektive mot utvikling av CIN2 og CIN3 som følge av infeksjon med HPV 16 og/eller 18 for de som ikke tidligere har vært eksponert for viruset (FUTURE-II-Study-Group 2007; McKeage & Romanowski 2011). Begge vaksinene har også vist seg til å gi en viss grad av kryss-beskyttelse mot andre høyrisiko HPV typer som 31, 33, 45, 52 og 58, noe som gir en ytterligere potensiell gevinst med vaksinen (Herrero 2009).

I Norge startet vaksinering av jenter som er født i 1997 og fylte 13 år i skoleåret 2009/2010. 69 % valgte å la seg vaksinere og 67 % har fått alle tre dosene som inngår i vaksinen. Vaksinedekninger har økt, og for jenter født i 1999 har 81 % fått første dose og 71 % fått alle tre doser (Folkehelseinstituttet 2013).

Uavhengig av vaksinens omfang og kryss-beskyttelse, er det viktig med fortsatt screeningprogram for vaksinerte kvinner. 30 % av dagens livmorhalskreft tilfeller skyldes andre typer enn HPV 16 eller 18. Det er viktig å overvåke om andre HR-HPV typer vil kunne erstatte HPV 16-18 («type-replacement»), og ytterligere forskning må til i fremtiden (FUTURE-II-Study-Group 2007). På grunn av den store andelen av multippel infeksjoner med HPV, med og uten HPV 16 og 18 involvert (Sjoeborg et al. 2010), virker det som om infeksjon med HPV 16 og 18 ikke beskytter mot infeksjon med andre HPV typer, slik at en ikke nødvendigvis forventer at fraværet av disse to onkogenene vil ha betydning for forekomst og utvikling av de andre HPV typene .

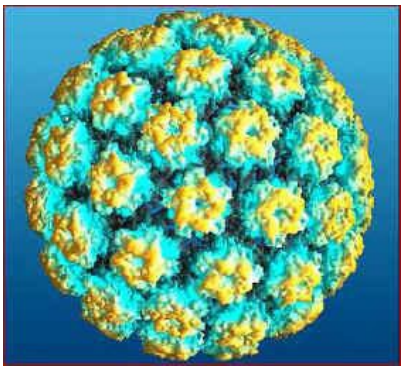
1.2 Humant papillomavirus (HPV)

1.2.1 Viral struktur og DNA

Humant papillomavirus er en gruppe virus som infiserer hudens plateepitellag og forårsaker virusmediert celledeling hos vertsorganismen. I tillegg til at de er vevsspesifikke er de også artsspesifikke og HPV er kun funnet å infisere humant vev.

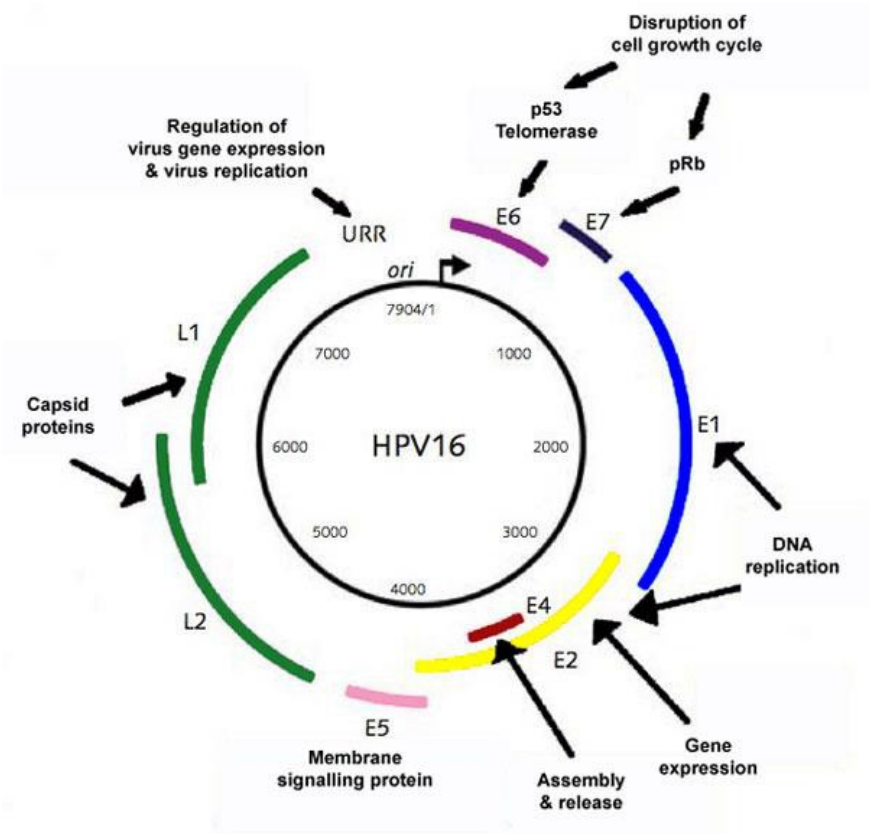
HPV er et lite virus, 55nm i diameter og langt mindre enn andre virus som infiserer huden, blant annet herpes simplex virus og poxvirus. Viruspartikkelen består av en proteinkappe med 72 kapsomerer som omslutter sirkulært dobbeltrådet DNA, figur 1.6. De ligner på polyomavirus og er derfor klassifisert i familie med disse som papova (*pa*pillomavirus*po*lyomavirus-*va*cuolating) virus.

Ved karakterisering av papillomavirus genom, er det avdekket stor sekvensvariasjon hos disse virus. De omtrent 8000 nukleotidene som utgjør genomet koder for 8-10 ulike gener i tillegg til et område med ikke-kodende DNA (NCR). Alle papillomavirus viser dette mønsteret for organisering av genomet (Howley & Lowy 2007).



Figur 1.6 Humant papilloma virus med proteinkappe
(Figur hentet fra: http://hpvvirusinwomen.com)

Genene deles inn i tidlige (E-early) og sene (L-late) gener. L-genene, L1 og L2, koder for dannelse av proteinkappen mens E-genene koder for en rekke proteiner som inngår i ulike deler av virusets livssyklus som virusreplikasjon og transformasjon. NCR regionen har ingen protein-kodende funksjon, men deltar i regulering av replikasjonen via bindingsseter for transkripsjonsfaktorer som inngår i regulering av RNA polymerase II-initiert transkripsjon av L- og E-promotorer (Zheng & Baker 2006). Figur 1.7 viser oversikt over HPV virus genomet.



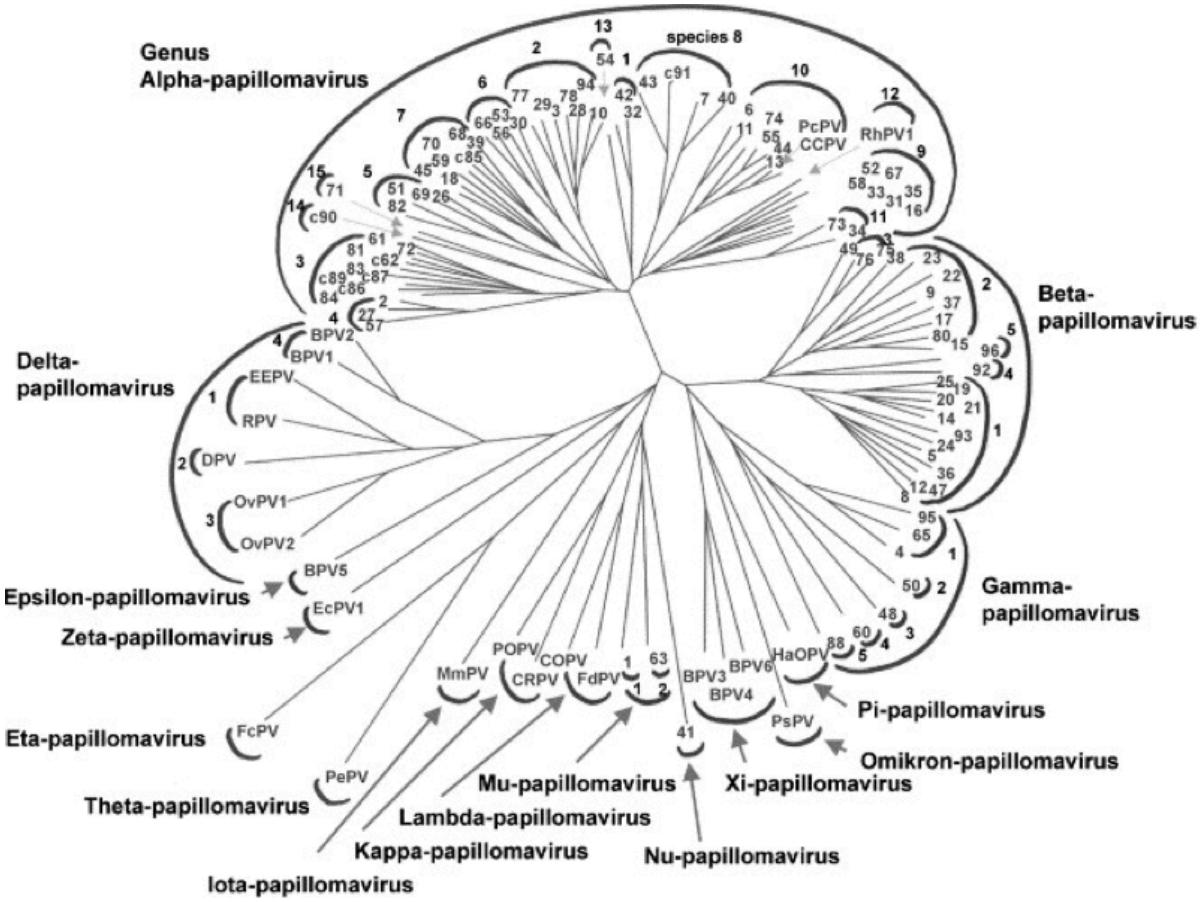
Figur 1.7 Oversikt over et humant papillomavirus genom med de ulike gener og deres rolle i livssyklusen (Figur hentet fra: http://www.microbiologybytes.com)

1.2.2 Klassifisering

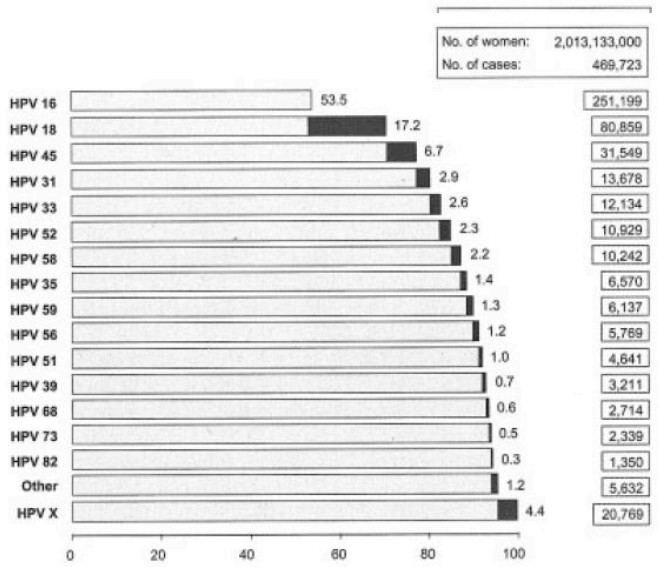
De ulike papilloma typene blir klassifisert i genera, arter og typer etter homologi i deres DNA sekvens, figur 1.8. Innen samme genera er sekvensene minst 40 % like. Virus arter som tilhører samme genus deler minst 60 % sekvenslikhet. En viral type, for eksempel HPV 16 som tilhører virusart 9 og genera alphapapillomavirus , har minst 70 % sekvenslikhet med en annen type i samme art, som for eksempel HPV 58. Innen en bestemt HPV type kan nukleinsyresekvensen ha opp til 10 % varisjon (Howley & Lowy 2007). Stadig flere HPV typer blir klonet og sekvensert, 120 typer er nå karakterisert (de Villiers et al. 2004), i tillegg til at deler av sekvenser for andre typer er kjent. Papillomavirus som infiserer mennesker er funnet i følgende genera; alpha, beta, gamma, mu og nu. Alle livmorhalskreft assosierte HPV typer hører til alphapapillomavirus genus, som er en gruppe papillomavirus som smitter via vertens slimhinner. Virus i dette genus er funnet hovedsakelig hos mennesker, samt hos enkelte apearter. Genus alphapapillomavirus er delt i 15 virusarter, og de fleste HPV typer som er assosiert med livmorhalskreft tilhører art 7 og 9, som inneholder HPV type 18 og 16, henholdsvis. Viruset inndeles også i spesifikke undergrupper avhengig av kliniske manifestasjoner og onkogent potensial.

Kategorisering i lavrisiko (LR) og høyrisiko (HR) HPV type gjøres ut fra om de er assosiert med kreftutvikling. HPV type 6 og 11 klassifiseres som LR HPV type og påvises ofte i kondylomer. De påvises også i lavgradig intraepitelial neoplasi (LSIL) og er sjelden assosiert med malign transformasjon.

HPV 16 og 18 ble i 1995 klassifisert som humane karsinogener og er blant de hyppigst påviste HPV-typer i karsinomer (de Villiers & Gunst 2009; Howley & Lowy 2007; IARC Press 2007). Andre typer som er hyppig assosiert med kreft varierer med geografiske områder, og HPV 58 har vist seg å forekomme med høy frekvens i Asia og Mellom-/Sør-Amerika (Wu et al. 2009). Skjematisk oversikt over hvilke typer som er assosiert med livmorhalskreft presenteres i figur 1.9.



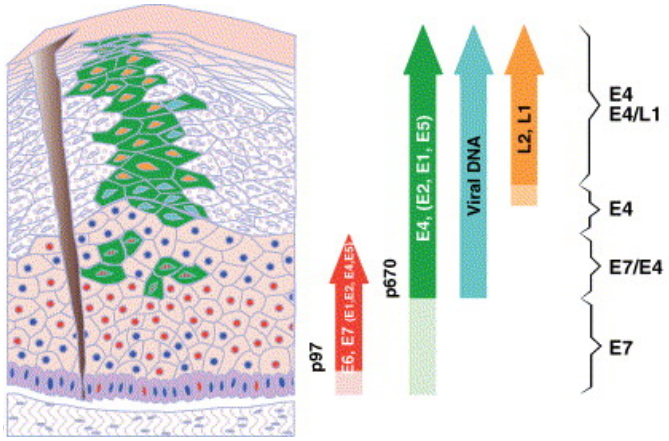
Figur 1.8 Fylogenetisk tre med oversikt over de ulike papilloma virus typer. Fordelingen er basert på sekvensering av L1 genet som er det mest konserverte genet i papilloma virus genomet (de Villiers et al. 2004).



Figur 1.9 Prosent og antall tilfeller av livmorhalskreft relatert til den mest forekommende HPV genotype i alle verdens regioner. (For kvinner fra 15 år og oppover) (Munoz et al. 2004)

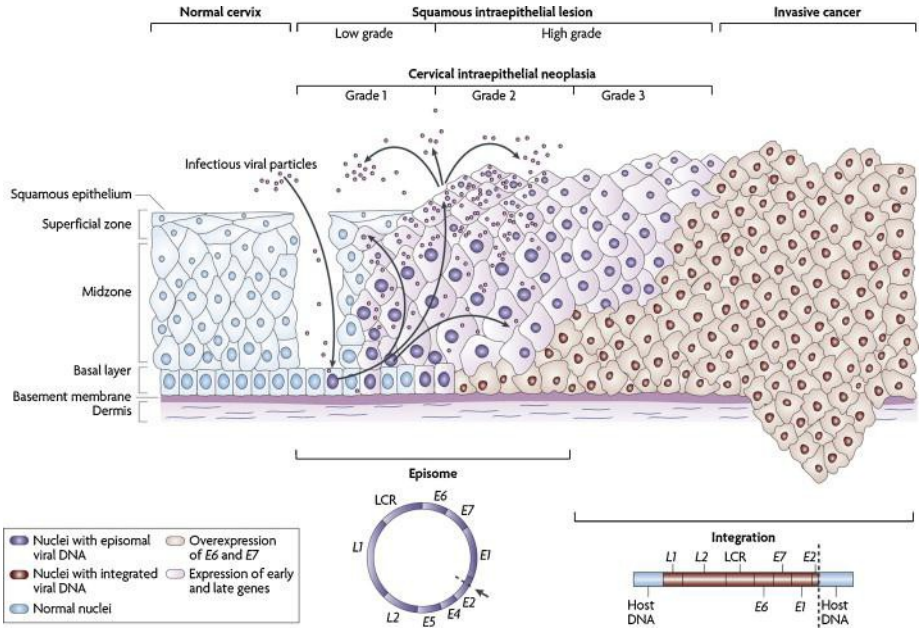
1.2.3 Virus replikasjon og de ulike virale geners funksjon

Papillomavirus replikerer og formerer seg i cellekjernen. HPV replikasjonssyklus er tett knyttet opp mot differensieringsprosessen til de infiserte cellene. Virusene finner veien via småsår og rifter inn til celler i de basale lagene av flerlaget plateepitel som finnes i transformasjonssonen i cervix. Disse cellene deler seg usymmetrisk; en dattercelle forblir udifferensiert, mens den andre utvikler seg videre til å bli en ferdig differensiert celle. Huden er vårt største organ og fornyer seg hele tiden. En slik celledeling sørger for mekanisk stabilitet og beskyttelse mot direkte eksponering for mutagener i luften. For å kunne etablere en persisterende infeksjon, må papillomavirusene infisere basalceller hvor viralt genom blir opprettholdt ved et lavt antall kopier. Når cellene deler seg og differensierer, vil ulike virale proteiner komme til uttrykk, helt ut mot det ytterste laget der store mengder av kapsidprotein syntetiseres, og mange virale genomer lages, for å danne ferdige virus partikler. De virale genene og replikasjonen av disse skjer i et bestemt mønster i samsvar med celledifferensieringen. Med unntak av E1/E2 -komplekset, mangler papillomavirus essensielle enzymer som er nødvendige for replikasjon. Viruset er derfor avhengig av vertscellens DNA syntese-maskineri for å replikere. Selve mekanismen er i dag ikke fullt oppklart, men et utrykk av bestemte virale gener fører til at seks ulike regulatoriske proteiner (E1, E2, E4, E5, E6 og E7) og to kapsid proteiner (L1 og L2) blir dannet og følger cellene gjennom en full differensiering. Produksjonen av de ulike virale proteiner under virusets replikasjonssyklus i forhold til differensieringsstadiet i epitelet er vist i figur 1.10.



Figur 1.10 Skjematisk oversikt over uttrykk av de ulike HPV gener i celler etterhvert som disse migrerer mot overflaten. Grønne celler viser forekomst av E4, E1, E2 og E5 proteiner. Blå kjerner viser hvor viralt genom amplifiseres, gule kjerner viser kapsidproteinene L1 og L2. Røde kjerner viser uttrykk av E6 og E7 i de tidlige basale celler (Doorbar 2005).

Produksjonen av infeksiøse etterkommervirus forekommer kun i ferdig differensiert epitellag, og viruset skilles ut når cellene i det ytterste laget har nådd sitt endepunkt. (McLaughlin-Drubin & Munger 2009). Når viruset forårsaker høygradige lesjoner, forblir cellene udifferensierte i en større del av epitellaget, og virusreplikasjonen fullføres ikke, Virus infeksjonen hos kvinner med CIN3 og kreft er dermed ikke lenger produktive infeksjoner, og kvinnene skiller ikke ut selvstendige viruspartikler, figur 1.11 (Woodman et al. 2007).



Figur.1.11 Oversikt over virusreplikasjon i samsvar med differensiering av cellene. HPV virus infiserer basalceller via små sår og rifter, i en påfølgende infeksjon blir E-genene, E1, E2, E3, E4, E5, E6 og E7 uttrykt og viralt DNA replikeres fra episomalt DNA (lilla farge). I de øvre lag av epitel, 'midzone' og 'superficial zone', blir virusets genom replikert videre og de sene, 'late' genene, L1 og L2, samt E4 blir uttrykt. L1 og L2, danner kapsid rundt virusets genom og gjør at selvstendige viruspartikler kan skilles ut. Disse virus kan igjen danne en ny infeksjon i andre celler. Lavgradige lesjoner støtter en produktiv viral replikasjon, mens progresjon til en høygradig lesjon er assosiert med integrasjon, (røde kjerner) og det sees tap/ødeleggelse av E2 med en påfølgende oppregulering av E6 og E7 genuttrykk. (Woodman et al. 2007).

E1 og **E2** koder for proteiner som regulerer virusreplikasjon og transkripsjon. I normale celler forekommer disse proteiner bundet til den ikke-kodende region, og regulerer dermed utrykk av E6 og E7 ved å hemme transkripsjon av disse gener (Thierry & Howley 1991). Disse uttrykkes tidlig i virusets livssyklus men når HPV DNA integreres i vertscellens DNA, tapes som regel sekvenser som koder for E1 og E2 i prosessen og suppresjonen av E6 og E7 opphører (Romanczuk & Howley 1992).

E4 proteinet produseres i rikelige mengder ved infeksjon forårsaket av ulike typer HPV og fortsetter å utrykkes i de ferdig differensierte cellene sent i virusets livssyklus. Dette proteinet danner amyloid lignende fibre og akkumulerer i de ulike lesjoner i varierende grad. Disse endringer i cellens indre matrix gjør at viruset lettere frigjøres fra cellen og har gjort E4 interessant som en markør for aktiv HPV infeksjon. I tillegg er E4 forbundet med koilocytose som er et morfologisk kjennetegn på HPV infeksjon. (Doorbar et al. 1991; Roberts et al. 1993) (Howley & Lowy 2007) (Griffin et al. 2012).

