



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2019 30 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

# **Droplet digital PCR kvantifisering av fire kandidat sirkulerende miRNA hos kvinner med og uten høygradig cervikal intraepitelial neoplasia (CIN2+)**

Droplet digital PCR quantification of four candidate circulating miRNAs in women with and without high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2+)

**Camilla Funderud Karlsen**

Kjemi og bioteknologi, retning molekylærbiologi



## Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven ble utført ved seksjon for genteknologi på senter for laboratoriemedisin ved sykehuset Østfold, Kalnes, i perioden januar – mai 2019.

Masteroppgaven er utført som en del av en mastergrad i kjemi og bioteknologi ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM), ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) i Ås.

Først og fremst ønsker jeg å rette en stor takk til min hovedveileder ved sykehuset Østfold, Christine Monceyron Jonassen, for at jeg fikk muligheten til å utføre arbeidet med min masteroppgave i forskningsgruppen ved seksjonen. Jeg vil også takke for enestående oppfølging og veiledning underveis, i tillegg til å være en stor faglig inspirasjonskilde for meg. Videre ønsker jeg å rette en stor takk til min veileder Anbjørg Rangberg for innføring i laboratorierutiner og laboratoriarbeid, men mest av alt for utrolig god støtte, oppfølging og veiledning underveis i mitt arbeid. En stor takk går også til Anette Mcleod for fantastisk hjelp med korrekturlesing av oppgaven, samt gode samtaler og smittende godt humør. Jeg må også få takke seksjonsleder Laila Solhaug Hulleberg for at jeg fikk gjennomføre masteroppgaven min ved seksjon for genteknologi, og resten av de ansatte for at dere har tatt meg godt imot og vært behjelpelige med alt jeg måtte lure på. Sist, men ikke minst, ønsker jeg å takke min samboer, familie og venner for den enorme støtten, tålmodigheten og forståelsen dere har vist meg underveis i arbeidet med masteroppgaven.

Kalnes, mai 2019

.....  
Camilla Funderud Karlsen



## Sammendrag

Persisterende infeksjon med humant papillomavirus (HPV) kan føre til utvikling av forstadier til livmorhalskreft (cervikal intraepitelial neoplasi (CIN)) og livmorhalskreft. På verdensbasis er livmorhalskreft den tredje mest diagnostiserte kreftformen blant kvinner, og den mest vanlige HPV-relaterte kreftformen. Innføring av screeningprogram har ført til en betraktelig nedgang i forekomsten av livmorhalskreft. I dag koniseres kvinner som ved screening får påvist høygradig HPV-assosiert CIN i livmorhalsen, selv om lesjonene i de fleste tilfeller vil gå i regress. Nåværende tester klarer ikke å fastslå hvilke kvinner som har høyere risiko for å utvikle livmorhalskreft, noe som resulterer i overbehandling. Selv om konisering er avgjørende for å forebygge kreftutvikling, kan inngrepet medføre komplikasjoner for kvinnen ved svangerskap. Det er et stort behov for progresjonsmarkører som kan optimalisere dagens screening og redusere overbehandling.

Cellefrie sirkulerende mikroRNA (miRNA) i plasma eller serum har fått en økende oppmerksomhet for deres potensiale som biomarkører. MiRNA er små ikke-kodende RNA molekyler som fungerer som posttranskripsjonelle regulatorer ved å binde seg til mRNA med komplementær sekvens. De spiller en avgjørende rolle i regulering av genuttrykk og kontroll av cellulære og metabolske veier hos mennesker. I flere krefttyper, inkludert livmorhalskreft, er det observert endret genuttrykk av miRNA gjennom karsinogenesen, noe som tyder på at de har et potensial som biomarkører for kvinner med forstadier til livmorhalskreft og livmorhalskreft.

Hensikten med denne studien var å undersøke om nivå av fire kandidat sirkulerende miRNA identifisert i serum i en pre-screeningstudie; miR-142-5p, miR-423-5p, miR-451a og miR-29c-3p, korrelerte med ulike lesjonsgrader i livmorhalsen hos kvinner. Endring i genuttrykk vil kunne indikere deres potensiale som biomarkører for identifisering og prognose av kvinner med ulike grader av lesjoner i livmorhalsen, fra lavgradige lesjoner (CIN1), til høygradige lesjoner (CIN2+, som består av kvinner diagnostisert med CIN2, CIN3, adenokarsinoma *in situ* (ACIS) eller kreft). Disse ble validert i en kohort bestående av serumprøver fra 280 kvinner henvist til gynekolog etter unormale funn ved cytologiscreening. Blant de 280 kvinnene var det 85 som hadde normale funn i livmorhalsen, og 37, 30, 120, 5 og 3 som var diagnostisert med henholdsvis CIN1, CIN2, CIN3, ACIS og kreft. Mengde sirkulerende miRNA i serumprøvene ble kvantifisert med Droplet digital PCR. Resultatene viste at konsentrasjonen (kopier/ $\mu$ l

serum) av alle de fire sirkulerende miRNA typene var omvendt assosiert med alvorlighetsgrad av lesjoner i livmorhalsen. Nedreguleringen var signifikant for miR-423-5p ( $p = 0.008$ ), miR-142-5p ( $p = 0.020$ ), og miR-29c-3p ( $p = 0.024$ ), mens den var like under 95 % signifikansnivå for miR-451a ( $p = 0.078$ ). En sammenslåing av data fra ulike pasientgrupper viste at konsentrasjonen av alle fire miRNA typene var signifikant lavere hos kvinner med CIN2+ og CIN3+ (CIN3, ACIS eller kreft). Det ble ikke identifisert absolutte nivåer av de fire miRNA typene, alene eller i kombinasjon, som med høy presisjon kunne diskriminere kvinner med CIN2+ eller CIN3+ fra kvinner med lavgradige eller ingen lesjoner. Ytterligere forskning som inkluderer flere kohorter i longitudinelle studier, samt flere livmorhalskreftpasienter, vil være nødvendig for å undersøke potensialet de ulike typene sirkulerende miRNA har som biomarkører for prognose av kvinner med CIN1 eller CIN2+, eller tilbakefallsrisiko hos kvinner behandlet for høygradige lesjoner i livmorhalsen.

## Abstract

Persistent infection with human papillomavirus (HPV) may lead to the development of cervical cancer precursors (cervical intraepithelial neoplasia (CIN)) and cervical cancer. Worldwide, cervical cancer is the third most widely diagnosed cancer among women, and the most common HPV-related cancer. The introduction of screening programs has led to a significant decrease in the incidence of cervical cancer cases. Today, women diagnosed with high-grade HPV-associated CIN during screening undergoes conization, although lesions in most cases will regress. Current tests are unable to determine which women that are at higher risk of developing cervical cancer, resulting in overtreatment. Although conization is essential to prevent cancer development, the procedure can lead to complications for women during pregnancy. There is a need for progression markers for optimizing today's screening and thus reduce overtreatment.

Cell-free circulating microRNA (miRNA) in plasma or serum have received increasing attention due to their potential as biomarkers. MiRNA are small non-coding RNA molecules that act as post-transcriptional regulators by binding to mRNA with sequence complementarity. They play a crucial role in the regulation of gene expression and control of cellular and metabolic pathways in humans. In several cancer types, including cervical cancer, altered gene expression of miRNA has been observed through carcinogenesis, suggesting that they have a potential as biomarkers in women with cervical precursor lesions and cervical cancer.

The purpose of this study was to investigate whether the levels of four candidate circulating miRNAs identified in serum in a pre-screening study; miR-142-5p, miR-423-5p, miR-451a and miR-29c-3p, correlated with different degrees of cervical lesions in women. Altered gene expression could indicate their potential as biomarkers for identification and prognosis of women with different cervical lesions, ranging from low grade lesions (CIN1) to high grade lesions (CIN2+, which consist of all women diagnosed with CIN2, CIN3, adenocarcinoma *in situ* (ACIS) or cancer). These were validated in a cohort consisting of serum samples from 280 women referred to a gynecologist due to abnormal cytological findings during screening. Among the 280 women, 85 had no cervical lesion, and 37, 30, 120, 5 and 3 were diagnosed with CIN1, CIN2, CIN3, ACIS and cancer, respectively. The level of circulating miRNA in the serum samples was quantified with Droplet digital PCR. The results showed that the

concentration (copies/ $\mu$ l serum) of each of the four circulating miRNAs tested was inversely associated with the cervical lesion severity. The down regulation was significant for miR-423-5p ( $p = 0.008$ ), miR-142-5p ( $p = 0.020$ ) and miR-29c-3p ( $p = 0.024$ ), whereas for miR-451a ( $p = 0.078$ ) it was just under the 95 % significance level. When combining data from different patient groups, the concentration of each of the four miRNA types was significantly lower in women with CIN2+ and CIN3+ (CIN3, ACIS or cancer). No absolute levels were identified for any of the miRNAs alone or in combination, that with high precision could discriminate women with CIN2+ or CIN3+ from women with low grade or no cervical lesion. Further research including more cohorts in longitudinal studies, as well as more cervical cancer patients, will be needed to investigate the potential of the various types of circulating miRNAs as biomarkers for the prognosis of women with CIN1 or CIN2+, or recurrence risk in women treated for high grade cervical lesions.