De øvrige 'early'-genene **E5**, **E6** og **E7** fungerer som onkogener og koder for vekststimulerende proteiner. E5-genet forekommer ikke i alle HPV-typer og proteinet den gir opphav til, varierer i lengde blant de ulike typer papillomavirus. En del arbeid gjenstår for å forstå den onkogene rollen til E5 men generelt er det funnet at den kan påvirke cellulære prosesser ved å inngå i ulike signalveier (Map-kinase og EGFR), danne kompleks med E7 og stimulere proliferasjon. E5 finnes lite uttrykt i HPV positive krefttilfeller, og det antas at den forekommer mest i benigne papillomas. (Howley & Lowy 2007; IARC Press 2007).

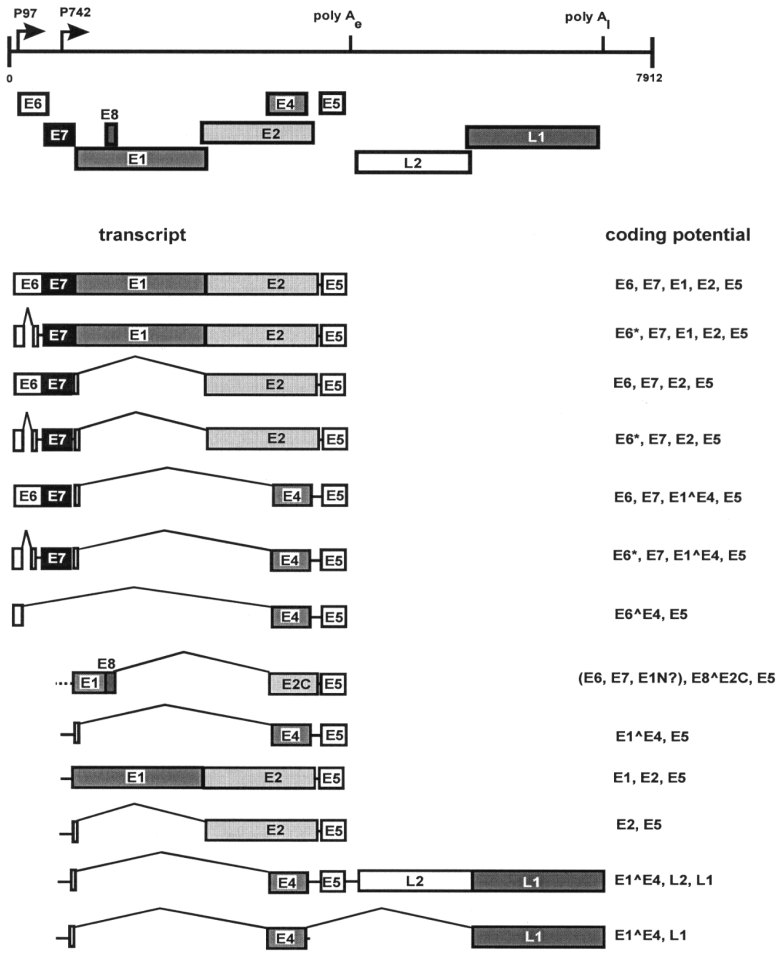
Genene E6 og E7 spiller en nøkkelrolle ved persisterende HPV- infeksjon og utvikling av kreft. Kun E6 og E7 fra HR HPV type forekommer oppregulert i karsinomer og i HPV forskningen har det vært fokus på å finne ulikheter mellom høyrisiko og lavrisiko E6 og E7 for å forstå hvilke cellulære faktorer disse binder og hvilke cellulære forskjeller de induserer (Bodily & Laimins 2011). Studier har vist at både HR HPV E6 og E7 interagerer med mange ulike cellulære komponenter, og det er funnet at de kontinuerlig må produseres for å opprettholde en ondartet fenotype. Ved å hovedsakelig interagere med ulike tumorsupressorproteiner sørger de for at cellen mister sin celledelingskontroll (Syrjanen & Syrjanen 1999).

1.2.4 Syntese av viralt mRNA

Transkripsjonsmekanismene for HPV er gjennomgått grundig av Howley & Lowy i Fields Virology, kapittel 62, 5 Edition (2007). Flere ulike promotorer inngår og det påvises forskjellige spleisede varianter av genene som fører til produksjon av ulike messenger RNA (mRNA) transkripter i ulike celler. Kartleggingsstudier er blitt uført for flere ulike HPV typer. En presentasjon av de ulike mRNA transkripter fra HPV genomet, samt promotorer, er vist

for HPV 31 i figur 1.12. En linearisert versjon av den genomiske organiseringen viser hvor «tidlig»promotor, for de tidlige (Early, E) genene, (p97) og «sen» promotor, for de sene (Late, L) genene (p742) befinner seg, samt hvor polyadenylerings-setene forekommer. P97 (position 105 for HPV 18), promotoren som er mest aktiv i ikke differensierte celler, er assosiert med uttrykk av E6 og E7 og de andre tidlige genene. I HR HPV infiserte keratinocytter som er under en differensieringsprosess, aktiveres den sene promotoren, p742 (p670 for HPV 16), og gir transkripsjon av de sene genene samt E4.

I motsetning til lav risiko HPV, der E6 og E7 genene uttrykkes fra hver sin promotor, uttrykkes E6 og E7 hos høyrisiko typer fra samme promotor. De åpne leserammer for E6 og E7 ('open reading frame' (ORF)) overlapper eller er adskilt med kun noen få nukleotider. Når transkriptet er felles med full lengde E6 og på grunn av den lille avstanden mellom terminering av E6, og re initiering for E7 translasjon, fører dette til en mindre effektiv nedstrøms translasjon av E7. Hos HR HPV typer, finnes det imidlertid andre spleisede varianter, der E6 er trunkert (E*) og har et tidligere stoppkodon. Disse varianter av E6* (I, II, III) fører til syntese av kortere peptider, og bedre avstand for mulig re initiering av maskineriet for E7 translasjon. Det er derfor foreslått at transkriptene med E6* representerer E7 mRNA. Det er til gjengjeld vist i nyere *in vitro* studier at translasjon av E7 proteinet kan forekomme ved en ineffektiv ribosom skanningsmekanisme som ofte overser oppstrøms E6 ORF (Chow & Broker 2007). De ulike spleisede varianter av E6 hemmer uttrykk av full lengde E6 protein og resulterer i E6* peptider som kan hemme E6 aktivitet (Chow & Broker 2007; Stubenrauch & Laimins 1999; Tang et al. 2006). En nyere studie viser imidlertid at E6* transkript ikke kunne detekteres for HR HPV typene 45, 52, 53, 58, 59, 73 og 97 og at mRNA spleising dermed ikke regulerer uttrykk av alle HR HPV E6 proteiner (Mesplede et al. 2012).



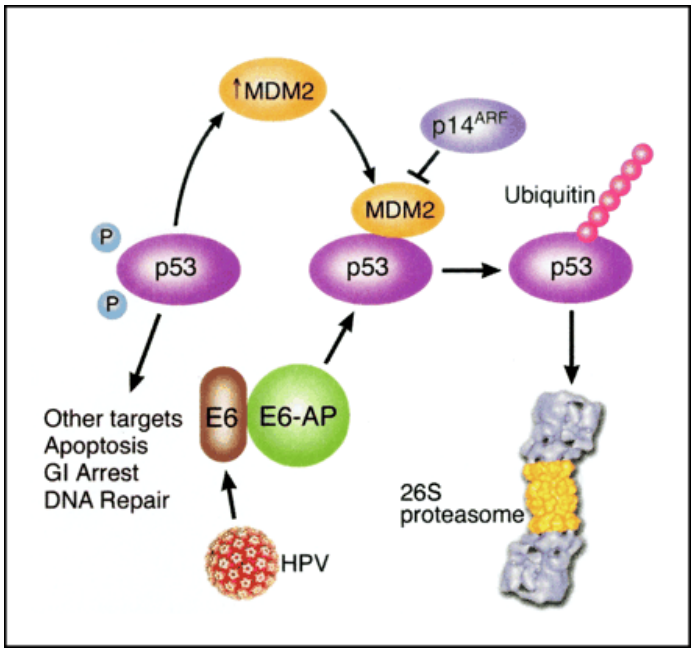
Figur 1.12 Transkripsjonskart for HPV 31, som viser de ulike transkripter som lages i løpet av virusets replikasjon. Transkriptene som initieres av tidlig promotor (p97) uttrykkes mest i de ulike terminale udifferensierte epitelceller (Stubenrauch & Laimins 1999).

1.2.5 Tumorsupressorgener TP53 og Retinoblastomaprotein (RB1)

Når celler deler seg, gjennomgår de bestemte faser i en cellesyklus. Denne cellesyklusen reguleres blant annet av viktige kontrollmekanismer som involverer tumorsupressorgenene TP53 og RB1 (Massague 2004). HPV proteinene E6 og E7 har en onkogen funksjon hovedsakelig ved at de binder til henholdsvis tumorsupressorproteinet p53, og retinoblastoma assosiert protein (pRb).

Tumorsupressorproteinet p53, også kalt "Guardian of the genome", aktiveres ved DNA skader i cellen, eller ved ulike cellestress faktorer, og hindrer skadede celler i å dele seg samt fremmer apoptoseprosessen. Mutert inaktivert p53 er den mest kjente genetiske forandringen i humane krefttyper (Levine et al. 1991). Ved livmorhalskreft forekommer p53 inaktivert ved HR HPV E6 og selve interaksjonen mellom E6 og p53 skjer via ubiquitin-

signalveien. For LR HPV E6 er en slik funksjonell *in vivo* interaksjon ikke funnet (Howley & Lowy 2007). I intakte celler er p53 under kontroll av E3 ubiquitin ligase, også kalt 'Mouse Double Minute 2 homolog' (MDM2). MDM2 gir i uskadede celler en konstant ubiquitinering av p53 slik at konsentrasjonen av denne holdes nede. Denne mekanismen foregår ved formasjonsdannelse av MDM2 og p53 og reguleres tett av ulike mekanismer i cellen. Ved skade på DNA vil MDM2 frigjøres fra p53 og p53 kan utøve sin oppgave ved å indusere stopp i cellesyklus og gi apoptose. P53 aktiveres også ved fosforylering. Onkogenet HPV E6 binder til det cellulære E6-assosierte proteinet (E6-AP) som også er en ubiquitin/protein ligase. Dette komplekset binder p53, gir en ubiquitinering av p53 som fører til degradering av p53 ved 26S proteasom-kompleks (Mani & Gelmann 2005; Thomas et al. 1999). Dette vises skjematisk i figur 1.13, og lenger ned i figur 1.14.



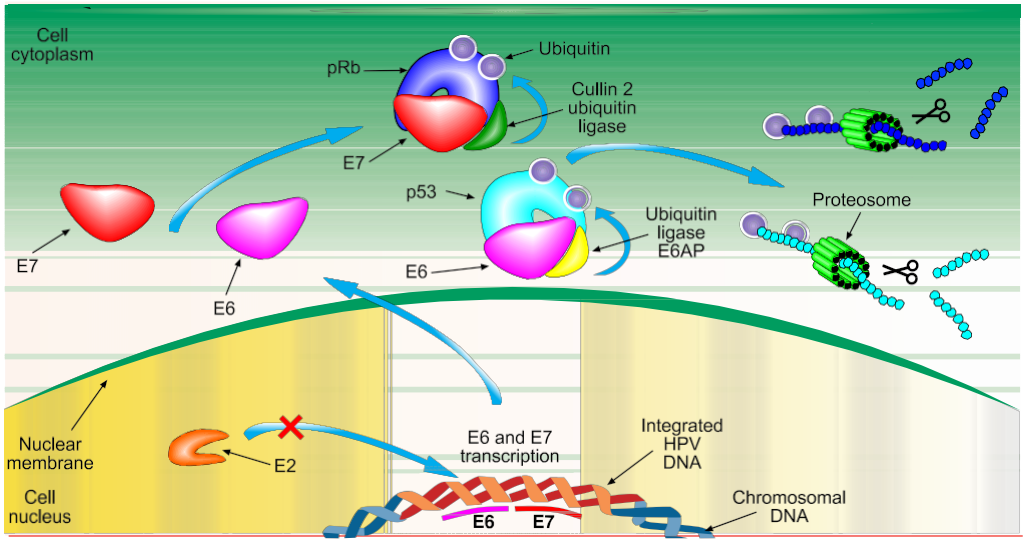
Figur 1.13 Ubiquitin-signalvei for p53. Skade på DNA induserer aktivering av p53 ved at MDM2 løsrives fra p53 og opphører sin kontinuerlige ubiqutinering av p53 som forekommer i intakte celler. Mindre degradering av p53 gir økt kontroll og fører enten til cellesyklusarrest eller apoptose. Ved uttrykk av onkogenet HPV E6 cellen skjer en kompleksdannelse av E6 og E6-AP som sammen binder p53. Dette gir en annen ubiquitinering og rask degradering av p53. $p14^{ARF}$ er en negativ regulator av MDM2 (Mani & Gelmann 2005).

Studier viser at HR HPV E6 interagerer med mange andre cellulære signalveier for å sørge for DNA replikasjon. I tillegg til inaktivering av p53, blokkerer denne apoptose, aktiverer telomerase, ødelegger celle adhesjon, polaritet og differensiering av epitel. Den kan forandre transkripsjon og G-protein signalisering, og redusere immunologisk gjenkjennelse av HPV infiserte celler (Howie et al. 2009; Thomas et al. 1999).

Tumorsupressorproteinet Retinoblastom (pRb) inngår i cellesyklusens kontrollprogram under G1 fasen. Ufosforylert pRb binder til ulike transkripsjonsfaktorer (blant annet E2F), og blokkerer dermed cellens overgang fra G1- til S (syntese)-fase. I normalt replikerende

celler skjer det en fosforylering av pRb de siste timene av G1 fasen, ved at sykliner påvirker syklin-avhengige kinaser (cdk2/4/6). Når pRb så blir fosforylert, frigjøres de bundne transkripsjonsfaktorer og cellen går da over i S-fasen hvor DNA syntese igangsettes (Weinberg 1995). HR HPV E7 påvirker dette kontrollsystemet ved å binde seg til pRb- og danner et kompleks med en ubiquitin/protein ligase, cullin 2. Dette komplekset blir så degradert i et av cellens proteasomer, noe som fører til at E2F forblir ubundet, og HPV smittede celler kan fortsette til S fase. (Dyson et al. 1989; Huh et al. 2007; McLaughlin-Drubin & Munger 2009). Skjematisk interaksjon sees i figur 1.14.

HR HPV E7 deler funksjonelle egenskaper med andre kjente onkoproteiner som adenovirus E1A og 'SV40 large tumor antigen'. Disse har som fellestrekk at de interagerer med pRb og spiller en stor rolle både ved den karsinogene transformasjonen og i viral livssyklus.



Figur 1.14 Skjematisk oversikt over E6 og E7 innvirkning på tumorsupressorproteinene p53 og pRb. Ved fravær av E2 øker uttrykk av E6 og E7 (Figur hentet fra: http://immunopaedia.org).

1.3 Potensielle biomarkører for progresjon

I dag benyttes screeningprogrammer med cytologi i primærscreening og HPV DNA testing i enkelte tilfeller, for å oppdage prøver med celleforandring og livmorhalskreft. Både selve screeningsprogrammet og behandlingen av kvinner med CIN2+ er samfunnsmessig ressurskrevende. I tillegg kan konisering ha bivirkninger. Blant annet kan konisering føre til senaborter eller preterm fødsel (Sjoborg et al. 2007). Siden mer enn 50 % av CIN2 og CIN3 tilfellene antageligvis hadde gått i regress uten behandling, ville disse kunne gå ubehandlet om det fantes sikre prognostiske markører for å skille mellom de lesjoner som vil

progrediere og de som vil regrediere. Kvinner med lavgradige og usikre cytologisvar, som er HPV positive, må i dag ha gjentatte oppfølginger før de kan igjen inngå i rutinescreening. Å finne molekylære markører for tidlig progresjon som kan skille ut pasienter med en høy risiko for progresjon, vil dermed være svært verdifullt. Markører både for tidlig progresjon, som for eksempel normal til CIN1/ASC-H og sen progresjon som fra CIN3 til invasiv kreft, er aktuelle. I tillegg vil de også kunne være nyttige som terapeutiske mål (Kailash et al. 2006; Wentzensen & von Knebel Doeberitz 2007). For eksempel er mRNA testing for HPV E6 og E7 sannsynligvis en bedre markør enn påvisning av viralt DNA for å finne de tilfeller som vil være i fare for å utvikle livmorhalskreft (Kotaniemi-Talonen et al. 2008). Det er vist at E6 og E7 uttrykkes i økende grad ved de ulike stadier av celleforandring, og at påvisning av disse mRNA fra de 5 mest onkogene HPV typer er assosiert med lesjonenes alvorlighetsgrad (Trope et al. 2009). Siden 10% av krefttilfellene vil være assosiert med andre HPV typer, er dette ingen universal testmulighet. Studier har ellers vist at E6/E7 mRNA kan påvises i 100% av livmorhalskrefttilfellene (Kraus et al. 2004; Molden et al. 2006; Trope et al. 2009). Studier basert på både DNA og mRNA, viser at færre tilfeller tester positivt for mRNA E6 og E7 enn DNA (Castle et al. 2007).

Det er antatt at HPV DNA integrasjon i verts-DNA er kritisk ved livmorhalskreft gjennom brudd i E1/E2 leseramme og påfølgende tap av E2 kontrollregulering av E6 og E7. Studier av integrasjonsstatus og betydning for utvikling og persistens av HPV infeksjon har vist at det er varierende påvirkning hos de ulike typer HPV og ved ulike grader av celleforandring. Det er funnet både at integrasjon har en stor betydning for den onkogene progresjon, mens andre studier viser at integrasjonsstatus er av mindre betydning for progresjon (Vinokurova et al. 2008). Ved å se på integrasjonsstatus i form av E2/E6 ratio, ble det funnet at for HPV 16 har denne ratioen betydning for infeksjonens persistens mens det ikke var noen forskjell for de ulike kohort med ulik grad av celleforandring (Manawapat et al. 2012). Det er også vist at ikke alle typer HPV har lik integrasjonsrate, og andre mekanismer enn integrasjon for disse typer er knyttet til overuttrykk av E6 og E7. Disse tvetydige resultater ved integrasjonsstatus øker også fokuset på andre molekylære markører for vurdering av progresjon.

En utfordring ved identifisering av egnede sene progresjonsmarkører, er at det ikke er etisk forsvarlig å la være å behandle kvinner med CIN2+ for å følge med hvilke kvinner som hadde hatt lesjon som hadde gått naturlig i regress og hvilke som hadde progrediert. I tillegg er mye av forskningen utført på kvinner som er infisert med HPV16, slik at studier på

eventuelle markører hos kvinner med lesjoner som skyldes andre HPV typer, er viktig.

1.3.1 Valg av biomarkører

Ved proteomikk analyse er det funnet ulike potensielle markører for premaligne lesjoner og livmorhalskreft. Studier der livmorhals plateepitelkarsinom er sammenlignet med normalt vev fra livmorhalsen, har vist store forskjeller for en del proteiner (Arnouk et al. 2009). Det er også gjort genuttrykksstudier der en har studert transkriptomet fra histologiske og cytologiske preparater fra kvinner med ulike grad av celleforandringer. Vår studie tar utgangspunkt i en presentasjon av T. Iftner ved konferansen; Eurogin 2011, "HPV associated diseases and cancer from reality now to the future", Lisboa-Portugal, 8-11 Mai 2011 (Iftner et al. 2011), der flere mRNA markører for persistens og progresjon ved HPV 16 infeksjon ble presentert.

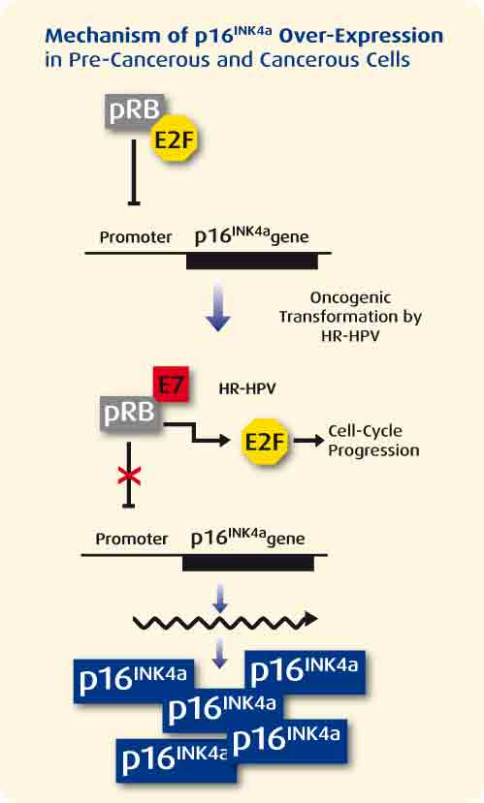
1.3.2 P16/CDKNA-2A

Produktet til genet CDKN2a, proteinet p16 ($p16^{INK4A}$), er funnet å hemme cellenes gang gjennom cellesyklus ved å binde til cyklin-avhengig kinase 4 og 6 (CDK4/6). Disse kinaser er et ledd i fosforyleringen av pRb og dermed viktige for cellens gang fra G1 fase til S-fase (Kalof & Cooper 2006). Studier har vist at p16 uttrykk er tydelig påvirket av pRb utrykkstatus og økt nivå av p16 er funnet ved tilfeller av forstadier til livmorhalskreft og livmorhalskreft på grunn av funksjonell inaktivering av pRb som følge av binding til HPV E7 proteinet, figur 1.15, (Lesnikova et al. 2009; Sano et al. 1998). Ved oppregulert transkripsjon av de virale onkogenene E6 og E7 knyttet til progresjon, vil dermed inaktivering av pRb føre til økt uttrykk av p16 (Kalof & Cooper 2006).

Det er funnet at immunhistokjemisk påvisning av p16 kan benyttes som en spesifikk markør for alle grader av dysplasi og kreft i livmorhalsen, og det kan antagelig også erstatte/supplere påvisning av HPV-infeksjon med tanke på sammenhengen mellom p16 og HPV E7 inaktivert Rb protein (Lesnikova et al. 2009).

Spesielt ved cytologisk diagnose, LSIL, kan deteksjon av p16 være nyttig. Mens lesjoner med HR HPV vil ha større sannsynlighet for å progrediere til HSIL og/eller kreft og også utvise

et høyere nivå av p16, vil lesjoner som skyldes LR HPV vise et lavere nivå av p16 (Sano et al. 1998). Bruk av p16 kan dermed gi indikasjon på den mest adekvate oppfølging for denne gruppen kvinner, men mer forskning gjenstår før p16 kan brukes som en sikker triage markør.



Figur 1.15 Skjematisk oversikt over hvordan HPV E7 er assosiert med transkripsjon av p16 genet (Figur hentet fra: www.mtmlabs.com)

1.3.3 SERPIN B5

Serpin B5, også kalt maspin, ble opprinnelig identifisert i normale bryst epitelceller. Denne er en serin protease inhibitor som er påvist i normalt bryst- og prostatavev, mens den i bryst- og prostata-tumorer er funnet nedregulert eller totalt fraværende. Det er vist at p53 spiller en rolle i reguleringen av serpin B5. p53 aktiverer serpin B5 promotor ved å binde til p53 konsensus bindingsetet i promotorområdet og fungerer som en transkripsjonsfaktor for genet (Zou et al. 2000). Studier har imidlertid vist at serpin B5 også kan forekomme oppregulert i enkelte tumorer, som ved eggstokk-, bukspyttkjertel- og magekreft. (Maass et al. 2002; Son et al. 2002; Sood et al. 2002). Dette paradoksale utrykket av serpin B5, reflekterer sannsynligvis variasjonen i ulike tumorers patogenese i ulike organer i kroppen.

Utvikling av tumorer består av mange nøkkeltrinn. En kritisk egenskap er evnen til å etablere en blodforsyning fra eksisterende blodkar, en prosess som kalles angiogenese. Denne prosessen gir tumor mulighet til å skaffe næring og oksygen for å utvikle seg videre, både invasivt og metastatisk. Serpin B5 er funnet å hemme angiogenese (Bailey et al. 2006). En studie hvor en har sett på sammenhengen mellom HPV 16 E6 og E7 og angiogenesiske faktorer, ble det funnet at uttrykk av HPV 16 E6 og E7 i humane keratinocytter har, i tillegg til å ødelegge cellesyklusregulering, evne til å forandre uttrykket av angiogenesiske faktorer. Blant annet ved nedregulering av serpin B5, slik at disse skaper et mikromiljø som gir gode vekstvilkår for tumorer (Toussaint-Smith et al. 2004).

En studie utført av Xu et al (2005), viser at nedregulering av serpin B5 antagelig ikke er en tidlig hendelse i tumordannelses prosessen, men spiller en rolle i onkogen progresjon. Det er gjort sammenligninger av prøver hvor CIN3 ble utviklet først, og senere enten mikroinvasivt plateepitel karsinom eller invasivt plateepitel karsinom i livmorhalsen. Det ble funnet tilsvarende nivå av serpin B5 i pasientens normale celler og CIN3. Konklusjonen er at serpin B5 kan være et viktig verktøy for å identifisere potensialet for videre progresjon ved alvorlig grad av dysplasi. I tillegg ble det funnet et redusert serpin B5 genuttrykk i tumor emboli ved plateepitel karsinom, noe som igjen kan bety at serpin B5 har betydning for metastaseprosessen (Xu et al. 2005).

1.3.4 TMEM45A

Funksjonen til transmembran protein 45A (TMEM45A) er ennå ukjent. Studier har vist at TMEM45A utrykkes i normale differensierte keratinocytter, og har en sammenheng med anti-apoptotiske funksjoner (Flamant et al. 2012). Brystkreftforskning viser en sammenheng mellom høyt uttrykk av TMEM45A og dårlig prognose ved behandling, dermed vurderes TMEM45A som en interessant biomarkør for potensiell resistens overfor kreft terapi (Flamant et al. 2012).

1.3.5 hTERT

I alle kromosomer finnes endestykker, telomerer. Disse er viktige for genomisk opprettholdelse og stabilitet ved å hemme gjenkjennelse av kromosomale ender som brudd i

dobbeltrådet DNA . Telomerene består av repeterte sekvenser (TTAGGG)n, syntetisert ved telomerase. Det er funnet at aktivering av telomerase er et kritisk punkt i cellulær udødelighet og kreft. Telomerase består av en intern RNA komponent human telomerase (hTR)(templat), en katalytisk subenhet, kalt human telomerase reverse transcriptase (hTERT) og andre assosierte proteiner. De fleste voksne somatiske celler har en lav eller ingen telomerase aktivitet. Derimot har kjønnsceller, differensieringsceller og tumorceller et påviselig nivå av telomerase og lange, stabile telomerer (Kailash et al. 2006).

Studier har vist at HR HPV E6 proteinet kan aktivere telomerase ved å indusere transkripsjon av hTERT genet. E6 er avhengig av Myc aktivering og E6/E6-AP interaksjoner er også viktige. Det er også funnet at uttrykk av hTERT øker med økende CIN grad (Branca et al. 2006).

1.3.6 Husholdningsgenet GAPDH

I kvantitative genuttrykksanalyser blir Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) mye benyttet som et normaliseringsgen fordi dette genet er et 'husholdningsgen' (som inngår i basale cellefunksjoner i alle celler, og ikke knyttet til ulike differensieringsstadier) og uttrykkes konstant i de fleste humane celler (Barber et al. 2005). Undersøkelser hvor stabiliteten til dette genet i HPV positive og negative cervikale celler og ved bruk av FFPE innstøpt materiale (benmarg) viser at denne er blant de mest stabilt uttrykte ved sammenligning av ulike husholdningsgener (Daud & Scott 2008; Scicchitano et al. 2006) Egne uttestinger av egnethet er også utført ved medstudent i samme faggruppe ved Ahus (Hansen M, muntlig meddelelse), hvor GAPDH ble funnet å være mest ideell.

2 Formål med studien

Hovedmålet med studien var å studere genutrykk av potensielle biomarkører, E6, E7, p16/CDKN2A, Serpin B5, TMEM 45A og hTERT, hos kvinner med verifisert CIN 3 diagnose forårsaket av ulike HPV typer, for å avdekke eventuelle HPV 16 assosierte forskjeller i CIN3 prøver ved sammenligning mot CIN3 forårsaket av mindre onkogene typer.

Celler ble plukket med lasermikrodisseksjon for å måle uttrykk spesifikt i lesjonen og ble utført på HVP 18 og 58 positivt materiale i tillegg til HPV 16.

3 Materialer og metoder

3.1 Studiepopulasjonen

Masteroppgaven er utført på materiale som er samlet inn i forbindelse med et tverrfaglig HPV (Humant Papilloma Virus) prosjekt ved Akershus Universitetssykehus (Ahus) i tidsrommet 2005-2009. Prosjektet er godkjent ved REK (Regional Etisk Komite), og 15. November 2010 ble godkjennelsen utvidet slik at disse prøvene kan benyttes utover prosjektets opprinnelige sluttdato. Alle kvinner som deltar har levert samtykkeerklæring og det er gitt varsel om utvidet bruk av materialet. Ahus har derfor i dag en stor forskningsbiobank med prøvemateriale fra kvinner som har fått påvist celleforandringer og samtidig har testet positivt for HPV. Ahus har i dag mikrobiologisk referansefunksjon for HPV og deltar i oppfølgingsprogrammet for HPV vaksinering i Norge.

Pasientene som ble valgt ut til å inngå i prosjektet ble funnet ved å gjøre søk i prosjektdatabase, og deretter i elektroniske arkiv, Miclis (mikrobiologisk HPV svar) og Doculive (patologisk histologi svar), ved Ahus. Alle pasientprøvene er tidligere genotypet ved Linear Array (Roche, Basel, Switzerland) på cytologiprøve, løst i og oppbevart i PreservCyt ThinPrep Medium (Hologic, Bedford, Massachusetts). Pasienter hvor cytologisk prøve er positiv for kun en HPV type, enten 16, 18 eller 58, og histologiprøven er diagnostisert med en grad 3 av cervical intraepitheliar neoplasia (CIN3) ble valgt ut. Disse utgjorde seks kasus hvor cytologisk celleprøve viste HPV 16, syv kasus hvor det ble påvist HPV 18 og seks hvor HPV 58 ble påvist. For HPV 18 er to fra samme pasient hvor den ene i tillegg til CIN3 viser adenocarsinoma *in situ*. Ahus følger Bethesda internasjonal standard for klassifisering av celleforandring (Solomon et al. 2002). Histologisk prøvemateriale som inngår i studien er vev fra livmorhalsen som ble tatt under koniseringsbehandling, fiksert i formalin og innstøpt i parafin (FFPE -formalinfixed paraffinembedded). Koniseringspreparater deles inn i 10-12 biter som støpes i hver sin blokk. Re-diagnostisering av CIN3 i konuspreparatet ble utført av patolog G. Cecilie Alfsen ved Avdeling for patologi, Ahus. Hun gikk igjennom alle snitt fra alle objekter og håndplukket de aktuelle snitt med tydelig celleforandring av CIN 3 grad.

Alt arbeid med prøvene på laboratoriet er selvstendig utført av masterstudenten med unntak av lasermikrodisseksjon hvor et samarbeid med patolog var nødvendig. Ved DNA

verifisering med 'luminex-teknologi' ble masterstudenten fulgt av bioingeniør ansatt ved genteknologisk seksjon.

3.2 Snitting av parafinblokker

Leica rotasjonsmikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) forbeholdt prøver til DNA/RNA testing ved Avdeling for patologi, Ahus, ble benyttet. Aktuelt histologisk FFPE materiale ble trimmet og overflaten skåret bort før tre 10 µm tykke snitt ble høstet til DNA ekstraksjon og fem 10 µm tykke snitt ble skåret og lagt på poly-L-lysin behandlede objektglass til lasermikrodisseksjon og videre RNA isolering. Poly-L-lysin objektglass er behandlet ved å stå 5 min i 1:10 fortynning av Poly-L-lysin, og tørket 1 t ved 60°C i varmeskap. Tynne snitt vil gi en bedre og mer optimal tilgang for bufferne som inngår i isoleringsprosessen for DNA og ved bruk av laserdisseksjon kreves det at en har mulighet til å se de ulike celler når en skal velge hvilke som skal plukkes opp. Alle vevsblokkene ble behandlet likt. Avslutningsvis ble det skåret et 5 µm tykt snitt til HPS-farging og re-diagnostisering for å være sikker på at snittene som skulle analyseres i studien ikke er tatt fra området utenfor celleforandringene. For å unngå kontaminering ble det under snitteprosessen arbeidet så rent som mulig. Alle overflater og redskaper i umiddelbar nærhet til parafinblokken ble nøye vasket med en 10 x fortynnet klorin løsning og deretter 'RNAse away and DNA away' (Molecular Bioproducts, San Diego, California). Rotasjonskniv ble skiftet for hvert nye kasus. Under hele snitteprosessen ble det ført logg, der det ble notert ned prøvenummer, antall snitt som ble skåret og eventuelle kommentarer til arbeidet under snittingen som kunne ha betydning for kvaliteten til vevet.

3.3 Hematoxylin/Phloxine/Safran (HPS) farging av vevsnitt

Hematoxylin/Phloxine/Safran (HPS) farging er en standard innfargingsmetode for vevssnitt som benyttes i rutinen ved Avdeling for patologi, Ahus. Denne metoden ble benyttet for å farge vevssnittene skåret på rotasjonsmikrotom. Hematoxylin er et naturlig fargestoff med negativt ladede molekyler som, via positivt ladede aluminiumioner, binder seg til de negativt ladede molekylene i vevsstrukturen. Alle negativt ladede molekyler,

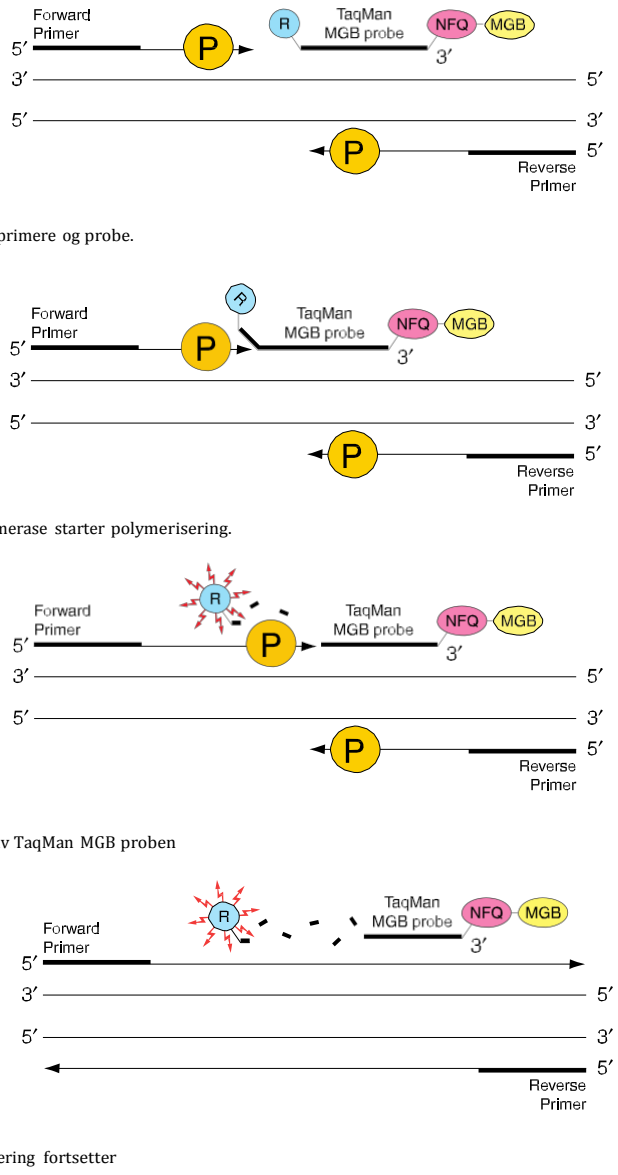
som for eksempel DNA heliksen i cellekjernen vil derfor farges blå. Det samme gjelder bruskvev. Ploxine (derivat av eosin) er et fluoriserende negativt ladet rødt fargestoff som i surt miljø (pH 4.0) vil binde seg til positivt ladede molekyler i vevsstrukturen og farge den rosa. Cytoplasmaproteiner og bindevev er eksempel på strukturer som vil farges rosa (Kiernan 2008). Safran benyttes som en kontrastfarge og brukes for å farge bindevev ytterligere (Luna 1993) Fargingen ble utført i Leica ST 5020 Multistainer Bath Array (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) med opplegg av coverglass i Leica CV 5030 (Leica Microsystems). Følgende trinn inngår; xylene i 1 minutt x 2, absolutt alkohol i 13 sekunder x 2, 96 % alkohol i 13 sekunder, 80 % alkohol i 13 sekunder, vann i 1 minutt, hematoxylin i 4 minutter, vann i 2 minutter, phloxine i 4 minutter, 80 % alkohol i 13 sekunder, 96 % alkohol i 13 sekunder, absolutt alkohol i 13 sekunder, safran i 2 minutter, absolutt alkohol i 13 sekunder og tilslutt xylene i 13 sekunder.

Hematoxylin/Eosin (HE) farging er en standard innfargingsmetode som benyttes for snittene til lasermikrodisseksjon. Denne fargemetoden benytter ikke safran siden HE farging gir tilstrekkelig informasjon for å vurdere hvilke celler som bør velges. Disse trinn inngår; xylene i 2 minutter x 2, absolutt alkohol i 30 sekunder x 2, 96 % alkohol i 1 minutt, 80 % alkohol i 1 minutt, vann i 40 sekunder, hematoxylin i 3 minutter, vann i 3 minutter, eosin i 2 minutter, 80 % alkohol i 13 sekunder, 96 % alkohol i 13 sekunder og tilslutt absolutt alkohol i 30 sekunder.

3.4 TaqMan teknologi

TaqMan teknologi brukes i real-time PCR for å øke sensitiviteten og spesifisiteten til reaksjoner, samt gi kvantitative resultater. TagMan probe består av en ”reporter dye” (R), for eksempel FAM som er en fluoriserende reporter farge som er festet til 5’ enden av proben, og en ofte ikke-fluoriserende ”quencher” (NQF) på 3’ enden, som tar opp fluorescens fra reporter dye når disse er begge bundet til proben. I løpet av real-time PCR vil TaqMan proben binde seg spesifikt til komplementære sekvenser mellom bindingssetene til forward og reverse primer. Under PCRen er det viktig at proben har et høyere smeltepunkt enn primerne, slik at flest mulige prober er bundet til mål DNA før syntetiseringen starter ved binding av primerne. Taq DNA-polymerasen, som katalyserer DNA-syntese ut i fra de to primerne i 5’-3’ retning, har en 5’-3’ nukleaseaktivitet, som fører til kløyving av proben når polymerasen kommer til det området der proben allerede

er hybridisert under syntesen. Denne kløyving fører til at reporter dye skilles fra quencheren, og dets fluorescens er dermed ikke lenger maskert. Intensiteten i fluoressensen som avgis, er proporsjonal med mengden PCR produkt. Prosessen skjer i hver enkelt syklus i PCR og interfererer ikke med den eksponentielle amplifikasjonen av produktet i PCR reaksjonen (*TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol* 2010), figur 3.1.



Figur 3.1 NFQ-Nonfluorescent quencher, R-Reporter, P-AmpliTaq Gold DNA polymerase. a) Forward primer, reverse primer og TaqMan proben binder seg til templatet. b) DNA polymerase starter polymerisering, når proben er intakt vil nærheten mellom reporter og quencher resultere i hemming av reporter fluoressens. c) DNA Polymerasens 5' nukleaseaktivitet kløyver TaqMan proben og skiller reporter fra quencher og reporter vil avgi fluoressens d) Polymerisering av templatet fortsetter men fordi proben er blokkert i 3' enden vil ikke denne forlenges (*TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol* 2010).(NB-Illustrasjonen viser MGB-probe, studien benytter ikke en slik modifisert probe)

3.5 Deteksjon av DNA

DNA ble isolert fra et tverrsnitt for hvert kasus for å verifisere tilstedeværelse av genomet fra den aktuelle HPV typen i selve histologimaterialet.

3.5.1 Isolering av DNA

DNA isolering ble utført manuelt med QiaAmp DNA FFPE Tissue Kit, cat.#56404 (Qiagen, Venlo, Nederland), i henhold til anbefalt prosedyre. Snittene ble behandlet med xylen for å fjerne parafinen. 20 µl av enzymet proteinase K sammen med 180 µl buffer ble tilsatt prøvene som deretter ble inkubert ved 56 °C i 1 time. Dette bidrar til å lysere cellemembranen og bryter effektivt ned proteiner. For å unngå forstyrrelser fra proteinase K i etterfølgende PCR reaksjon, og for å gjøre tilgjengelig eventuelle formaldehyd modifiserte nukleinsyrer, inkuberes prøvene ved 90°C i 1 time. Prøvene ble tilsatt lyseringsbuffer med kaotropiske salter, som tillater isolering av DNA via binding til silikapartikler i membranen i en spinnkolonne, mens resten av lysatet sentrifugeres igjennom. DNA ble vasket mens det er bundet til silikamembranen, og deretter eluert i 50 µl buffer ATE (*QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook* 2007).

3.5.2 Kvantifisering av DNA

Utbyttet av ekstraksjonen ble vurdert ved å kjøre den polymerase kjede reaksjons (PCR) baserte Quantifiler® Human DNA Quantification Kit, PN#4343895 (Applied Biosystems, Foster City, California). PCR reaksjonen utføres i Applied Biosystems 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems). Genet for hTERT finnes i alle celler og er målgenet i det kommersielle assayet. Ved å sette opp en fortynningsserie med kjent standard, kan konsentrasjon på prøvene bestemmes ved hjelp av en standardkurve. Leverandørens anbefalte volum (12,5 µl reaksjonsmiks,10,5 µl primermiks, 2 µl templat) og temperaturbetingelser; (95°C i 15 minutter, så 40 sykler med denaturering 95°C i 15 sekunder, og hybridisering ved 60 °C i 1 minutt), ble benyttet (*Quantifiler Kits User Manual* 2012). Konsentrasjonsmålinger ble utført på alle isolerte DNA prøver.

3.5.3 DNA verifisering av HPV diagnose

En verifisering av HPV diagnose var viktig fordi utvalg av prøver ble basert på et HPV resultat fra cytologisk prøve. Ofte går det en tid før pasienten får tatt histologisk prøve med bekreftelse av høygradig celleforandring og påfølgende behandling ved konisering. HPV status hos pasienten kan endre seg i løpet av denne tiden. Det ble gjennomført en genotyping av isolert DNA fra pasientenes FFPE prøve for å verifisere at aktuelle kasus er infisert med HPV type lik det tidligere funnet fra cytologisk celleprøve fra alle valgte pasienter.