## Forkortelser

ACIS	Adenocarcinoma (adenokarsinoma) <i>in situ</i>
AGUS	Atypiske sylinder/kjertelceller av usikker betydning
ASC-H	Atypiske skvamøse celler, kan ikke utelukke HSIL
ASC-US	Atypiske skvamøse celler av usikker betydning
AUC	Area Under Curve (areal under kurve)
BMI	Body Mass Index
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CIN	Cervikal Intraepitelial Neoplasi
Ct	Cycle threshold (terskelsyklus)
cDNA	Complementary (komplementær) DNA
ddPCR	Droplet digital PCR
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DNA	Deoksyribonucleic acid (deoksyribonukleinsyre)
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate (deoksynukleotidtrifosfat)
GEO	Gene Expression Omnibus
HPV	Humant papillomavirus
HR	Høyrisiko
HSIL	Høygradig skvamøs intraepitelial lesjon
ICC	Invasive Cervical Cancer (invasiv livmorhalskreft)
KI	Konfidensintervall
LR	Lavrisiko
LSIL	Lavgradig skvamøs intraepitelial lesjon
miR	miRNA
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Messenger (budbringer) RNA
NGS	Next Generation Sequencing (neste generasjons sekvensering)
NILM	Negativ for intraepitelial lesjon eller malignitet
NTC	Negative template control (negativ templat kontroll)
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerasekjedereaksjon)
pRB	protein Retinoblastoma
pre-miRNA	Precursor (forløper) miRNA transkript
pri-miRNA	Primært miRNA transkript

qPCR	Quantitative (kvantitativ) real-time PCR
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription PCR
REK	Regional Etisk Komite
RISC	RNA-induced silencing complex (RNA-indusert silencing kompleks)
RNA	Ribonucleic acid (ribonukleinsyre)
ROC	Receiver Operating Characteristic
RT-PCR	Reverse Transcription PCR (revers transkripsjon PCR)
SCC	Squamous cell carcinoma (plateepitel karsinom)
SCJ	Squamocolumnar junction (plate/sylinderepitel overgang)
SIL	Skvamøs intraepitelial lesjon
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
UTR	Untranslated region (utranslatert region)

# Innholdsfortegnelse

<b>1 Introduksjon</b>	<b>1</b>
1.1. Humant papillomavirus	1
1.1.1 Definisjon av HPV	1
1.1.2 Cervikal HPV infeksjon	1
1.1.3 Persisterende HPV infeksjon i livmorhalsen og kreftutvikling	4
1.1.4 Screeningprogrammet og behandling av forstadier til kreft	6
1.2 miRNA som biomarkør	10
1.2.1 Definisjon og virkemekanisme av miRNA	10
1.2.2 Sirkulerende miRNA som biomarkør	11
1.2.3 Bruk av ddPCR til kvantifisering av miRNA	12
1.2.4 miRNA og livmorhalskreft	13
<b>2 Formålet med studien</b>	<b>16</b>
<b>3 Materialer og metoder</b>	<b>17</b>
3.1 Studiepopulasjon	17
3.2 Forarbeid	17
3.3 Ekstraksjon av miRNA fra serumprøver	18
3.4 cDNA syntese	18
3.5 Hemolysekontroll	19
3.6 Optimalisering for kvantifisering ved digital droplet PCR	20
3.6.1 Optimalisering av temperatur	20
3.6.2 Optimalisering av fortynningsgrad av cDNA templat	21
3.7 Digital droplet PCR	22
3.8 Statistisk analyse	22
<b>4 Resultater</b>	<b>24</b>
4.1 Hemolysekontroll	24
4.2 Optimalisering for kvantifisering på digital droplet PCR	25
4.2.1 Optimalisering av temperatur og cDNA templat fortynningsgrad	25
4.3 Mengde sirkulerende miRNA per histologisk diagnose	27
4.3.1 ROC-kurve	31
<b>5 Diskusjon</b>	<b>33</b>
<b>6 Konklusjon</b>	<b>42</b>
<b>7 Referanser</b>	<b>43</b>



# 1 Introduksjon

## 1.1. Humant papillomavirus

### 1.1.1 Definisjon av HPV

Papillomavirus tilhører familien *Papillomaviridae* og består av en mangfoldig gruppe DNA virus som kan infisere hud og slimhinner hos både mennesker og dyr. Over 200 ulike typer papillomavirus infiserer mennesker, og for disse brukes betegnelsen humant papillomavirus (HPV). Rundt 40 typer HPV smitter ved seksuell kontakt og infiserer slimhinner. HPV-infeksjon er den vanligste seksuelt overførbare infeksjonen både hos kvinner og menn. De ulike HPV-typene som infiserer slimhinner klassifiseres i lavrisiko og høyrisiko HPV-typer. Lavrisiko HPV-typer (lrHPV) er assosiert med asymptomatiske infeksjoner, vorter (papillomer), kjønnsvorter (kondylomer) og lavgradige celleforandringer som går over av seg selv, mens høyrisiko HPV-typer (hrHPV) kan forårsake forstadier til kreft og kreft [1].

HPV har et lite sirkulært dobbelttrådet (ds)DNA genom på omkring 8000 basepar bestående av gener som uttrykkes tidlig (E1, E2, E4, E5, E6 og E7) og sent (L1 og L2) i virusets livssyklus. Disse koder henholdsvis for nødvendige proteiner for kopiering, eller replikasjon, av viralt DNA, og for overflateproteinene i viruspartikkelen. De er avhengige av vertscellens cellulære DNA polymerase og replikerer ved å indusere S-fase, fasen der den cellulære DNA syntesen foregår, i den infiserte cellen [2]. HPV deles inn i fem genus, eller genotyper, basert på forskjeller i DNA sekvens for L1 overflateproteinet; Alfa, Beta, Gamma, Nu og Mu, der Alfa og Beta/Gamma representerer den største andelen. I motsetning til de andre genotypene kan HPV typer som tilhører Alfa genus infisere slimhinner i tillegg til hud, og er den gruppen som inneholder de mest karsinogene virusene. HrHPV innenfor Alfa genus er enten bekreftet å være karsinogene virus (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 og 59), eller mulige karsinogene virus (HPV26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 og 82). Blant disse er HPV16 og HPV18 de to typene som forårsaker de fleste HPV-relaterte krefttilfellene [1, 3].

### 1.1.2 Cervikal HPV infeksjon

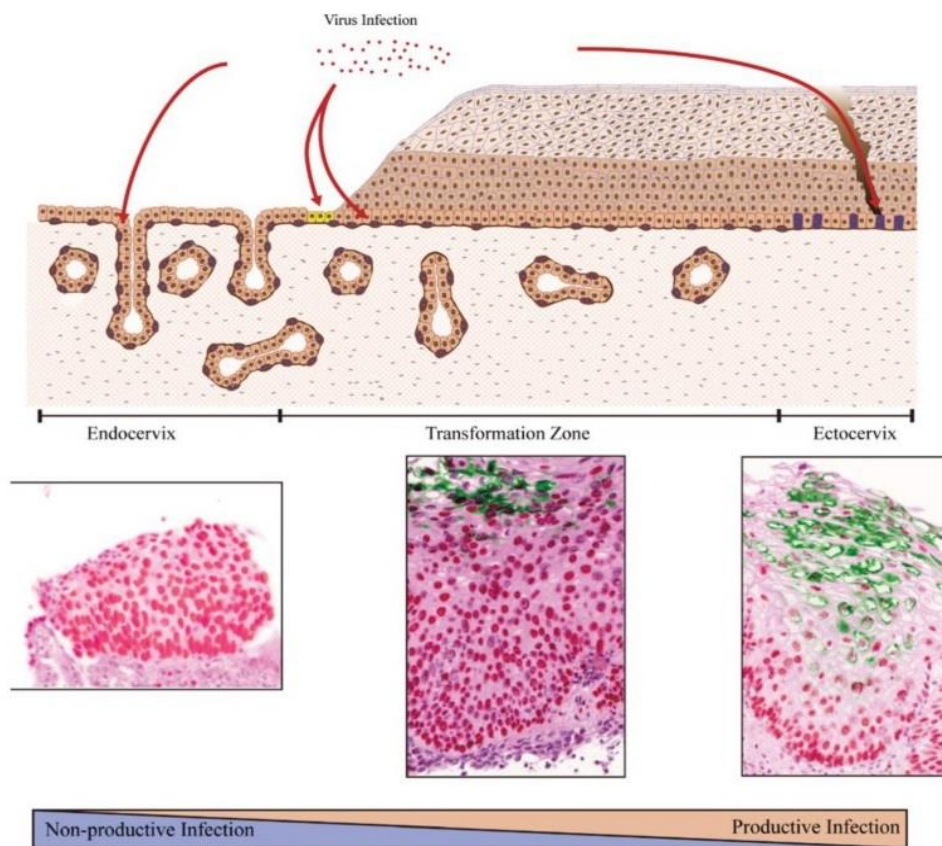
HPV er assosiert med flere kreftformer som kreft i hode og halsregionen (orofarynkskreft), vagina, vulva, penis og anus, men cervical- eller livmorhalskreft er den mest vanlige. Av 600 000 krefttilfeller forårsaket av HPV i 2012 på verdensbasis utgjorde livmorhalskreft over 500 000 av tilfellene [1]. HPV smitter ved direkte hud-til-hud kontakt, oftest i forbindelse med