HPV-DNA genotyping med 'Luminex- teknologi' benyttes ved Ahus i forbindelse med vaksineoppfølgingsprogrammet. Denne er utarbeidet ved WHO referanse laboratorium i Malmø (Soderlund-Strand et al. 2009) og anbefales for HPV genotyping ved bruk av modifiserte primere for virusets L1-region som dekker et bredt spekter av LR og HR HPV typer. Følgende reagenser inngår per prøve i PCR; 0,38 µl 20 µM av forward og revers primer, 4 µl 1,25 µM dNTP, 2,5 µl 10x PCR buffer II, 2,5 µl 25 mM MgCl2, 10,14 µl dH20, 0,1 µl AmpliTaq Gold, PN#4311814 (Applied Biosystems). 5 µl templat tilsettes. PCR utføres i GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) med følgende temperaturbetingelser; først et trinn ved 95°C i 10 minutter, deretter 5 sykluser med 95°C i 30 sekunder, 42°C i 30 sekunder og 72°C i 45 sekunder. Så 45 sykluser med 95°C i 30 sekunder, 64°C i 30 sekunder og 72°C i 45 sekunder.

PCR produktene som dannes analyseres med 'Luminex-teknologi', der HPV genotype spesifikke prober er koblet til mikroskopiske polystyrenkuler og hybridiserer til PCR produktet, om dette er tilstede. Polystyrenkulene blir i Luminex maskinen identifisert ved hjelp av en laser (rød) og skilles fra hverandre ved at de er internt farget med ulike konsentrasjoner av to ulike fluoroforer som sammen lager en unik farge. Ved hjelp av en annen laser (grønn) avleses det om den aktuelle kulens HPV-type spesifikke probe merket med biotin-streptavidin-phycoerythrin, er bundet til PCR produkt. Fluorescens intensiteten fra eventuelt bundet PCR produkt danner resultat for om HPV DNA fra den aktuelle typen er tilstede (Schmitt et al. 2006).

3.6 Relativ kvantitering av mRNA

3.6.1 Lasermikrodisseksjon

Prøvematerialet som inngikk i oppgaven er konisert vev fra livmorhalsen. Dette bestod av både normale celler og celler med lesjon. Det totale genuttrykket fra et tverrsnitt av dette vevet vil gjenspeile uttrykk fra både de normale celler og celler med lesjon. For å studere det spesifikke genuttrykket for områder med lesjon, ble lasermikrodisseksjon (LCM) benyttet for å plukke aktuelle celler i lesjonen. LCM ble utført med Carl Zeiss PALM MicroBeam (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany), figur 3.2. Ferdig skåret og farget vevssnitt på objektglass ble lagt bestemt posisjon på instrumentet, dette ble orientert i mikroskop og visualisert på en PC skjerm. Videre ble skjermen benyttet for å kunne merke aktuelt område som ønskes kuttet. Ved start av laserkutting ble aktuelle celler skjært ut og en laserpuls sørget for å hente den avskårne biten opp i lokket til et 200 µl rør, figur 3.3 (*Lasermicrodissection CombiSystem Carl Zeiss* 2008).

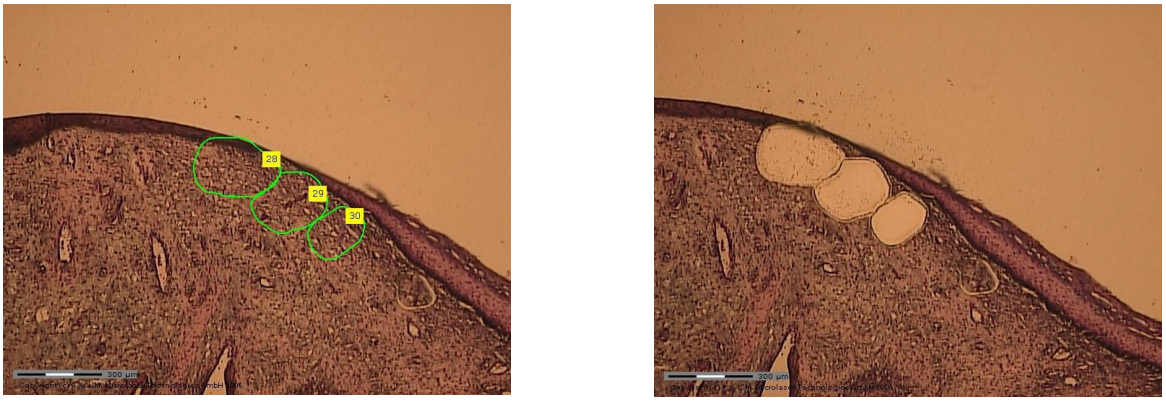
Figur 3.2 Carl Zeiss PALM Micobeam Lasermicrodissection (*Lasermicrodissection CombiSystem Carl Zeiss* 2008).

Selve lasermikrodisseksjonen ble utført i samarbeid med patolog fra Avdeling for patologi, Ahus. Mikroskopet ble stilt inn, aktuelt område i vevssnittet med celleforandring tilsvarende CIN 3 ble lokalisert og markert på skjerm. En slik fremgangsmåte gav også en ekstra kontroll av at en jobber med materiale som er vurdert til CIN 3.

Prøvene ble oppbevart på tørris frem til lasermikrodisseksjonen og all behandling av snitt

ble loggført og kommentert.

a) b)



Figur 3.3 Bilder fra LCM, 5x forstørrelse hvor a) markert grønn linje viser celler som skal skjæres ut, b) cellene er plukket opp.

3.6.2 Isolering av RNA

Absolutely RNA FFPE Kit, cat.#400809 (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, California) ble benyttet for å isolere RNA fra cellene som ble skåret ut fra vevssnittene med lasermikrodisseksjon. Denne spinn-kolonne baserte isoleringsmetode starter normalt med et deparafineringstrinn. Siden det her ble jobbet med celler kuttet fra snitt med lasermikrodisseksjon, antas mengden parafin å være så liten at deparafinering ble vurdert til å ikke være nødvendig. Isoleringen ble ellers fulgt som anbefalt i instruksjonsmanualen til kit'et, med unntak av inkubasjonstemperatur under proteinase K behandling, som er beskrevet nedenfor. Prøvene ble proteinase K behandlet ved å tilsette løsning bestående av 10 µl proteinase K tilsatt 100µl proteinase K digestion buffer for hver prøve. Siden bitene med prøvemateriale en jobber med er mikroskopiske og er samlet i lokket på et 200µl rør, ble noen dråper av proteinase K løsningen først tilsatt i lokket og latt stå 1 minutt, før røret ble snudd opp ned og resten av løsningen ble tilsatt. Røret ble vortexet, sentrifugert og inkubert ved 55°C i 3 timer etterfulgt av et trinn ved 70°C i 20 minutter etter en modifisert protokoll ved Li et al. (Li et al. 2008). Proteinase K løser opp det fikserte vevet og frigjør nukleinsyrene. Selve isoleringen starter når det tilsettes en buffer med det kaotropiske saltet guanidine thiocyanate som denaturerer proteiner og fører til at nukleinsyre, deriblant RNA binder til silika, og β-Mercaptoethanol som hindrer ribonukleaser (RNaser) i å degradere RNA. Prøvene ble filtrert og sentrifugert, og behandlet med DNAse I i et trinn der 30µl DNase treatment løsning tilsettes membranen

med de bundne nukleinsyrene og inkuberes ved 37°C i 15 minutter. DNase behandling sikrer at DNA som er tilstede ødelegges, slik at kun RNA elueres. Total RNA ble så eluert i 30 µl buffer (*Absolutely RNA FFPE Kit Instruction manual* 2008).

3.6.3 cDNA syntese ved revers transkripsjons PCR

Fordi RNA ikke kan brukes som templat av Taq polymerasen i en PCR, er det nødvendig å produsere komplementært DNA (cDNA) for kvantifisering med Real time PCR. I tillegg, siden RNA lett blir degradert av allestedsnærværende RNaser, er det ønskelig at prosessen skjer raskt etter ekstraksjonen. En cDNA syntese med QScript™ cDNA Supermiks, cat.#95048-025 (Quanta Bioscience Gaithersburg, Maryland, USA), ble utført umiddelbart etter isolering av RNA. Qscript Supermiks inneholder en blanding av oligo dT primer og random primere for optimal dannelse av cDNA. Miksen inneholder en RNase H (+) avledning fra MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase, hvilket gjør at RNA templatet bundet til cDNA (RNA/cDNA kompleks) ødelegges underveis mens revers transkripsjonsreaksjonen pågår. Reaksjonsmiksen bestod av 4 µl qScript cDNA Supermiks (5x), 6 µl RNase/DNase fritt vann og 10 µl templat. RT PCR ble satt opp ved følgende betingelser, 25°C i 5 minutter for annealing av primere, også de korte random hexamer, 42°C i 30 minutter for selve revers transkripsjonsreaksjon og 85°C i 5 minutter for inaktivering av reverse transcriptase enzymet, som ville kunne interferere med påfølgende real-time PCR. Deretter et avkjølingstrinn ved 4°C før prøvene umiddelbart ble fryst ned ved -20°C (*qScript™ cDNA Supermiks protocol* 2009).

3.6.4 Primerdesign

Til analyse av cellulære gener ble det benyttet kommersielle primer/probe assay.

Til analyse av E6 og E7 genene ble det for HPV 16 benyttet primere og prober som er tidligere publisert (Lanham et al. 2001). HPV 16 E7 revers primer er noe modifisert etter tidligere sjekk i database (Hansen et al. 2007), presentert i tabell 3.1 .

Ved søk i litteratur etter tidligere publiserte primer og probe for E6 og E7 for HPV typene 18 og 58, fantes det ingen som gav korte nok PCR produkter. Det ble derfor nødvendig å designe egne primere og prober for disse HPV typer. Fordi RNA som skal kvantiteres er

isolert fra formalinfiksert materiale, er det spesielt viktig at amplikon størrelsen ikke i særlig grad overstiger 100bp. Blokkene som er benyttet er oppbevart i lengre tid ved romtemperatur og utsatt for RNaser, i tillegg til at formalinfiksering fører til en modifisering av RNA ved at metylol grupper danner kryss bindinger til protein og nukleinsyrer. Dette resulterer i generelt lite utbytte og RNA som er spaltet i små fragmenter (Li et al. 2008).

Ved designing av primere og prober må en først velge et godt konservert område mellom ulike varianter av samme genotype. Primere og probe skal passe til alle varianter av de genotyper en ønsker å jobbe med og samtidig ikke amplifisere eller påvise andre genotyper. Det ble utført standard søk i database for å finne hele genomet til HPV 18 og 58. Fem ulike accession av hvert gen ble alignet ved hjelp av Clustal og det mest konserverte området ble kopiert og limt inn i Primer3. Standard verdier på parameterne (primerlengde, $T_{m,}$, antall GC'er etc) i Primer3 ble benyttet og primer/probe som ble foreslått fra programmet ble sjekket mot fullt genom og andre HPV typer. Primer og probe sekvenser for henholdsvis HPV 18 og 58 er presentert i tabell 3.2, og 3.3. De ulike primere og probe kombinasjoner som ble valgt oppfyller ikke alle ideelle kriterier, blant annet ikke ideell forskjell i smeltepunkttemperatur. Dette kan gi utslag for PCR effektivitet, men det viktigste hensyn ved design var å påvise et konservert område i det aktuelle genet for å sikre at metoden ikke er variant-spesifikk. Assayene for HPV 16 E6 og HPV 18 E6 er designet slik at primer eller probe er lokalisert i det spleisede området. For HPV 58 er E6 assay lokalisert i 3'enden av E6 genet, men vil også være typespesifikk for full-lengde E6, da E6* ikke kunne detekteres *in vitro* for denne HPV typen (Mesplede et al. 2012), og fordi spesifikke akseptorsekvenser (AGG) for spleising kun forekommer nedstrøms for forward primer i assayet.

Tabell 3.1 Primer og probesekvenser for HPV 16

Primer og probe	Nukleotidsekvens	Amplikonstørrelse
HPV 16 E6 For	5'-CAA-ACC-GTT-GTG-TGA-TTT-GTT-AAT-TA-3'	89bp
HPV 16 E6 Rev	5'-GCT-TTT-TGT-CCA-GAT-GTC-TTT-GC-3'	
HPV 16 E6 probe	5'-Fam-TGT-ATT-AAC-TGT-CAA-AAG-CCA-CTG-TGT-CCT-GAA-GAA-Tamra-3'	
HPV 16 E7 For	5'-ACC-GGA-CAG-AGC-CCA-TTA-CA-3'	120bp
HPV 16 E7 Rev	5'-GTG-CCC-ATT-AAC-AGG-TCT-TCC-A-3'	
HPV 16 E7 probe	5'-Fam-ATT-GTA-ACC-TTT-TGT-TGC-AAG-TGT-GAC-TCT-ACG-CTT-Tamra-3'	

Tabell 3.2 Primer og probe sekvenser for HPV 18

Primer og probe	Nukleotidsekvens	Amplikonstørrelse
HPV 18 E6 For	5'-CAT-TAT-TCA-GAC-TCT-GTG-TAT-GGA-G-3'	108bp
HPV 18 E6 Rev	5'-TGC-TGG-ATT-CAA-CGG-TTT-CT-3'	
HPV 18 E6 probe	5'-Fam TTA-ATA-AGG-TGC-CTG-CGG-TG-Eclipse-3'	
HPV 18 E7 For	5'-CGA-GCA-ATT-AAG-CGA-CTC-AG-3'	99bp
HPV 18 E7 Rev	5'-CAT-TGT-GTG-ACG-TTG-TGG-TTC-3'	
HPV 18 E7 probe	5'-Fam ATC-AAC-ATT-TAC-CAG-CCC-GA-Eclipse-3'	

Tabell 3.3 Primer og probe sekvenser for HPV 58

Primer og probe	Nukleotidsekvens	Amplikonstørrelse
HPV 58 E6 For	5'-TGT-CAA-AGA-CCA-TTG-TGT-CCA-3'	108bp
HPV 58 E6 Rev	5'-TCT-CCA-ACA-CAC-TGC-ACA-GC-3'	
HPV 58 E6 probe	5'-Fam ATA-TTT-CGG-GTC-GTT-GGA-CA-Eclipse-3'	
HPV 58 E7 For	5'-CAC-CAC-GGT-TCG-TTT-GTG-TA-3'	101bp
HPV 58 E7 Rev	5'-GTG-CAC-AGC-TAG-GGC-ACA-C-3'	
HPV 58 E7 probe	5'-Fam GCT-GCT-TAT-GGG-CAC-ATG-TA-Eclipse-3'	

3.6.5 Kvantitering av de to HPV gener for de valgte genotyper

For kvantitativ påvisning av HPV genene E6 og E7 for henholdsvis genotype 16, 18 og 58, ble det laget en positiv standard for hver av disse ved å benytte TOPO TA Cloning®, cat.#K4650-01(Invitrogen, Carlsbad, California). Utgangspunktet for kloning var et PCR produkt fra reaksjonsoppsett med egendesignede primere/prober på tidligere positive genotypede prøver fra forskningsbiobanken. PCR med Platinum Taq Polymerase, cat.#10966-018 (Invitrogen), ble utført i Thermal Cycler VWR Duocycler. PCR med totalvolum 25 µl hvor 2,5 µl templat, 1 µl av 10 µM F og R-primer, 2,5 µl 10 x PCR buffer, 0,5 µl 10 mM dNTP miks, 0,75 µl MgCl2, 0,1 µl Platinum Taq polymerase og 16,65 µl RNAse fritt vann ble utført. Templatet ble amplifisert ved følgende temperaturbetingelser; 45 sykluser med denaturering ved 94°C i 30 sekunder, annealing ved 48°C i 30 sekunder og elongering ved 72°C i 1 minutt. PCR produktet ble visualisert ved agarose gel elektroforese, renset og sekvensert.

For de andre genene som inngår i studien ble det benyttet kommersielle 'gene expression

assays' (Applied Biosystems). Disse var ferdig optimalisert for de betingelser som benyttes mens det for egendesignede assay var nødvendig å måle effektivitet for kvantitering av genene.

3.6.6 Tillaging av standardmateriale ved kloning

Kloning er en teknikk hvor levende bakterier benyttes for å lage mange kopier av en vektor som inneholder insert med valgt PCR produkt. Kloneprosessen består av to hovedtrinn. I første trinn blir et bestemt DNA fragment med kjent størrelse ligert inn i en vektor. I neste trinn blir vektoren transformert inn i levende bakterier. Når bakteriene replikerer, vil plasmidene (vektor med insert) kopieres tilsvarende.

PCR produkt fra Platinum Taq PCR ble klonet inn i vektor pCR®II-TOPO® (Invitrogen), figur 3.4.

Kloningsreaksjonen ble utført i henhold til instruksjonen i manualen som følger kitet. 1 µl salt løsning og 1 µl TOPO® vektor ble blandet med 4 µl ferskt PCR produkt. Dette ble mikset forsiktig og inkubert 5 minutter i romtemperatur, så over på is. I neste trinn ble 2 µl fra TOPO® klonereaksjon tilsatt TOP10F' One Shot® Chemically Competent *E.coli* Cells. Denne løsningen ble inkubert 5 minutter på is før den ble varmebehandlet i 30 sekunder ved 42°C uten å riste, for å øke opptak av fremmed DNA, så satt på is igjen. 250 µl S.O.C Medium ble tilsatt cellene og satt på risting 300rpm ved 37°C i en time (*TOPO TA Cloning*® 2006).

Vektoren pCR®II-TOPO® inneholder sekvenser som gir ampicillin- og kanamycin-resistens. Dette gjør det mulig å dyrke *E.coli* med denne vektoren på agar tilsatt ampicillin eller kanamycin og dermed unngå vekst av andre bakterier. I denne kloningen ble det benyttet LB-skåler tilsatt ampicillin.

Alle prøver ble spredd ut i to ulike volum; 20 µl (+20 µl S.O.C) og 50 µl, på skåler tilsatt 40 µl 40 mg/ml X-gal og 40 µl av 100 mM IPTG. Skålene ble inkubert overnatt ved 37°C.

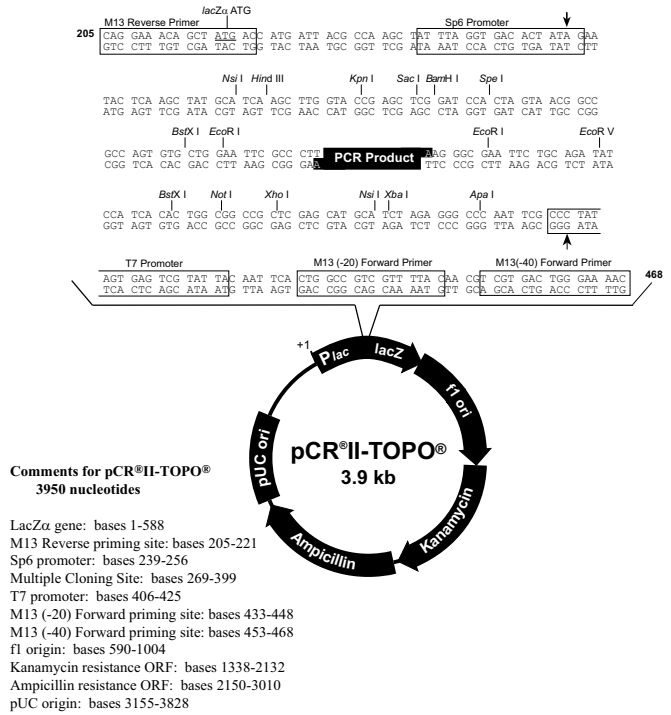
For å kunne identifisere *E.coli* kolonier med ligert PCR produkt, blir enzymet β-galaktosidase, kodet ved genet lacZ, benyttet. Enzymet har evne til å spalte X-gal slik at kolonien som vokser i mediet blir farget blå. Ligeringsstedet for PCR produktet ligger slik at det kløyver genet lacZ. Ved opptak av PCR produkt vil ikke bakterien produsere β-

galaktosidase og kolonien får ingen blå farge. Fem hvite kolonier fra hver prøve ble slammet opp i hvert sitt rør med LB-buljong tilsatt ampicillin og inkubert ved 37°C over natt.

Det ble lagd plasmidkultur og frysekultur av rør med bakterievekst. Plasmidkultur ble lagd ved å tilsette 50µl TE buffer til 50 µl kultur, koke ved 100°C i 15 minutter, avkjøle og sentrifugere ved 13000 rpm i 15 minutter. Frysekultur ble lagd ved å sentrifugere 1 ml kultur ved 8000 rpm i 15 minutter, fjerne supernatanten og tilsette 1 ml HIB- (Heart Infusion Broth-) buljong. Kulturene ble oppbevart i -20°C fryser.

3.6.7 Verifisering av insert

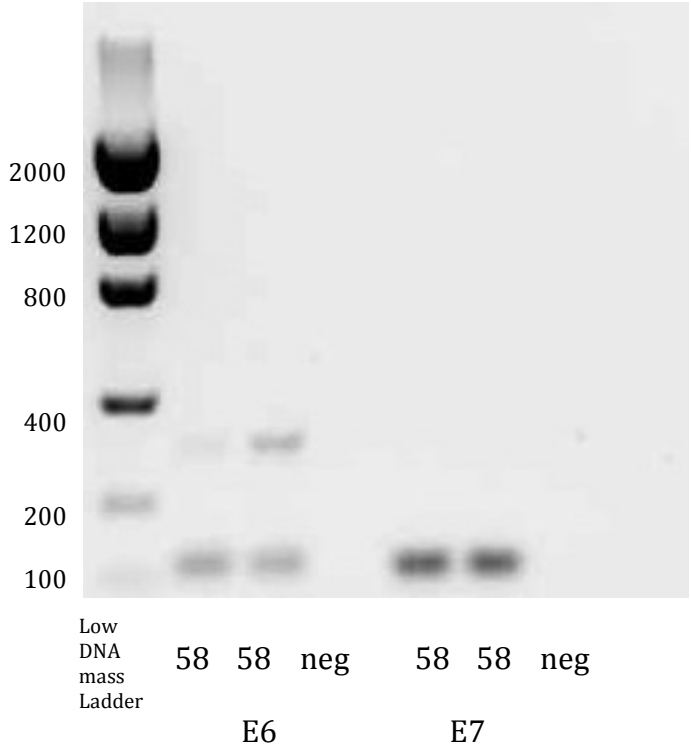
For å verifisere at rett insert var i plasmid, ble det utført PCR med M13 primere for å amplifisere genområdet med insert, se figur 3.4. PCR produkt ble visualisert på gel og sekvensert. PCR med følgende reagenser og volum ble utført for alle plasmidkulturer: 2,5 µl 10x PCR buffer, 1,75 µl 50 mM $MgCl_2$, 0,75 µl 10 mM dNTP, 1 µl 10 mM F-primer M13, 1 µl 10 mM R-primer M13, 0,1 µl Platinum Taq polymerase (Invitrogen),16,25 µl dH_2O og 2 µl templat. Amplifisering ble gjort i Duocycler (Applied Biosystems) med følgende temperaturbetingelser; totalvolum 25 µl, 95°C i 10 minutter, så 25 sykler med 94°C i 1 minutter, 55°C i 1 minutt og 72°C i 1 minutt.



Figur 3.4 Kart over plasmidvektor (*TOPO TA Cloning*® 2006)

3.6.8 Agarose gel elektroforese

PCR produktene ble visualisert ved agarose gel elektroforese. 4 µl PCR produkt blandet med 1 µl BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen) ble tilsatt brønnene i gelen ved siden av en DNA standard med kjent størrelse, DNA Low Mass Ladder (Invitrogen). Gelen ble kjørt i PowerPac™ Basic (BioRad, Hercules, California) på 70V i 45 minutter og visualiseres med GelDoc2000, figur 3.5 Sorte "bånd" viser at vi har amplikon av riktig størrelse, ca 100bp. Tilsvarende ble utført for HPV 16 og 18 (BioRad).



Figur 3.5
Agarosegel etter PCR med spesifikke HPV58 E6 og E7 primere..

3.6.9 DNA sekvensering

PCR produkt ble renset for uinnkorporerte overskuddsprimere fra PCR reaksjonen med Illustra™ ExoStar, cat.#US78220 (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). Videre ble de sekvensert med BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, cat.#4337450 (Applied Biosystems) på instrument ABI 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). For sekvenserings PCR ble 1 µl BigDye® Terminator v1.1 mikset med 3 µl 2,5x sekvenseringsbuffer, 1 µl forward eller revers primer med konsentrasjon 3,2 µM, 3 µl dH20 og 2 µl DNA plasmid. PCR ble kjørt i Duocycler (Applied Biosystems), med følgende

temperatur betingelser; 25 sykluser med denaturering ved 96°C i 10 sekunder, annealing ved 50°C i 5 sekunder og polymerisering ved 60°C i 4 minutter. Til slutt var det programmert et avkjølingstrinn ned til 4°C. Produktene ble renset med AB XTerminator purification kit, cat.#4376486 (Applied Biosystems), 45µl SAM™ løsning ble blandet med 10 µl XTerminator™ løsning og tilsatt til hver prøve, dette ble ristet i 15 min ved 2000 rpm og sentrifugert før de ble sekvensert i ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Etter endt kjøring ble prøvene tilsatt 20 µl HiDi formamide og kjørt om i 3130xl Genetic Analyzer for bedre oppklaring av sekvensene.

3.6.10 Isolering av plasmid med Purelink™ Quick Plasmid Miniprep Kit

Det ble valgt ut et plasmid for hver HPV type og utført ny tillaging av plasmidkultur for å gå videre med kvantifiserings PCR. Et knappenålshode stor bit av fryst kultur ble slemmet i 2 ml LB-buljong med ampicillin, inkubert ved 37°C med risting over natt. Ny plasmidkultur ble isolert med Purelink™ Quick Plasmid Miniprep Kit, cat.#K2100-10 (Invitrogen, Carlsbad, California). Dette kitet benytter en alkaline/SDS (sodium dodecyl sulfate) prosedyre for å lysere cellene og denaturere både plasmid DNA og kromosomalt DNA. Kolonnebasert rensing avsluttes ved å eluere i 75 µl TE buffer.

3.6.11 Måling med Nanodrop™ 1000 Spektrofotometer

Renset plasmid ble konsentrasjonsbestemt ved måling med Nanodrop™1000 Spektrofotometer (Saveen & Werner, Limhamn, Sverige). Systemet bruker fiberoptisk teknologi, og ved hjelp av overflatespenningen til væsken holdes 1 µl prøvemateriale på plass mellom to optiske plater og danner en væskesøyle mens målingen pågår. Konsentrasjonsmålingen foregår ved å måle prøvens absorbans ved 230, 260 og 280 nm. (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer v 3.7 User's Manual* 2009).

3.6.12 Tillaging av standardkurve

For å kunne lage en standardkurve, ble Avogadros konstant benyttet til å estimere antall kopier av plasmid med HPV insert per mikroliter. Denne beregningen ble gjort på følgende måte for HPV 16 E6:

Beregner molekylvekt i Daltons (Da) (g/mol) for plasmid med insert:

Plasmid: 4062 bp
Insert: 108 bp

$$4170 \text{ x } 660 \text{ g/mol} = \underline{2752200 \text{ g/mol}}$$

Beregning av antall kopier per µl i plasmidstockløsning med Avogadros tall ($6{,}02214199 \text{ x } 10^{23} \text{ mol}^{-1}$):

$$\frac{139 \text{ ng/µl x } 6{,}02 \text{ x } 10^{23} \text{ kopier/mol}}{10^{9} \text{ ng/g x } 2752200 \text{ g/mol}}$$

$$\underline{= 31 \text{ x } 10^{9} \text{ kopier/µl}}$$

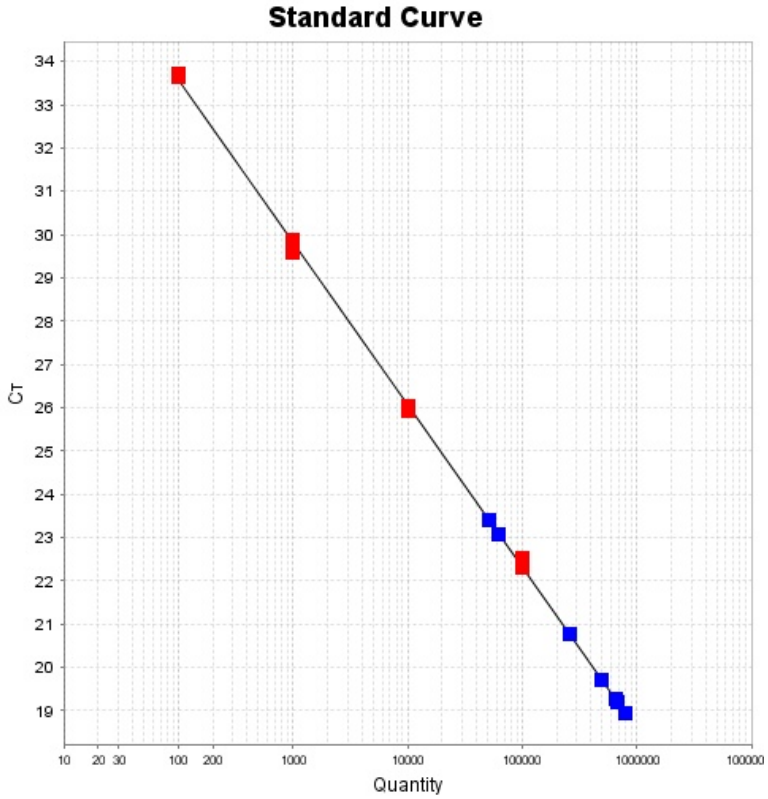
For å lage en fortynningsserie av plasmidet ble det regnet ut hvor mange µl plasmidstock som behøves for å lage en løsning med 10 millioner kopier/ µl:

$$\frac{10^{7} \text{ x } 1000 \text{ µl}}{31 \text{ x } 10^{9} \text{ kopier/µl}}$$

$$\underline{= 3{,}2 \text{ µl}}$$

996,8 µl TE-buffer ble tilsatt 3,2 µl plasmid. Fortynningsserie fra 10 mill kopier/µl -0,1 kopier/µl ble lagd og analysert med respektivt HPV primersett i real-time PCR. Ved å generere en lineær standardkurve som viser sammenheng mellom utgangsmengde templat og antall PCR sykler kan PCR's effektivitet vurderes.

Plasmid for E6 og E7 ble derfor bekreftet ved sekvensering og benyttet til standard kurve. Fire ulike fortynninger av standard ble kjørt sammen med prøvene i de respektive PCR' er for E6 og E7 for HPV 16, 18 og 58. I figur 3.6 vises standardkurve for HPV 18 E6. Det sees en lineær, jevn stigning for fortynninger ned mot 100 kopier/µl.



Figur 3.6 Eksempel på standard kurve resultat for plasmid med HPV 18 E6 (røde firkanter) og prøver (blå firkanter).

3.7 Preamplifikasjon av cDNA

TaqMan®PreAmp Master Miks Kit, PN#4384266 (Applied Biosystems), brukes for å øke den kvantitative mengden av cDNA. Denne kan benyttes i forkant av genuttrykks analyser før den kvantitative analysen og flere hundre ulike målgener kan kombineres i en pre amplifikasjonsprosess. Denne prosessen gjør det mulig å detektere selv veldig lave cDNA mengder i løsning, og er dermed spesielt egnet for celler isolert med LCM fra FFPE prøver.

En masterstudent i samme faggruppe ved Ahus har sjekket at alle amplikoner blir amplifisert uniformt uten forskyvinger for pre amplifisert materiale i en fortynningsrekke forut for pre amplifikasjonsreaksjon (M. Hansen personlig kommunikasjon).

En slik uttesting anbefales fra leverandør ved bruk av preamplifisering. Det anbefales i tillegg å vurdere antall pre amplifiserings sykluser som skal inngå i analysen. For dette formål ble cellelinjer infisert med HPV 16, CaSki celler, benyttet. RNA ble eluert, cDNA ble dannet og det ble utført pre amplifisering ved ulike betingelser. 14 sykluser og 10 µl templat

inn i reaksjonen ble funnet å være ideell. Denne pre amplifiseringsmetode er benyttet for resultater presentert ved kongress i Canada 2011 (Hansen et al. 2007).

Bestilte frysetørkede primere og prober ble løst opp til en 100 µM konsentrasjon. For bruk i pre amplifikasjon og amplifikasjon ble det tatt utgangspunkt i generell anbefaling av konsentrasjon for primer og probe i reaksjoner for real time PCR; 0,9µM for primer og 0,2µM for probe. Fordi de kommersielle 'gene expression assays' er fortynnet 20x, ble en 20x pool for hver av HPV genene også med forward primer, reverse primer og probe, tabell 3.4. For preamplifiseringsreaksjonen ble det lagd 3 ulike pool'er med de aktuelle gener for hver av HPV typene. Det ble tatt hensyn til mengde templat som var nødvendig for påfølgende PCR amplifisering (hvor 5µl templat per assay var nødvendig for syv ulike gener). Tilstrekkelig totalvolum for pre amplifiseringsreaksjonen ble vurdert til å være 40 µl (35 µl + 5 µl dødvolum). Det ble lagd tre ulike miks for preamplifiseringsreaksjonen, en per HPV type. 20 µl TaqMan PreAmp Mastermiks 2x ble blandet med 10 µl pooled assay miks 0,2x. Dette ble fordelt i respektive brønner på PCR plate før 10 µl cDNA ble tilsatt. PCR ble kjørt ved følgende temperatur betingelser; 95°C i 10 minutter, så 14 sykler med 95°C i 15 sekunder og 60°C i 4 minutter (*TaqMan® PreAmp Master Mix Kit Protokoll* 2010).

Tabell 3.4 Oversikt over de ulike gener som inngår i studien

Gener av interesse	Katalognummer	Kommentar
HPV 16 E6 (For HPV 16 pos prøver)		For disse gener finnes det ingen ferdige assay, (primere og probe kombinasjon). Det er derfor gjort søk, bestilling og optimalisering av real time PCR for disse primere og prober som en del av oppgaven.
HPV 16 E7 (For HPV 16 pos prøver)		
HPV 18 E6 (For HPV 18 pos prøver)		
HPV 18 E7 (For HPV 18 pos prøver)		
HPV 58 E6 (For HPV 58 pos prøver)		
HPV 58 E6 (For HPV 58 pos prøver)		
P16/CDKN 2A	Hs00923894_m1	For disse gener er det kjøpt inn kommersielle assay med ferdig standardiserte reagenser og volum.
SERPIN B5	Hs00985285_m1	
TMEM45 A	Hs01046616_m1	
hTERT	Hs00972656_m1	
GAPDH	Hs02758991_g1	

3.8 Real Time PCR amplifisering av preamplifisert cDNA

For å kvantitere mengde preamplifisert cDNA i de ulike prøver, ble det utført syv parallelle Real Time PCR, for de syv genene, per prøve. De ulike PCR'er ble satt på Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California). Det ble laget tre

like templater og satt opp tre ulike kjøringer for henholdsvis HPV 16, HPV 18 og HPV 58 positive prøver, se figur 3.7. Det ble lagd miks for hvert gen med følgende volum; 10 µl TaqMan Gene Expression Mastermiks, 1 µl Primer/probe miks 20x, 4 µl RNase fritt vann og 5 µl templat. PCR programmet består av et trinn hvor prøvene inkuberes ved 50°C i 2 minutter for å aktivere AmpErase UNG, et enzym som hindrer eventuell "carry-over" av tidligere amplifiserte produkter. Neste trinn er et aktiveringstrinn for enzymet AmpliTaq Gold DNA polymerase hvor prøven inkuberes i 95°C i 10 minutter. Videre kjøres 40 sykler med denaturering ved 95°C i 15 sekunder og annealing ved 60°C i 1 minutt. For å kunne få en kvantifisering av metoden ved hjelp av standardkurve for E6 og E7 for henholdsvis HPV 16, 18 og 58, ble det satt opp en fortynningsrekke av tilsvarende plasmid fra 10^4 til 10^1 kopier/µl i samme PCR. TaqMan Gene Expression Assays Protocol anbefaler flere replikater av samme prøve men fordi det kliniske materialet er begrenset ble alle prøvene satt opp enkeltvis. Standardene ble satt opp i duplikat. Analysering av data ble utført ved hjelp av ABI 7500 software.

a)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	Prøve 1	Prøve 1	Prøve 1	Prøve 1	Prøve 1	Prøve 1	Prøve 1					
b	Prøve 2	Prøve 2	Prøve 2	Prøve 2	Prøve 2	Prøve 2	Prøve 2					
c	Prøve 3	Prøve 3	Prøve 3	Prøve 3	Prøve 3	Prøve 3	Prøve 3					
d	Prøve 4	Prøve 4	Prøve 4	Prøve 4	Prøve 4	Prøve 4	Prøve 4					
e	Prøve 5	Prøve 5	Prøve 5	Prøve 5	Prøve 5	Prøve 5	Prøve 5					
f	Prøve 6	Prøve 6	Prøve 6	Prøve 6	Prøve 6	Prøve 6	Prøve 6					
g	Prøve 7	Prøve 7	Prøve 7	Prøve 7	Prøve 7	Prøve 7	Prøve 7					
h												

b)

HPV 16 E6
HPV 16 E7
P16/CDKN2
SERPIN B5
TMEM 45A
hTERT
GAPDH

Figur 3.7 a) Oppsett på 96 brønners plate for hver av HPV typene. b) Fargekoder for miks

3.9 Relativ kvantitering med ΔCt mot referansegenet GAPDH

Ved studier av mRNA kan det ikke gjøres noen reell absolutt kvantitering med den benyttede teknikken fordi reverse transkripsjon som inngår ikke gir 100 % utbytte. Det ble benyttet relativ kvantitering med komparativ Ct metode (ΔCt) for å sammenligne mRNA uttrykk fra de ulike gener i aktuelt prøvemateriale (*Real-Time PCR Systems Chemistry Guide* 2005).

På grunn av manglende standardisering for Real time PCR med egendesignede primere, som

følge av at primere og prober ble valgt med utgangspunkt i virussekvenser med lite variasjon, heller enn optimale temperaturer, og G/C innhold med mer, ble Ct verdiene, for E6 og E7 fra de ulike typene, korrigert for å ta hensyn til den aktuelle PCR's effektivitet.

3.9.1 Korrigert Ct

For de ulike E6 og E7 PCR 'er ble standard kurve laget for hver PCR og cDNA mengde for hver prøve ble absolutt kvantitert. Korrigert Ct verdi ble da regnet ut for hver av prøvene.

Følgende formel ble benyttet:

$$y = slope * \log(x) + b$$

Hvor: y= cycle threshold (Ct), slope= stigningstall for standard kurve, x = 'faktor' for Ct verdi, b = (y-intercept) hvor grafen treffer y-aksen i standard kurve

Utregningseksempel for HPV 16 E6:

1) Utført PCR med plasmidstandard viser en beregnet PCR effektivitet lik 94,814 %. Ut fra denne prosentverdien beregnes stigningstall: (Stigningstallet oppgis også som resultat fra Real time PCR, beregnet verdi og maskinverdi er identiske)

=-1/LOG(94,814 %/100+1)

=-3,453

3) Deretter beregnes antall kopier i prøven ut fra oppgitt Ct (ved treshold 25,5 for 10000 kopier, se figur 3.8), stigningstall og y-intercept:

=10^((20,3334-39,2040)/-3,453)

= 291835

4) Beregnet verdi for antall kopier i prøven benyttes for å estimere en korrigert Ct verdi sammen med et ideelt stigningstall som tilsvarer 100% effektivitet:

=38,78-3,32*LOG(291835)

= 20,64

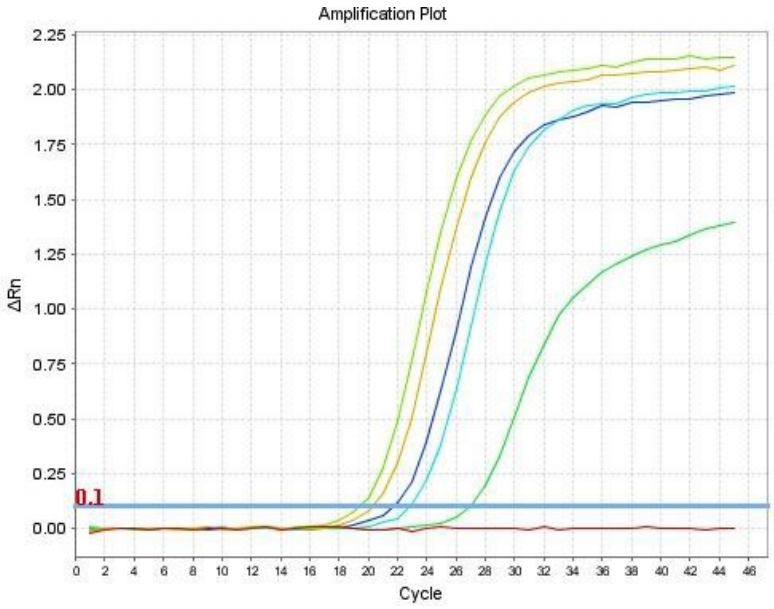
3,32 er ideelt stigningstall for en PCR syklus (eksponentiell stigning) 38,78 er beregnet for ideell y- intercept (i) ved 100 % effektivitet og Ct 25,5 ved 10000 kopier/µl.

$$25{,}5 = -3{,}32*(\log 10000)+i$$

$$i = 25{,}5 + 3{,}32*4$$

$$i = 38.78$$

Disse utregninger for å korrigere Ct ble utført i alle prøver for alle E6 og E7 resultat fra de tre HPV typene, 16, 18 og 58. Det er ikke nødvendig å korrigere Ct for de humane genene. Disse er utført på kommersielle assay som fra leverandør er optimalisert slik at effektivitet for disse PCR antas å være så nær 100 % som mulig. I tillegg, siden disse genene er felles for alle prøver, kan disse sammenlignes direkte med hverandre i motsetning til HPV genene, E6 og E7, der det er designet 3 ulike PCR'er med hver sin effektivitet.



Figur 3.8 Lineært amplifikasjonsplot for HPV 16 E6 positive prøver. Treshold er satt til 0,1 for å tilpasse at 10000 kopier/µl gir Ct 25,5.

3.9.2 Statistisk analyse ved relativ komparativ metode

For hver prøve, ble Ct verdiene for de ulike analyserte HPV genene normalisert mot korresponderende Ct verdi fra husholdningsgenet GAPDH. (ΔCt = Ct for gen av interesse – Ct

for GAPDH). GAPDH ble valgt på bakgrunn av tilgjengelig litteratur med tidligere genuttrykksstudier (Daud & Scott 2008; Lanham et al. 2001). For hvert gen ble det regnet ut gjennomsnitt og standard avvik for ΔCt verdiene, for de 3 ulike typer HPV. Statistisk analyse av genekspresjonsdataene for alle gener ble utført ved hjelp av T-test (to-sidig, ulik varians) for å avdekke eventuelle signifikante forskjeller i genuttrykket mellom de ulike HPV typer. P-verdier er oppgitt i tabellform, hvor signifikante funn er markert med en, to eller tre stjerner, avhengig av signifikansgrad (P <.1*, P < .05** og P <.01***). I tillegg ble ΔΔCt verdier, med standard avvik, beregnet for hvert gen for HPV 18 og 58, med HPV 16 som referanse, for å illustrere fold-change i genuttrykk mellom HPV 18 og 58 i forhold til HPV 16. Dataene ble plottet inn i histogrammer.

4 Resultater

4.1 Verifisering av HPV type og CIN3 diagnose

Alle kasus som inngår i studien ble valgt ut med bakgrunn i CIN 3 diagnose og HPV type fra cytologisk cellemateriale. Fordi prøvematerialet som benyttes i studien blir hentet fra histologisk prøve i form av parafininnstøpte konuspreparat eller biopsi fra portio fra samme pasient, er det viktig å verifisere disse funn i materialet vi jobber med før disse inkluderes videre i studien. Alle CIN 3 diagnoser ble sjekket av patolog i mikroskop. Tilfeller hvor CIN 3 ikke ble funnet ble utelatt fra studien. DNA mengde ble målt ved Quantifiler, og mengde varierte fra 0,7 – 8,2 ng/µl. HPV type ble verifisert med genotyping, tabell 4.1. I et tilfelle kunne ikke genotypingsanalysen bekrefte opprinnelig cytologisk påvist HPV type. Prøven ble derfor utelatt fra studien. I tillegg ble to prøver hvor tidligere cytologisk celleprøve resultat ikke kunne verifiseres, utelatt fra studien.

Tabell 4.1 Oversikt over kasus som inngår i studien, med celleforandringsstatus, genotype og mengde DNA.

Nummerering	Celleforandring (HE kontrollsnitt)	Luminex resultat	Gjennomsnitt ng/µl	Kommentar
Prøve 1	CIN 3	HPV 16	7,3	HPV 52 ligger i gråsonen
Prøve 2	CIN 3	HPV 16	3,7	
Prøve 3	CIN 3	HPV 16	4,3	
Prøve 4	CIN 3	HPV 16	3,5	
Prøve 5	CIN 2	HPV 39		Utelates
Prøve 6	Ingen dysplasi	HPV 16		Utelates
Prøve 7	CIN 2+3	HPV 18	0,7	
Prøve 8	CIN 3	HPV 18	8,2	
Prøve 9	CIN 3	HPV 18	1,6	
Prøve 10	Ingen dysplasi	HPV 18		Utelates
Prøve 11	CIN 3	HPV 18	1,8	
Prøve 12	CIN 3	HPV 18	1,4	
Prøve 13	CIN 3 + adenokarsinom	HPV 18	4,9	Prøve 13 og 14 er samme pasient
Prøve 14	CIN 3	HPV 18	1,6	
Prøve 15	CIN 3	HPV 58	2,0	
Prøve 16	CIN 3	HPV 58	4,5	
Prøve 17	CIN 3	HPV 58	2,9	
Prøve 18	CIN 2 + 3	HPV 58	2,0	
Prøve 19	CIN 3	HPV 58	3,6	
Prøve 20	CIN 2 + 3	HPV 58	1,1	
Prøve 21	CIN 3	HPV 16	1,2	
Prøve 22	CIN 3	HPV 16	1,0	

For et HPV 18 positivt tilfelle ble det tatt med to ulike prøver fra samme pasient, siden det ble påvist to diagnoser.

Etter real time PCR og avlesning av Ct verdier for husholdningsgenet GAPDH, sees en gjennomsnittlig Ct for GAPDH på 23. Prøver der Ct verdier for GAPDH var over 27 ble ikke inkludert i studiens utregninger (prøve 1, 4 og 17). Økt Ct verdi med 6,5 sykluser tilsvarer ca 100 x mindre RNA for disse prøver. I disse prøvene var heller ikke E6 og E7 uttrykk konsekvent målbart.

4.2 Resultat for HPV E6 og E7

Tre ulike PCR oppsett for HPV genene E6 og E7 ble utført. Tabell 4.2 viser oppgitt PCR effektivitet i prosent og y-intercept for disse PCR'er med egendesignede primere og prober. Ved hjelp av effektivitet målt i prosent er stigningstallet beregnet for henholdsvis HPV 16 E6 og E7, 18 E6 og E7 og 58 E6 og E7 PCR. Y-intercept ble oppgitt fra ABI 7500 ved beregning når treshold ble satt til Ct 25,5 for 10000 kopier/µl.

Tabell 4.2 Oversikt over PCR effektivitet, stigningstall og intercept for de ulike PCR kjøringer for E6 og E7 for HPV 16, 18 og 58.

gen	effektivitet %	stigningstall	y-intercept
HPV 16 E6	94,81	-3,453	39,20
HPV 16 E7	90,25	-3,580	39,88
HPV 18 E6	84,90	-3,746	40,52
HPV 18 E7	95,82	-3,426	39,23
HPV 58 E6	93,24	-3,495	39,65
HPV 58 E7	89,61	-3,599	40,18

Stigningstall og y-intercept, (hvor grafen treffer y-aksen,) er avgjørende for hvordan Ct verdien korrigeres. Opprinnelige Ct verdier og Ct korrigert for HPV E6 og HPV E7 presenteres i tabell 4.3.

Tabell 4.3 Oversikt over avlest Ct verdi for henholdsvis HPV E6 og HPV E7, beregnet antall kopier/µl, korrigert Ct verdi, Ct for husholdningsgenet GAPDH og ΔCt for de ulike HPV 16, 18 og 58 positive prøver. *= korrigerte verdier.

	E6	**Antall kop/µl**	**E6**	**GAPDH**	**ΔCt***
	GOI	GOI	Ct	HKG	
HPV 16					
Prøve 2	20,33	291835	20,64	21,82	1,18*
Prøve 3	19,47	519475	19,80	21,27	1,47*
Prøve 21	22,88	53445	23,08	23,80	0,72*
Prøve 22	21,82	108539	22,06	22,96	0,90*
HPV 18					
Prøve 7	18,64	691054	19,39	22,44	3,05*
Prøve 8	18,31	846241	19,10	20,16	1,06*
Prøve 9	19,11	519836	19,80	21,53	1,73*
Prøve 11	22,52	63705	22,83	24,16	1,33*
Prøve 12	20,17	270184	20,75	23,27	2,52*
Prøve 13	18,72	659839	19,46	20,64	1,18*
Prøve 14	22,83	52636	23,11	23,97	0,86*
HPV 58					
Prøve 15	24,86	17156	24,72	25,24	0,52*
Prøve 16	22,33	90666	22,32	25,07	2,75*
Prøve 18	26,15	7292	25,96	26,98	1,02*
Prøve 19	20,98	220418	21,04	24,12	3,08*
Prøve 20	21,82	126910	21,84	22,58	0,74*

	E7	**Antall kop/µl**	**E7**	**GAPDH**	**ΔCt***
	GOI	GOI	Ct	HKG	
HPV 16					
Prøve 2	20,74	222904	21,02	21,82	0,80*
Prøve 3	20,92	199175	21,19	21,27	0,08*
Prøve 21	23,31	42686	23,41	23,80	0,39*
Prøve 22	21,52	134747	21,75	22,96	1,21*
HPV 18					
Prøve 7	18,79	927054	18,97	22,44	3,47*
Prøve 8	16,63	3949068	16,88	20,16	3,28*
Prøve 9	18,63	1032152	18,81	21,53	2,72*
Prøve 11	21,69	131947	21,78	24,16	2,38*
Prøve 12	19,78	476357	19,93	23,27	3,34*
Prøve 13	18,32	1272755	18,51	20,64	2,13*
Prøve 14	21,99	107544	22,08	23,97	1,89*
HPV 58					
Prøve 15	23,70	38025	23,57	25,24	1,67*
Prøve 16	22,24	96815	22,23	25,07	2,84*
Prøve 18	26,13	8043	25,81	26,98	1,17*
Prøve 19	20,00	406226	20,16	24,12	3,96*
Prøve 20	21,31	176093	21,36	22,58	1,22*

Tabell 4.4 viser gjennomsnitt av ΔCt verdier for uttrykk av E6 og E7, henholdsvis for de ulike HPV typer 16, 18 og 58.

Tabell 4.4 Resultat for gjennomsnittsberegning av ΔCt, SD ΔCt, ΔΔCt, 2^-ΔΔCt ± SD for HPV E6 og E7.

E6	**Gj.snitt ΔCt**	**SD ΔCt**	**ΔΔCt**	**2^-ΔΔCt**	**SD max**	**SD min**
HPV 16	-1,07	0,33	0,00	1,00	1,26	0,80
HPV 18	-1,68	0,82	-0,61	1,53	2,69	0,87
HPV 58	-1,62	1,20	-0,56	1,47	3,37	0,64

E7	**Gj.snitt ΔCt**	**SD ΔCt**	**ΔΔCt**	**2^-ΔΔCt**	**SD max**	**SD min**
HPV 16	-0,62	0,49	0,00	1,00	1,40	0,71
HPV 18	-2,74	0,63	-2,12	4,36	6,76	2,81
HPV 58	-2,17	1,21	-1,55	2,93	6,76	1,27

For de virale onkogener ble det funnet signifikante forskjeller mellom prøvene positive for type 16 og de to andre HPV typene. Til gjengjeld var verken E6 eller E7 signifikant forskjellig uttrykt mellom prøver positive for HPV 18 og prøver positive for HPV 58, tabell 4.5 og figur 4.1.

Resultatene viste at spesielt E7 var signifikant mer uttrykt i HPV 18 og HPV 58 positive prøver enn i HPV 16 positive prøver. Det sees blant annet et 4 ganger sterkere uttrykk av E7 for HPV 18 enn for referansegruppen HPV 16. For HPV 58 sees et 3 ganger sterkere uttrykk av E7 enn for HPV 16, figur 4.1 b).

E6/E7 ratio var signifikant forskjellig for HPV 18 og 58 sammenlignet med HPV 16,

figur 4.1 c). Gruppen med CIN3 prøvene positive for HPV 16 viste et høyere uttrykk av E6 enn av E7 (ratio større enn 1,) mens forholdet var motsatt for CIN3 prøvene forårsaket av typene 18 og 58.

a)

E6	P-verdi
HPV 16 vs HPV 18	0,13
HPV 16 vs HPV 58	0,39
HPV 18 vs HPV 58	0,93

b)

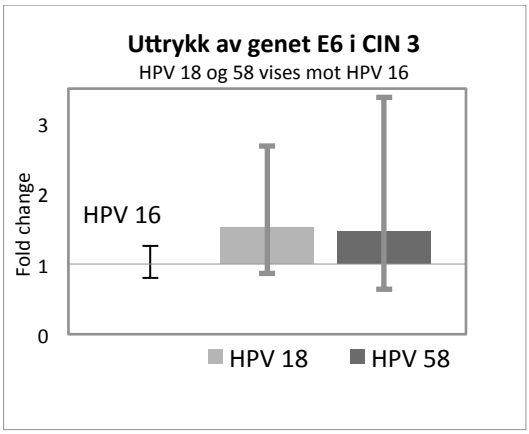
E7	P-verdi
HPV 16 vs HPV 18	0,0003***
HPV 16 vs HPV 58	0,0433**
HPV 18 vs HPV 58	0,37

c)

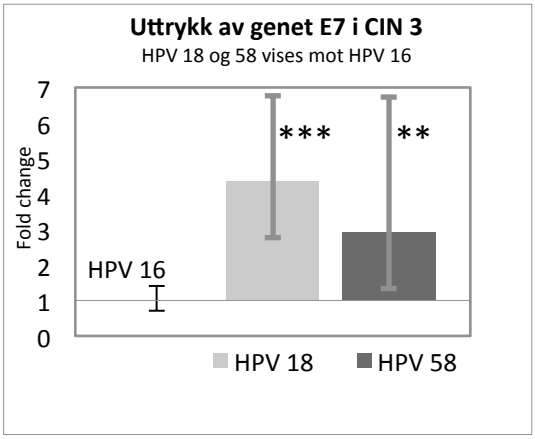
E6/E7 ratio	P-verdi
HPV 16 vs HPV 18	0,01***
HPV 16 vs HPV 58	0,05**
HPV 18 vs HPV 58	0,11

Tabell 4.5 T-test av ΔCt-verdier for HPV 16, 18 og 58. P-verdier for HPV genene a) E6, og b) E7.

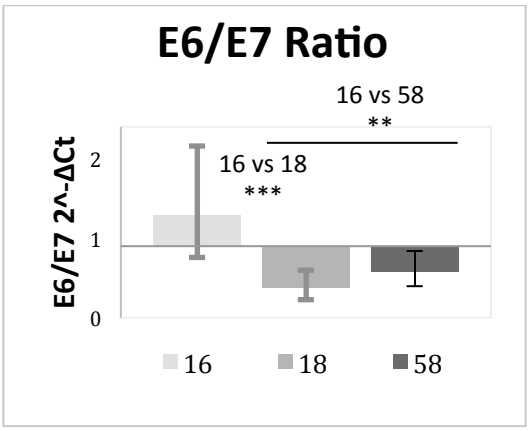
a)



b)



c)



Figur 4.1 Histogram med genuttrykk i HPV 18 og 58 positive prøver sammenlignet mot HPV 16 positive prøver i prøvemateriale diagnostisert med CIN3. Stolpene viser log 2 transformert gjennomsnitt av ΔΔCt ± SD, hvor HPV 16 representerer 'fold change' lik 1. a) HPV E6 b) HPV E7. c) E6/E7 ratio.

(***=signifikant forskjell mellom HPV 16 og 18 (p<.01), **= signifikant forskjell mellom HPV 16 og 58 (p<.05).

4.3 Resultat for de cellulære genene

For de humane cellulære gener som inngår i studien; p16/CDKN2A, TMEM 45 A, SERPIN B5 og hTERT, ble det også funnet signifikante forskjeller for genuttrykk mellom HPV 16 positive og de to andre HR HPV. For prøvene positive for HPV 18 og prøvene positive for HPV 58, var de cellulære genene ikke signifikant forskjellig uttrykt.

Ct verdier for genet hTERT, tilhørende Ct verdi for GAPDH for samme prøve og ΔCt er presentert i tabell 4.6. For dette genet sees en større variasjon i resultatene, og genet ble ikke detektert i 7 av 16 prøver samtidig som det sees relativt høye Ct verdier. Mest konsekvent var imidlertid HPV 18 hvor 6 av 7 ble funnet positive for hTERT. Det ble på grunn av denne uregelmessige deteksjon ikke utført statistikk på disse verdiene siden dataene ikke er normalfordelt.

Genene p16/CDKN2A og TMEM 45A var signifikant mer uttrykt i HPV 58 positive prøver sammenlignet med HPV 16 positive prøver. Genet p16/CDKN2A er 2 ganger mer uttrykt i HPV 58 positive prøver enn HPV 16, tabell 4.7 og figur 4. 2. Genet TMEM 45A var 5 ganger oppregulert hos HPV 58 positive prøver i forhold til HPV 16 positive prøver.

Genet SERPIN B5 ble påvist i alle prøver men viste liten variasjon blant de ulike HR HPV typer. Ingen signifikante forskjeller ble funnet, tabell 4.5 og figur 4.2.

Tabell 4.6 Ct verdier for genet hTERT, husholdningsgenet GAPDH og ΔCt.

hTERT		Ct	GAPDH	ΔCt
HPV 16	Prøve 2	26,37	21,82	4,55
	Prøve 3	26,40	21,27	5,13
	Prøve 21	29,98	23,8	6,18
	Prøve 22	-	22,96	-
HPV 18	Prøve 7	25,47	22,44	3,03
	Prøve 8	23,89	20,16	3,73
	Prøve 9	27,27	21,53	5,74
	Prøve 11	-	24,16	-
	Prøve 12	27,93	23,27	4,66
	Prøve 13	27,99	20,64	7,35
	Prøve 14	28,97	23,97	5,00
HPV 58	Prøve 15	-	25,24	-
	Prøve 16	35,86	25,07	10,79
	Prøve 18	-	26,98	-
	Prøve 19	22,34	24,12	-1,78
	Prøve 20	-	22,58	-

Tabell 4.7 Resultat for gjennomsnittsberegning av ΔCt, SD ΔCt, ΔΔCt, 2^-ΔΔCt ± SD for a) p16/CDKN2A, b) SERPIN B5 og c) TMEM 45A.

a)

p16/CDKN2A		Ct	GAPDH	ΔCt	Gj.snitt ΔCt	ΔCt SD	ΔΔCt	2^-ΔΔCt	SD max	SD min
HPV 16	Prøve 2	21,93	21,82	0,11	0,45	0,48	0,00	1,00	1,39	0,72
	Prøve 3	21,27	21,27	0,00						
	Prøve 21	24,79	23,80	0,99						
	Prøve 22	23,68	22,96	0,72						
HPV 18	Prøve 7	22,80	22,44	0,36	-0,07	0,73	0,52	1,44	2,38	0,87
	Prøve 8	20,95	20,16	0,79						
	Prøve 9	20,82	21,53	0,71						
	Prøve 11	22,96	24,16	1,20						
	Prøve 12	22,85	23,27	0,42						
	Prøve 13	20,77	20,64	0,13						
	Prøve 14	24,55	23,97	0,58						
HPV 58	Prøve 15	24,86	25,24	0,38	-0,44	0,86	0,89	1,85	3,37	1,02
	Prøve 16	24,73	25,07	0,34						
	Prøve 18	25,97	26,98	1,01						
	Prøve 19	22,77	24,12	1,35						
	Prøve 20	23,48	22,58	0,90						

b)

SERPIN B5		Ct	GAPDH	ΔCt	Gj.snitt ΔCt	ΔCt SD	ΔΔCt	2^-ΔΔCt	SD max	SD min
HPV 16	Prøve 2	20,92	21,82	0,90	-1,13	0,34	0,00	1,00	1,26	0,79
	Prøve 3	19,79	21,27	1,48						
	Prøve 21	23,01	23,8	0,79						
	Prøve 22	21,61	22,96	1,35						
HPV 18	Prøve 7	20,95	22,44	1,49	-1,20	0,86	-0,07	1,05	1,91	0,58
	Prøve 8	18,77	20,16	1,39						
	Prøve 9	18,64	21,53	2,89						
	Prøve 11	23,68	24,16	0,48						
	Prøve 12	22,21	23,27	1,06						
	Prøve 13	19,92	20,64	0,72						
	Prøve 14	23,62	23,97	0,35						
HPV 58	Prøve 15	23,81	25,24	1,43	-1,37	0,84	-0,24	1,18	2,12	0,66
	Prøve 16	23,40	25,07	1,67						
	Prøve 18	24,53	26,98	2,45						
	Prøve 19	22,93	24,12	1,19						
	Prøve 20	22,45	22,58	0,13						

c)

TMEM 45A		Ct	GAPDH	ΔCt	Gj.snitt ΔCt	ΔCt SD	ΔΔCt	2^-ΔΔCt	SD max	SD min
HPV 16	Prøve 2	24,39	21,82	2,57	1,90	0,71	0,00	1,00	1,64	0,61
	Prøve 3	22,71	21,27	1,44						
	Prøve 21	24,95	23,8	1,15						
	Prøve 22	25,41	22,96	2,45						
HPV 18	Prøve 7	22,09	22,44	0,35	0,92	1,76	0,98	1,98	6,69	0,58
	Prøve 8	23,94	20,16	3,78						
	Prøve 9	20,92	21,53	0,61						
	Prøve 11	25,30	24,16	1,14						
	Prøve 12	22,05	23,27	1,22						
	Prøve 13	22,68	20,64	2,04						
	Prøve 14	25,63	23,97	1,66						
HPV 58	Prøve 15	24,94	25,24	0,30	-0,44	1,25	2,35	5,09	12,07	2,14
	Prøve 16	25,06	25,07	0,01						
	Prøve 18	24,50	26,98	2,48						
	Prøve 19	23,77	24,12	0,35						
	Prøve 20	23,50	22,58	0,92						

a)

P16/CDKN2A	P-verdi
HPV 16 vs HPV 18	0,19
HPV 16 vs HPV 58	0,09*
HPV 18 vs HPV 58	0,46

b)

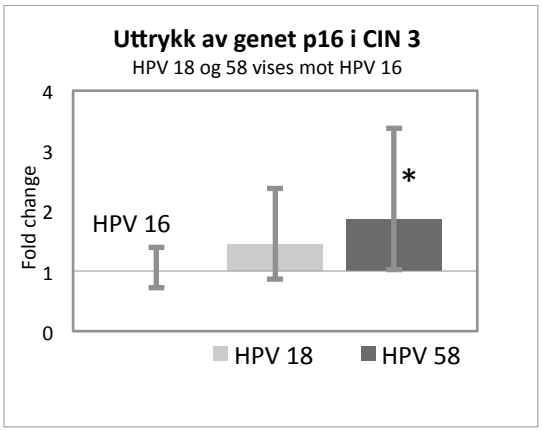
TMEM 45A	P-verdi
HPV 16 vs HPV 18	0,23
HPV 16 vs HPV 58	0,01***
HPV 18 vs HPV 58	0,15

c)

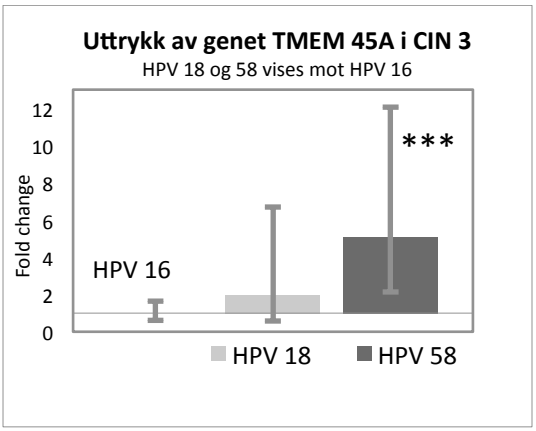
SERPIN B5	P-verdi
HPV 16 vs HPV 18	0,86
HPV 16 vs HPV 58	0,73
HPV 18 vs HPV 58	0,58

Tabell 4.8 T-test av ΔCt-verdier for HPV 16, 18 og 58. P-verdier for de humane gener; a) p16/CDKN2A, b) TMEM 45A og c) SERPIN B5.

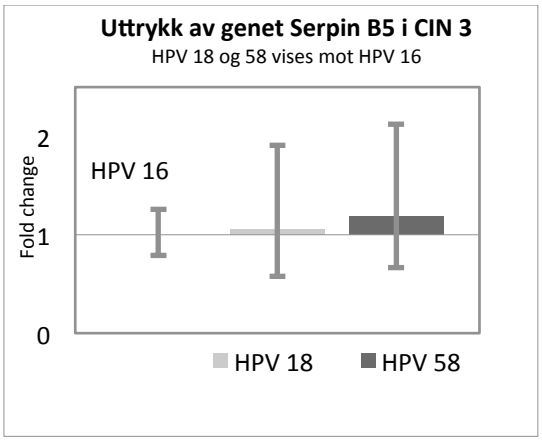
a)



c)



b)



Tabell 4.2 Histogram med genuttrykk i HPV 18 og 58 positive prøver sammenlignet mot HPV 16 positive prøver i prøvemateriale diagnostisert med CIN3. Stolpene viser log 2 transformert gjennomsnitt av ΔΔCt ± SD, hvor HPV 16 representerer 'fold change' lik 1. a) p16/CDKN2A, b) TMEM 45A og c) SERPIN B5.

(***=signifikant forskjell mellom HPV 16 og 18 (p<.01), **= signifikant forskjell mellom HPV 16 og 58 (p<.05).

5 Diskusjon

Uten behandling vil omtrent halvparten av alle tilfeller med CIN 3 gå i regress mens 50 % vil progrediere (Schiffman et al. 2011). Det finnes per i dag ingen kjente og sikre progresjonsmarkører som kan skille mellom de to gruppene, og det er uetisk å utføre longitudinelle studier for å bekrefte hvilke kvinner som ville fått kreft. Det er i tillegg viktig å kunne identifisere kvinner med lavgradige lesjoner (CIN1) som ikke vil progrediere mot CIN3, slik at disse kvinnene slipper unødvendige repeterte kontroller. Selv om hensikten med screeningprogrammet er å forebygge tilfeller med livmorhalskreft og mortalitet, brukes ofte påvisning av CIN2+, eller CIN3 som surrogatendepunkter for å måle screeningseffekten. Ulike tverrsnittstudier er blitt utført for å identifisere markører som kan være korrelert ved de ulike stadier ved celleforandringer (Flatley et al. 2009; Hansen et al. 2007; Ho et al. 2010; Iftner et al. 2011; Kraus et al. 2004; Schmitt et al. 2010; Trope et al. 2009) Flere biomarkører er blitt foreslått, blant annet E6/E7 uttrykk, integrasjon av viralt genom, metyleringsmønster i viruset og vertscellens arvestoff, p16INK4a, ki67, telomerase, v-MYC (myelocytomatosis viral oncogene), sykliner med flere (Clarke et al. 2012; Cuschieri & Wentzensen 2008; Wentzensen & von Knebel Doeberitz 2007)

Mye av den tilgjengelige forskningen for å identifisere molekylære markører er utført på HPV 16 assosierte cervix lesjoner (Hansen et al. 2007; Iftner et al. 2011; Schmitt et al. 2010), som er den typen som alene forårsaker 50 % av livmorhalskreft tilfeller på verdensbasis (Munoz et al. 2004). Hensikten med denne studien var å undersøke mulige forskjeller i ekspresjonsnivået for utvalgte gener med biomarkør potensiale, i prøver med påvist høy risiko HPV type, enten 16, 18 eller 58, med celleforandring av CIN 3 grad. HPV 18 er den andre mest prevalente HPV type assosiert med kreft, og er da spesielt assosiert med adenokarsinom, en type kreft som kan være vanskelig å oppdage ved rutine celleprøver. Selv om HPV 58 ikke er like hyppig assosiert med kreft på verdensbasis, er den er en av typene som ofte assosieres med kreft i asiatiske land (Bosch et al. 1995; Huang et al. 1997).

Vår studie viser at det for flere gener var signifikant forskjell i uttrykk for HPV 16 positive prøver sammenlignet med de to andre typene i studien, noe som indikerer at visse progresjonsmarkører kan være assosiert med HPV typen.

Siden det kan være vanskelig å avdekke spesifikke lesjonsassosierte forskjeller i

genuttrykk fra hele vevssnitt, ble analyser utført på de cellene i snittet med morfologisk bekreftede lesjoner. Ved bruk av lasermikrodisseksjon kan en spesifikt plukke akkurat de cellene som har gjennomgått en celleforandring og som er infisert med HR HPV. Bruk av denne metoden sikrer at en studerer genuttrykk fra celler av interesse, til forskjell fra vanlig histologisk snitting, hvor hele vevsoverflaten snittes og mange normale celler vil inngå i isoleringsprosessen. Til gjengjeld er utbyttet for RNA isolering av celler plukket med lasermikrodisseksjon ganske lavt, noe som gir utfordringer i de etterfølgende analysene. Lasermikrodisseksjon har tidligere vært brukt til genuttrykksanalyser ved for eksempel 'colon cancer' (Kitahara et al. 2001), ved livmorhalskreft, i forbindelse med avklaring av lesjoner i forhold til HPV typen ved multiple infeksjoner (Quint et al. 2012), og til identifisering av DNA biomarkører som for eksempel metyleringsmønster (Kalantari et al. 2009).

Arbeid med RNA fra formalinfiksert parafininnstøpt materiale har tidligere vært en stor utfordring. Nyere studier viser imidlertid at utfordringene med degradering av RNA, både før vevsfiksering og mens parafinblokken ligger lagret, ikke er av en slik grad at det umuliggjør påvisning av RNA (Farragher et al. 2008). Bedre metoder for ekstrahering, med påfølgende kvantitativ PCR analyse, viser at deteksjon av et RNA nivå slik det er i vevet før fiksering, er fullt mulig. Det anbefales at det ikke amplifiseres produkter over 130 bp, det bør utføres reverse transkriptase PCR ikke bare med Oligo dT, men også med tilstedeværelse av random primere (i tilfelle poly-A hale delen av mRNA transkriptene mangler i disse korte RNA bitene) og alle resultater bør normaliseres mot et referansegen (Farragher, Tanney et al. 2008). Alle disse anbefalinger ble fulgt i analyseprosessen i vår studie. Det er lite sannsynlig at kontaminering mellom prøver har skjedd i denne studien da det var sterkt fokus på å unngå dette under renholdsprosedyrene for rotasjonsmikrotomen mellom hver prøve.

Fordi kun noen få celler ble plukket ved lasermikrodisseksjon, vil det være svært lite mRNA tilstede. Det ble derfor utført et preamplifiseringstrinn, som er funnet å senke Ct verdier konsekvent (ca 10 Ct) tilsvarende prøver uten preamplifisering (Li, Smyth et al. 2008) (Ciotti et al. 2009). En bekreftelse for at en slik oppjustering er konsekvent og beholder de kvantitative egenskaper, er tidligere verifisert av en annen masterstudent i samme faggruppe ved Ahus.

Det ble i tillegg utført tester med preamplifisering ved ulike betingelser for samme materiale som inngår i studien. En preamplifisering med 14 sykluser og 10 µl templat ble

vurdert til å være optimal og gjorde det mulig å få nok prøvemateriale til å utføre de 7 ulike genuttrykks analyser ved real time PCR.

En forutsetning for å kunne sammenligne de ulike HPV typers E6 og E7 mRNA uttrykk er en lik PCR effektivitet, helst tilsvarende 100 prosent. For de kommersielle assay for de humane genene p16, TMEM45A, Serpin B5, hTERT og GAPDH er effektiviteten standardisert ved produsenten. I tillegg vil de respektive effektiviteter ikke være avhengig av hvilken HPV type cellene er infisert med.

For E6 og E7 uttrykk, var det nødvendig å korrigere for forskjellene i PCR effektivitet, slik at relativt uttrykk av disse genene kunne være sammenlignbare mellom de ulike prøvene.

GAPDH ble valgt som referansegen, da dette tidligere ble funnet å være egnet for cervixprøver (Daud & Scott 2008). Det ble ikke benyttet andre referansegener, selv om et panel av slike gener kunne gitt en bedre normalisering. På grunn av den lille mengden tilgjengelig mRNA i hvert prøve ble kun et slikt gen valgt.

Seks HPV 16 positive prøver og syv HPV 18 positive prøver ble inkludert i studien. To av prøvene positive for HPV 18 er fra samme pasient. Prøve 13 viste adenocarnoma in situ i tillegg til CIN3 i snittet som ble benyttet til lasermikrodisseksjon. Den andre prøven fra samme pasient (prøve 14) var diagnostisert med kun CIN3. Seks HPV 58 positive kasus ble også inkludert. To av prøvene viste CIN 2 i tillegg til CIN 3 i snittet som ble benyttet til lasermikrodisseksjon. Utvalget begrenset seg naturlig ved at tilgjengelig materiale som innehar diagnosen CIN 3 og en singel infeksjon med en HR type, 16, 18 eller 58, var begrenset. Svært mange kasus viser multiple infeksjoner med HPV, noe som også er bekreftet blant annet ved tidligere studie fra Ahus material (Sjoeborg et al. 2010). I tillegg ble enkelte prøver utelatt underveis i studien som følge av at det ikke var mulig å verifisere opprinnelig type eller diagnose, samt at enkelte gav for lite mRNA utbytte. Til tross for det begrensede antall prøver, ble det funnet signifikante forskjeller i vår studie. Disse preliminære data peker dermed på interessante forskjeller som bør undersøkes ytterligere og bekreftes med et større antall data.

De kvantitative PCR data viste at HPV E7 mRNA var signifikant mer uttrykt i HPV type 18 og HPV 58 enn i HPV type 16 positive prøver. Fire ganger mer uttrykk av HPV E7 hos HPV 18 og tre ganger mer uttrykk hos HPV 58 sammenlignet med HPV 16 kan tyde på at det er forskjell i disse HR HPV typers måte å påvirke cellens tumor supressor mekanismer og denne cellens mulige progresjon.

En studie publisert i 2000 hvor det er sett på forskjeller i HPV 16 og 18 forekomst og uttrykk av onkogener E6/E7 ved hjelp av in situ hybridisering med prober mot viralt RNA i adenokarsinomer in situ og invasivt adenokarsinom i cervix, viser at HPV 18 er vist å forekomme med høyere prosentandel i invasivt adenokarsinom, mens HPV 16 er mest forekommende ved adenokarsinom in situ. (Riethdorf et al. 2000).

E6 og E7 er de genene i HPV genomet med størst sekvensvariasjon, og det kan ikke utelukkes at de påvirker cellene på litt forskjellige måter selv om E6 hos alle HR HPV inaktiverer p53, og E7 hos alle HR HPV binder pRb. HPV 16 er den mest studerte typen, med tanke på blant annet E7s rolle og dette proteinets evne til å interagere med andre proteiner, samt påvirke de ulike cellulære prosesser (McLaughlin-Drubin & Munger 2009). Færre publikasjoner finnes om andre HR HPV typers E7- protein. Det er imidlertid utført sekvensering av ulike typer for å predikere proteinfunksjon (White et al 2011), hvor det er funnet både konserverte funksjoner for alle HPV typer og andre som er typespesifikke. Blant annet for HPV 18 og HPV 45, som tilhører genus alphapapillomavirus art 7, er det funnet at et cellulært protein ENC1 binder spesifikt til HPV 18 og 45 E7, mens for HPV 16 E7 er det funnet en interaksjon med ZER1 for å kunne binde cullin2 i ubiqutineringsprosessen. Studier som viser høy forekomst av HPV 18 E6 og E7 ved krefttilfeller har ført til oppdagelse av en transkripsjonsfaktor, E2F5, som direkte aktiverer E6 og E7 transkripsjon i HPV 18 positive celler. E2F5 inngår i cellens regulering av cellesyklus progresjon til S-fasen noe som kan forklare et høyere onkogent potensial for HPV 18 sammenlignet med flere andre HR HPV typer (Teissier et al. 2010). Disse oppdagelser kan tyde på litt forskjellige mekanismer for progresjon for de ulike HR HPV typer.

Ved å sammenligne E6/E7 transkript ratio for de ulike HR HPV typer som inngår i studien, ble det funnet en signifikant forskjell mellom HPV 16 og HPV 18 og 58 for CIN 3. HPV 18 positive prøver viste en signifikant forskjell i uttrykk av E6 og E7 genene, med et overuttrykk av E7 genet i forhold til E6, med en p-verdi 0,02 (data ikke vist). Uttrykket av E6 og E7 for HPV 16 og HPV 58 positive prøver var ikke signifikant forskjellige, men E6 var noe mer uttrykt enn E7 for HPV 16 prøvene og omvendt for HPV 58 prøvene, slik at ratio E6/E7 likevel var signifikant forskjellig for disse to typer.

LR HPV typer som vanligvis ikke er assosiert med kreft, som for eksempel HPV 6 og 11, utrykker også E6 og E7 proteiner. En av hovedforskjellene i genomets oppbygning mellom lav og høyrisikotype HPV, er at E6 og E7 uttrykkes fra hver sin promotor hos LR HPV.

Mens E6 og E7 deler samme promotor i HR HPV. E7 transkriberes sammen med E6 hos HR HPV, enten full lengde, eller trunkerte versjoner av E6. Studier har vist at ved translasjon av den ene E6* (E6*I) med påfølgende E7 i transkriptet, blir det syntetisert mer E7 onkoprotein, samtidig som det sees et lavere nivå av full-lengde E6 onkoprotein for HPV 16 og HPV 18 positive cellelinjer (Tang et al. 2006) Det er imidlertid også vist at for HPV 16 assosierte tumorer og cellelinjer, så var det den opprinnelig full lengde E6/E7 transkripsjonen som hovedsakelig stod for produksjonen av E7 onkoprotein (Moral-Hernandez et al. 2009). I tillegg er det vist at spleising av E6 mRNA sannsynligvis ikke forekommer hos alle HR HPV (Mesplede et al. 2012). Antagelig må det flere undersøkelser til for å bekrefte hvilken betydning det heterogene spleisede mønsteret for HR HPV E6 transkript har for produksjon av E7 proteinet eller nedregulering av E6. Våre assay detekterer teoretisk kun full-lengde E6, og ikke E6*. Et eget assay for E6* ble utelatt i denne studien, da primer/probe for denne ikke bør blandes med tilsvarende for full-lengde assay om en skal skille disse to assayene fra hverandre, og dette var en betingelse i preamplifiseringsreaksjonen, der alle primer/probene ble inkludert. I tillegg er det uklart om HPV 58 i det hele tatt lager spleisevarianter av E6 mRNA.

En annen forskjell mellom LR HPV og HR HPV, er at E6 hos førstnevnte ikke binder p53, et protein hvis nivå øker, når det er mye E7 til stede. Hos HR-HPV vil E6, gjennom sin p53 bindende funksjon, balansere denne effekten av E7, og bidra til økt DNA replikasjon. Overvekt av E7 i forhold til E6 vil dermed kunne føre til endret balanse i forhold til p53 aktivitet, og mulighet for cellene til å gå i apoptose, eller stoppe cellesyklusen i fase G1. Det er ikke utelukket at overuttrykk av E7 i forhold til E6 for HPV 18, og det signifikante forskjellige E6/E7 ratio for HPV 16 CIN3 prøver i forhold til CIN3 prøver positive for andre HR-HPV typer har betydning i forhold til risiko for progresjon.

Det er tidligere vist at E6/E7 ratio hos HPV 16 assosierte lesjoner var signifikant høyere hos LCM prøver fra kreftpasienter enn kvinner med CIN2 eller CIN3 (Hansen et al. 2007), noe som tyder på at forhold mellom de to onkogener spiller en rolle i progresjon, for HPV 16.

E6/E7 transkript ratio for HPV 16 var over 1, hvilket betyr at de fleste transkriptene inneholder full-lengde E6, i tillegg til E7. Til forskjell fra CIN3 assosiert med HPV 18 og 58, som hadde en E6/E7 transkript ratio under 1, hvilket betyr at E7 var (signifikant for HPV 18) mer uttrykt enn full-lengde E6 i lesjoner forårsaket av disse typer. Siden E7 transkript alltid inneholder deler av E6, tyder det på et sterkere uttrykk av E6* transkripter for HPV

18. Det kan dermed se ut som om de to virale onkogeners rolle i progresjon kan være avhengig av HPV typen, og at dette kan være en betydelig årsak til at HPV16 er den typen som klart er mest assosiert med progresjon til kreft.

En av de HPV 16 positive prøvene skilte seg ut med svært høy E6/E7 ratio (prøve 3). Signifikanstallene ble regnet ut med og uten denne prøven, for å avdekke betydningen av denne enkeltprøve, men de opprinnelige signifikante funn ble oppretthold med en noe høyere p-verdi (data ikke vist). Denne prøven var spesielt interessant, siden det ble funnet kreftceller (karsinom) i samme vev under plukking av celler ved lasermikrodisseksjon, Det ble ikke ble plukket celler fra dette området men det kan imidlertid bety at denne pasienten allerede hadde utviklet noen kreftceller og at den HPV infiserte CIN 3 lesjonen var på vei til å progrediere til kreft. Dette samsvarer fullt med tidligere funn (Hansen et al. 2007).

Ved sammenligning av de humane gener for de ulike typer HR HPV ble det funnet signifikant overuttrykk av p16/CDKN2A i HPV 58 i forhold til HPV 16 positive prøver ved signifikansgrense ved $P < 0.1$. Immunfarging av p16/CDKN2A er foreslått brukt som biomarkør (Cuschieri & Wentzensen 2008; Gustinucci et al. 2012) og benyttes i dag ofte som en ekstra markør for å påvise celleforandring som følge av HR HPV infeksjon. Den har vist seg å være blant annet en verdifull biomarkør for å skille ut prøver som er diagnostisert med ASC-H, altså tvetydige, usikre celleforandringer hvor det ikke kan utelukkes høygradig celleforandring for å identifisere de tilfeller som vil utvikle seg til å bli CIN2+ lesjoner (Gustinucci et al. 2012). Samtidig er det nødvendig med mer dokumentasjon om funksjonen til p16 for å kunne utelukke prøver som gir negativt p16 resultat, fra en oppfølgingstriage.

De fleste studier på p16 er utført i forbindelse med HPV 16 positive prøver. Svært få for HPV 58. En koreansk studie fra 2008 viser at HPV 58 i likhet med HPV 16 positive tilfeller, viser sterkt utrykk av p16 ved høygradig celleforandring (Nam & Kim 2008). Dette samsvarer med vårt funn om at p16 forekommer spesielt oppregulert ved HPV 58, samtidig som denne også er oppregulert i HPV 16 positive tilfeller. Siden uttrykk av p16 er sterkt knyttet til Retinoblastomprotein, som cellens svar på E7 blokkering av pRb, kan overuttrykket av E7 i HPV 58 positive prøver være korrelert med overuttrykk av p16.

Selv om HPV 18 positive prøver også har overuttrykk av E7 i forhold til HPV 16, ble det ikke observert samme signifikans for p16, slikt at den sammenhengen muligens er type

avhengig.

mRNA nivået for transmembran-proteinet TMEM45A viste en signifikant oppregulering i prøver positive for HPV 58 i forhold til HPV 16, $P < 0.01$. Det finnes lite publiserte data på dette proteinets funksjon, men en mulig anti-apoptotisk effekt er beskrevet, og det er funnet at et høyt uttrykk av genet for dette proteinet kan benyttes som en markør for hypoksi-indusert kjemoterapiresistens ved bryst- og leverkreft (Flamant et al. 2012). At dette genet sees betydelig mer oppregulert i HPV 58 enn HPV 16 og HPV 18, gir grunnlag for videre undersøkelser relatert mot dette proteinet.

SERPIN B5, eller maspin, er tidligere vist å være positivt eller negativt assosiert med kreftutvikling. For bryst, prostata og lungekreft er det funnet at nivå av Serpin B5 er vesentlig redusert i prøver fra kreftpasienter (Kim et al. 2004; Zou et al. 1994). For andre kreftformer, eggstokk-, bukspyttkjertel- og magekreft, er det funnet et overuttrykk av Serpin B5 hos pasientene med kreft (Maass et al. 2002; Sood et al. 2002). Hos livmorhalskreft pasienter har en studie fra 2005 (Xu, Quddus et al. 2005), vist at Serpin B5 kunne være en potensiell markør for sen progresjon, siden det ble observert et lavere uttrykk av Serpin B5 i prøver med invasivt karsinom sammenlignet mot prøver med CIN3 eller mikroinvasivt karsinom prøver, mens ingen signifikante forskjeller ble funnet mellom CIN3 og prøver med mikroinvasivt karsinom. Serpin B5 sin rolle som eventuell tidlig progresjonsmarkør er ikke avklart. Våre resultater for genet Serpin B5 viser at alle prøvene uttrykker dette mRNA på likt nivå, og ingen signifikante forskjeller mellom de ulike HPV typer ble funnet. Dette funn viser at uttrykk av dette genet tilsynelatende ikke er typespesifikk for HR HPV.

Bakgrunnen for valg av aktuelle gener som biomarkører var et muntlig innlegg av T. Iftner ved HPV konferansen, Eurogin 2011. Ved genuttrykks profil studier ble det funnet at p16/CDKN2A, TMEM 45A og Serpin B5 kunne være potensielle biomarkører for å predikere progresjon av HPV 16 persisterende infiserte kvinner. Dessverre er ikke disse resultater publisert ennå, slikt at det er vanskelig å diskutere våre funn i forhold til denne studien.

hTERT genet var ikke målbart uttrykt i CIN3 positive prøver, noe som kan tyde på at dette ikke er en egnet markør for tidlig progresjon. Det er i tidligere studier av celleprøver diagnostisert med ulike grader av CIN vist at hTERT har liten nytteverdi som markør for å bestemme sannsynlig sluttresultat av en HPV 16 infeksjon (Lanham et al. 2001). Til

forskjell fra denne studien måler vi uttrykk kun fra CIN3 celler vi vet er infisert med HPV og således gir våre resultater et mer spesifikt uttrykk. Resultatene viste ingen tydelig forskjell mellom de ulike typer, selv om målbart uttrykk var gjennomgående oftere påvist for HPV 18 positive prøver. Det kan likevel ikke utelukkes at dette genet kunne vært en egnet markør for sen progresjon mot kreft, siden det er uvisst i vårt materiale hvilke kvinner som hadde progediert mot kreft, og hvilken som hadde kvittet seg med sin lesjon uten behandling.

6 Konklusjon

Det ble undersøkt et begrenset antall prøver i denne studien, spesielt fordi noen prøver var av feil type, ikke hadde riktig diagnose, eller hadde for lite mRNA utbytte, i forhold til opprinnelige utvalg. Likevel kunne vi avdekke noen signifikante forskjeller i uttrykk av enkelte gener mellom HPV 16 og de to andre typene i studien. Resultatene våre viser spesielt at det relative uttrykket av de to virale onkogener skiller seg markant ut for HPV 16 positive prøver, sammenlignet mot HPV 18 og 58, noe som kan ha betydning for risiko for progresjon. Det var ingen signifikante forskjeller for uttrykkene mellom HPV 18 og 58, men det vil være viktig med videre studier av betydningen av E6 og E7 i kreftutvikling for ulike HR HPV.

Våre funn viser at studier for identifisering av progresjonsmarkører utført på HPV 16 positive prøver bør verifiseres for andre HR HPV.

7 Referanser

Absolutely RNA FFPE Kit Instruction manual. (2008). Agilent Technologies.

Arbyn, M., Castellsague, X., de Sanjose, S., Bruni, L., Saraiya, M., Bray, F. & Ferlay, J. (2011). Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol*, 22 (12): 2675-86.

Arnouk, H., Merkley, M. A., Podolsky, R. H., Stoppler, H., Santos, C., Alvarez, M., Mariategui, J., Ferris, D., Lee, J. R. & Dynan, W. S. (2009). Characterization of Molecular Markers Indicative of Cervical Cancer Progression. *Proteomics Clin Appl*, 3 (5): 516-527.

Bailey, C. M., Khalkhali-Ellis, Z., Seftor, E. A. & Hendrix, M. J. (2006). Biological functions of maspin. *J Cell Physiol*, 209 (3): 617-24.

Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A. & Clark, B. J. (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 21 (3): 389-95.

Bodily, J. & Laimins, L. A. (2011). Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol*, 19 (1): 33-9.

Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R. & Shah, K. V. (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 87 (11): 796-802.

Bosch, F. X. & de Sanjose, S. (2007). The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Dis Markers*, 23 (4): 213-27.

Branca, M., Giorgi, C., Ciotti, M., Santini, D., Di Bonito, L., Costa, S., Benedetto, A., Bonifacio, D., Di Bonito, P., Paba, P., et al. (2006). Upregulation of telomerase (hTERT) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus, virus persistence, or disease outcome in cervical cancer. *Diagn Cytopathol*, 34 (11): 739-48.

Cancer in Norway 2010. (2010). Kreftregisteret.

Castle, P. E., Dockter, J., Giachetti, C., Garcia, F. A., McCormick, M. K., Mitchell, A. L., Holladay, E. B. & Kolk, D. P. (2007). A cross-sectional study of a prototype carcinogenic human papillomavirus E6/E7 messenger RNA assay for detection of cervical precancer and cancer. *Clin Cancer Res*, 13 (9): 2599-605.

Chow, L. T. & Broker, R. T. (2007). *The papillomaviruses*. Human papillomavirus RNA transcription: Springer.

Ciotti, P., Garuti, A., Ballestrero, A., Cirmena, G., Chiaramondia, M., Baccini, P., Bellone, E. & Mandich, P. (2009). Reliability and reproducibility of a RNA preamplification method for low-density array analysis from formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples. *Diagn Mol Pathol*, 18 (2): 112-8.

Clarke, M. A., Wentzensen, N., Mirabello, L., Ghosh, A., Wacholder, S., Harari, A., Lorincz, A., Schiffman, M. & Burk, R. D. (2012). Human papillomavirus DNA methylation as a potential biomarker for cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21 (12): 2125-37.

Cuschieri, K. & Wentzensen, N. (2008). Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17 (10): 2536-45.

Daud, II & Scott, M. E. (2008). Validation of reference genes in cervical cell samples from human papillomavirus-infected and -uninfected women for quantitative reverse transcription-PCR assays. *Clin Vaccine Immunol*, 15 (9): 1369-73.

Davey, D. D. (2003). Cervical cytology classification and the Bethesda System. *Cancer J*, 9 (5): 327-34.

de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324 (1): 17-27.

de Villiers, E. M. & Gunst, K. (2009). Characterization of seven novel human papillomavirus types isolated from cutaneous tissue, but also present in mucosal lesions. *J Gen Virol*, 90 (Pt 8): 1999-2004.

Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C. & Crawford, L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 352 (6338): 824-7.

Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*, 32 Suppl 1: S7-15.

Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K. & Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243 (4893): 934-7.

Farragher, S. M., Tanney, A., Kennedy, R. D. & Paul Harkin, D. (2008). RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues. *Histochem Cell Biol*, 130 (3): 435-45.

Flamant, L., Roegiers, E., Pierre, M., Hayez, A., Sterpin, C., De Backer, O., Arnould, T., Poumay, Y. & Michiels, C. (2012). TMEM45A is essential for hypoxia-induced chemoresistance in breast and liver cancer cells. *BMC Cancer*, 12: 391.

Flatley, J. E., McNeir, K., Balasubramani, L., Tidy, J., Stuart, E. L., Young, T. A. & Powers, H. J.

(2009). Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18 (10): 2782-9.

Folkehelseinstituttet:*Vaksinasjonstatistikk for HPV-vaksinasjon*. (2013). Folkehelseinstituttet. Tilgjengelig fra: http: www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=239&trg=List_6212&Main_6157=6261:0:25,6749&MainContent_6261=6464:0:25,7023&List_6212=6218:0:25,7032:1:0:0:::0:0 (lest 22.04.13).

FUTURE-II-Study-Group. (2007). Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med*, 356 (19): 1915-27.

Griffin, H., Wu, Z., Marnane, R., Dewar, V., Molijn, A., Quint, W., Van Hoof, C., Struyf, F., Colau, B., Jenkins, D., et al. (2012). E4 antibodies facilitate detection and type-assignment of active HPV infection in cervical disease. *PLoS One*, 7 (12): e49974.

Gustinucci, D., Passamonti, B., Cesarini, E., Butera, D., Palmieri, E. A., Bulletti, S., Carlani, A., Staiano, M., D'Amico, M. R., D'Angelo, V., et al. (2012). Role of p16(INK4a) cytology testing as an adjunct to enhance the diagnostic specificity and accuracy in human papillomavirus-positive women within an organized cervical cancer screening program. *Acta Cytol*, 56 (5): 506-14.

Handbook of cancer prevention: cercix cancer screening. (2005). International Agency for Research on Cancer Press, L., France (red.), Vol.10.

Hansen, M. L., Alfsen, C. G. & Jonassen, C. M. (2007, July 3-8 2010). *Lasermicrodissection and Real Time RT-PCR in a Study of HPV Oncogene Expression in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cancer*. 26th International Papillomavirus Conference, Montreal, Canada.

Herrero, R. (2009). Human papillomavirus (HPV) vaccines: limited cross-protection against additional HPV types. *J Infect Dis*, 199 (7): 919-22.

Ho, C. M., Lee, B. H., Chang, S. F., Chien, T. Y., Huang, S. H., Yan, C. C. & Cheng, W. F. (2010). Type-specific human papillomavirus oncogene messenger RNA levels correlate with the severity of cervical neoplasia. *Int J Cancer*, 127 (3): 622-32.

Howie, H. L., Katzenellenbogen, R. A. & Galloway, D. A. (2009). Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, 384 (2): 324-34.

Howley, P. M. & Lowy, D. R. (2007). *Fields Virology*. 5 Edition utg. Papillomaviruses, b. Volume 2. Philadelphia: Lippincott: Williams and Wilkins.

Huang, S., Afonina, I., Miller, B. A. & Beckmann, A. M. (1997). Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancers from Chinese women. *Int J Cancer*, 70 (4): 408-11.

Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, J. Y., Libermann, T. A., Jin, J., Harper, J. W. & Munger, K. (2007). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol*, 81 (18): 9737-47.

Iftner, T., Stubenrauch, F. & Manawapat, A. (2011, May 8-11 2011). *HPV mRNA testing and other mRNA markers: A review*. Eurogin 2011, International Multidisciplinary Conference, Lisboa, Portugal.

Kailash, U., Soundararajan, C. C., Lakshmy, R., Arora, R., Vivekanandhan, S. & Das, B. C. (2006). Telomerase activity as an adjunct to high-risk human papillomavirus types 16 and 18 and cytology screening in cervical cancer. *Br J Cancer*, 95 (9): 1250-7.

Kalantari, M., Garcia-Carranca, A., Morales-Vazquez, C. D., Zuna, R., Montiel, D. P., Calleja-Macias, I. E., Johansson, B., Andersson, S. & Bernard, H. U. (2009). Laser capture microdissection of cervical human papillomavirus infections: copy number of the virus in cancerous and normal tissue and heterogeneous DNA methylation. *Virology*, 390 (2): 261-7.

Kalof, A. N. & Cooper, K. (2006). p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Adv Anat Pathol*, 13 (4): 190-4.

Kiernan, J. A. (2008). *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 4 utg.

Kim, S., Han, J., Kim, J. & Park, C. (2004). Maspin expression is transactivated by p63 and is critical for the modulation of lung cancer progression. *Cancer Res*, 64 (19): 6900-5.

Kitahara, O., Furukawa, Y., Tanaka, T., Kihara, C., Ono, K., Yanagawa, R., Nita, M. E., Takagi, T., Nakamura, Y. & Tsunoda, T. (2001). Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer Res*, 61 (9): 3544-9.

Kotaniemi-Talonen, L., Anttila, A., Malila, N., Tarkkanen, J., Laurila, P., Hakama, M. & Nieminen, P. (2008). Screening with a primary human papillomavirus test does not increase detection of cervical cancer and intraepithelial neoplasia 3. *Eur J Cancer*, 44 (4): 565-71.

Kraus, I., Molden, T., Erno, L. E., Skomedal, H., Karlsen, F. & Hagmar, B. (2004). Human papillomavirus oncogenic expression in the dysplastic portio; an investigation of biopsies from 190 cervical cones. *Br J Cancer*, 90 (7): 1407-13.

Kreftregisteret. *Flytdiagram for nasjonal algoritme for utredning av ASC-US/LSIL og bruk av HPV-test i sekundærscreening, kvinner 25-69 år.* (2012). Masseundersøkelsen mot livmorhalskreft.

Lanham, S., Herbert, A. & Watt, P. (2001). HPV detection and measurement of HPV-16, telomerase, and survivin transcripts in colposcopy clinic patients. *J Clin Pathol*, 54 (4): 304-8.

Lasermicrodissection CombiSystem Carl Zeiss. (2008). Carl Zeiss.

Lesnikova, I., Lidang, M., Hamilton-Dutoit, S. & Koch, J. (2009). p16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. *Diagn Pathol*, 4: 22.

Levine, A. J., Momand, J. & Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 351 (6326): 453-6.

Li, J., Smyth, P., Cahill, S., Denning, K., Flavin, R., Aherne, S., Pirotta, M., Guenther, S. M., O'Leary, J. J. & Sheils, O. (2008). Improved RNA quality and TaqMan Pre-amplification method (PreAmp) to enhance expression analysis from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) materials. *BMC Biotechnol*, 8: 10.

Luna, L. G. (1993). *Histopathologic Methods and Color Atlas of Special Stains and Tissue Artifacts*.

Maass, N., Nagasaki, K., Ziebart, M., Mundhenke, C. & Jonat, W. (2002). Expression and regulation of tumor suppressor gene maspin in breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 3 (4): 281-7.

Manawapat, A., Stubenrauch, F., Russ, R., Munk, C., Kjaer, S. K. & Iftner, T. (2012). Physical state and viral load as predictive biomarkersfor persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study. *Am J Cancer Res*, 2 (2): 192-203.

Mani, A. & Gelmann, E. P. (2005). The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol*, 23 (21): 4776-89.

Massague, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432 (7015): 298-306.

McKeage, K. & Romanowski, B. (2011). Spotlight on AS04-adjuvanted human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 vaccine (Cervarix(R)). *BioDrugs*, 25 (4): 265-9.

McLaughlin-Drubin, M. E. & Munger, K. (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, 384 (2): 335-44.

Mesplede, T., Gagnon, D., Bergeron-Labrecque, F., Azar, I., Senechal, H., Coutlee, F. & Archambault, J. (2012). p53 degradation activity, expression, and subcellular localization of E6 proteins from 29 human papillomavirus genotypes. *J Virol*, 86 (1): 94-107.

Molden, T., Kraus, I., Karlsen, F., Skomedal, H. & Hagmar, B. (2006). Human papillomavirus E6/E7 mRNA expression in women younger than 30 years of age. *Gynecol Oncol*, 100 (1): 95-100.

Munoz, N., Bosch, F. X., Castellsague, X., Diaz, M., de Sanjose, S., Hammouda, D., Shah, K. V. & Meijer, C. J. (2004). Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer*, 111 (2): 278-85.

Munoz, N., Castellsague, X., de Gonzalez, A. B. & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, 24 Suppl 3: S3/1-10.

Nam, D. & Kim, S. Y. (2008). Gene-set approach for expression pattern analysis. *Brief Bioinform*, 9 (3): 189-97.

NanoDrop 1000 Spectrophotometer v 3.7 User's Manual. (2009). Nanodrop.

Nygard, J. F., Skare, G. B. & Thoresen, S. O. (2002). The cervical cancer screening programme in Norway, 1992-2000: changes in Pap smear coverage and incidence of cervical cancer. *J Med Screen*, 9 (2): 86-91.

QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook. (2007). Qiagen.

qScript™ cDNA Supermiks protocol. (2009). Quanta Bioscience.

Quantifiler Kits User Manual. (2012). Applied Biosystems.

Quint, W., Jenkins, D., Molijn, A., Struijk, L., van de Sandt, M., Doorbar, J., Mols, J., Van Hoof, C., Hardt, K., Struyf, F., et al. (2012). One virus, one lesion--individual components of CIN lesions contain a specific HPV type. *J Pathol*, 227 (1): 62-71.

Real-Time PCR Systems Chemistry Guide. (2005). Applied Biosystems.

Riethdorf, S., Riethdorf, L., Milde-Langosch, K., Park, T. W. & Loning, T. (2000). Differences in HPV 16- and HPV 18 E6/E7 oncogene expression between in situ and invasive adenocarcinomas of the cervix uteri. *Virchows Arch*, 437 (5): 491-500.

Roberts, S., Ashmole, I., Johnson, G. D., Kreider, J. W. & Gallimore, P. H. (1993). Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology*, 197 (1): 176-87.

Romanczuk, H. & Howley, P. M. (1992). Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (7): 3159-63.

Sano, T., Oyama, T., Kashiwabara, K., Fukuda, T. & Nakajima, T. (1998). Expression status

of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol*, 153 (6): 1741-8.

Schiffman, M., Castle, P. E., Jeronimo, J., Rodriguez, A. C. & Wacholder, S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*, 370 (9590): 890-907.

Schiffman, M., Wentzensen, N., Wacholder, S., Kinney, W., Gage, J. C. & Castle, P. E. (2011). Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 103 (5): 368-83.

Schmitt, M., Bravo, I. G., Snijders, P. J., Gissmann, L., Pawlita, M. & Waterboer, T. (2006). Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*, 44 (2): 504-12.

Schmitt, M., Dalstein, V., Waterboer, T., Clavel, C., Gissmann, L. & Pawlita, M. (2010). Diagnosing cervical cancer and high-grade precursors by HPV16 transcription patterns. *Cancer Res*, 70 (1): 249-56.

Scicchitano, M. S., Dalmas, D. A., Bertiaux, M. A., Anderson, S. M., Turner, L. R., Thomas, R. A., Mirable, R. & Boyce, R. W. (2006). Preliminary comparison of quantity, quality, and microarray performance of RNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded, and unfixed frozen tissue samples. *J Histochem Cytochem*, 54 (11): 1229-37.

Sellors, J. W. R. S. (2003). Colposcopy and Treatment of Cervical Intraepithelial Neoplasia:

A Beginners' Manual. (2003) International Agency for Research on Cancer Lyon. Tilgjengelig fra: http://www.iarc.fr/

Sjoborg, K. D., Vistad, I., Myhr, S. S., Svenningsen, R., Herzog, C., Kloster-Jensen, A., Nygard, G., Hole, S. & Tanbo, T. (2007). Pregnancy outcome after cervical cone excision: a case-control study. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 86 (4): 423-8.

Sjoeborg, K. D., Trope, A., Lie, A. K., Jonassen, C. M., Steinbakk, M., Hansen, M., Jacobsen, M. B., Cuschieri, K. & Eskild, A. (2010). HPV genotype distribution according to severity of cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*, 118 (1): 29-34.

Soderlund-Strand, A., Carlson, J. & Dillner, J. (2009). Modified general primer PCR system for sensitive detection of multiple types of oncogenic human papillomavirus. *J Clin Microbiol*, 47 (3): 541-6.

Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., Raab, S., Sherman, M., Wilbur, D., Wright, T., Jr., et al. (2002). The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, 287 (16): 2114-9.

Solomon, D., Nayar, Ritu. (2004). *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology, Definitions, Criteria and Explanatory Notes*. Second Edition utg. New York:

Springer-Verlag.

Son, H. J., Sohn, T. S., Song, S. Y., Lee, J. H. & Rhee, J. C. (2002). Maspin expression in human gastric adenocarcinoma. *Pathol Int*, 52 (8): 508-13.

Sood, A. K., Fletcher, M. S., Gruman, L. M., Coffin, J. E., Jabbari, S., Khalkhali-Ellis, Z., Arbour, N., Seftor, E. A. & Hendrix, M. J. (2002). The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 8 (9): 2924-32.

Stubenrauch, F. & Laimins, L. A. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol*, 9 (6): 379-86.

Syrjanen, S. M. & Syrjanen, K. J. (1999). New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med*, 31 (3): 175-87.

Tang, S., Tao, M., McCoy, J. P., Jr. & Zheng, Z. M. (2006). The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. *J Virol*, 80 (9): 4249-63.

TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol. (2010). Applied Biosystems.

TaqMan® PreAmp Master Mix Kit Protokoll. (2010). Applied Biosystems.

Teissier, S., Pang, C. L. & Thierry, F. (2010). The E2F5 repressor is an activator of E6/E7 transcription and of the S-phase entry in HPV18-associated cells. *Oncogene*, 29 (36): 5061-70.

Thierry, F. & Howley, P. M. (1991). Functional analysis of E2-mediated repression of the HPV18 P105 promoter. *New Biol*, 3 (1): 90-100.

Thomas, M., Pim, D. & Banks, L. (1999). The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*, 18 (53): 7690-700.

TOPO TA Cloning®. *Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products*. (2006). Invitrogen.

Toussaint-Smith, E., Donner, D. B. & Roman, A. (2004). Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors. *Oncogene*, 23 (17): 2988-95.

Trope, A., Sjoborg, K., Eskild, A., Cuschieri, K., Eriksen, T., Thoresen, S., Steinbakk, M., Laurak, V., Jonassen, C. M., Westerhagen, U., et al. (2009). Performance of human papillomavirus DNA and mRNA testing strategies for women with and without cervical neoplasia. *J Clin Microbiol*, 47 (8): 2458-64.

Vinokurova, S., Wentzensen, N., Kraus, I., Klaes, R., Driesch, C., Melsheimer, P., Kisseljov, F., Durst, M., Schneider, A. & von Knebel Doeberitz, M. (2008). Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res*, 68 (1): 307-13.

Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J. & Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189 (1): 12-9.

Wentzensen, N. & von Knebel Doeberitz, M. (2007). Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers*, 23 (4): 315-30.

Wheeler, C. M. (2008). Natural history of human papillomavirus infections, cytologic and histologic abnormalities, and cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 35 (4): 519-36; vii.

WHO (2006). *Comprehensive Cervical Cancer Control, A guide to essential practice*: Department of Reproductive Health and Research and Department of Chronic Diseases and Health Promotion.

Wolpert, L. (2007). *Principles of Development*. Third Edition utg.: Oxford University Press.

Woodman, C. B., Collins, S. I. & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*, 7 (1): 11-22.

Working group on the evaluation Carcinogenic Risks to Humans. (2007). International Agency for Research on Cancer Press.

Wu, E. Q., Zha, X., Yu, X. H., Zhang, G. N., Wu, Y. G., Fan, Y., Ren, Y., Kong, L. Q. & Kong, W. (2009). Profile of physical status and gene variation of human papillomavirus 58 genome in cervical cancer. *J Gen Virol*, 90 (Pt 5): 1229-37.

Xu, C., Quddus, M. R., Sung, C. J., Steinhoff, M. M., Zhang, C. & Lawrence, W. D. (2005). Maspin expression in CIN 3, microinvasive squamous cell carcinoma, and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Mod Pathol*, 18 (8): 1102-6.

Zheng, Z. M. & Baker, C. C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*, 11: 2286-302.

Zou, Z., Anisowicz, A., Hendrix, M. J., Thor, A., Neveu, M., Sheng, S., Rafidi, K., Seftor, E. & Sager, R. (1994). Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science*, 263 (5146): 526-9.

Zou, Z., Gao, C., Nagaich, A. K., Connell, T., Saito, S., Moul, J. W., Seth, P., Appella, E. & Srivastava, S. (2000). p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin. *J Biol Chem*, 275 (9): 6051-4.

zur Hausen, H. (1994). Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol*, 186: 131-56.

zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2 (5): 342-50.