seksuell aktivitet. I sjeldne tilfeller kan viruset overføres vertikalt fra mor til barn under fødsel [4]. HPV forekomsten er høyest hos seksuelt aktive kvinner under 25 år. Menn blir på lik linje smittet av viruset, og kan i noen tilfeller utvikle kreft i penis og anus, men risikoen for dette er lav. Nye HPV infeksjoner spres raskt mellom kvinner og menn i ung alder, da infeksjonen ofte ikke gir symptomer og derfor er vanskelig å oppdage. Dette kan i flere tilfeller føre til at individer blir smittet av flere typer HPV samtidig. Infeksjonsraten reduseres i takt med alder, delvis som et resultat av færre seksualpartnere, og delvis grunnet utvikling av immunitet hos tidligere infiserte individer. Det finnes også tilfeller der viruset ligger latent i kroppen i flere år, og dermed forblir uoppdaget inntil en eventuell reaktivering av virusinfeksjonen [1]. 80 % av seksuelt aktive kvinner vil bli infisert med HPV en gang i løpet av livet, men selv om smitteraten er høy vil opp mot 90 % av alle HPV infeksjoner bli bekjempet av immunforsvaret og gå i regress innen to år [3].

Livmorhalsen er delt inn i ectocervix, endocervix og en transformasjonssone (Figur 1). I ectocervix er det plateepitel med flere cellelag, og i endocervix er det sylinderepitel bestående av kun et cellelag. Sylinderepitelet i endocervix og plateepitelet i ectocervix er avgrenset med en overgangssone, squamocolumnar junction (SCJ), som flytter seg i løpet av en kvinnes liv. Området mellom den tidligere SCJ overgangen og den nye kalles for transformasjonssonen, og er et område der plateepitel lages og erstatter tidligere sylinderepitel. Hos unge jenter er transformasjonssonen lokalisert i den ytre delen av livmorhalsen, men ettersom de blir eldre flytter sonen seg høyere opp i livmorhalsen. For at HPV skal kunne sikre en produktiv infeksjon i livmorhalsen er viruset avhengig av tilgang til basalcellene i plateepitelet i ectocervix. Basalcellene er prolifererende celler i deling som viruset er avhengig av for å kunne starte sin egen replikasjon. Basalcellene er lokalisert nederst i plateepitelet, og det antas at viruset kan få tilgang til disse gjennom en rift eller skade i epitelet. HPV fullfører en fullstendig replikasjonsyklus ved celledifferensiering gjennom smittet plateepitel. Etterhvert som infiserte basalceller deler seg og går inn i det parabasale laget vil genuttrykket endre seg gradvis gjennom epitelet. Oppformeringen av det virale genomet skjer normalt i det midterste epiteliale laget, mens sammensetting og frigjøring av nye viruspartikler skjer nær overflaten av epitelet. Ved en produktiv virusinfeksjon vil altså de infiserte cellene migrere hele veien gjennom plateepitelet fra basalcellene til overflaten [1, 5].

HPV kan også infisere basalceller i endocervix og transformasjonssonen. I endocervix vil ikke HPV kunne fullføre en fullstendig replikasjonsyklus med utskillelse av nye viruspartikler. I

sylinderepitel er det ikke mulig for viruset å uttrykke alle sine gener slik som ved celledifferensiering i plateepitel. Infeksjoner som skjer i endocervix vil dermed enten bekjempes av immunsystemet, ligge latent, eller persistere og kunne føre til utvikling av adenokarsinom. Et adenokarsinom er kreft i epitelvev hvor kreftcellene utgår fra kjertelvev. Infeksjoner som starter i transformasjonssonen er de som oftest utvikler seg til lesjoner eller celleforandringer. Epitelet i dette området består for det meste av metaplastisk epitel med celler i forandring, og det er mer mottakelig for onkogene påvirkninger enn et modent plateepitel. I SCJ (Figur 1) finnes det stamcelleliknende celler nær overflaten av epitelet som kan utvikle seg til enten plateepitel eller sylinderepitel. Disse cellene antas å være særlig utsatt for infeksjon [3, 5, 6].



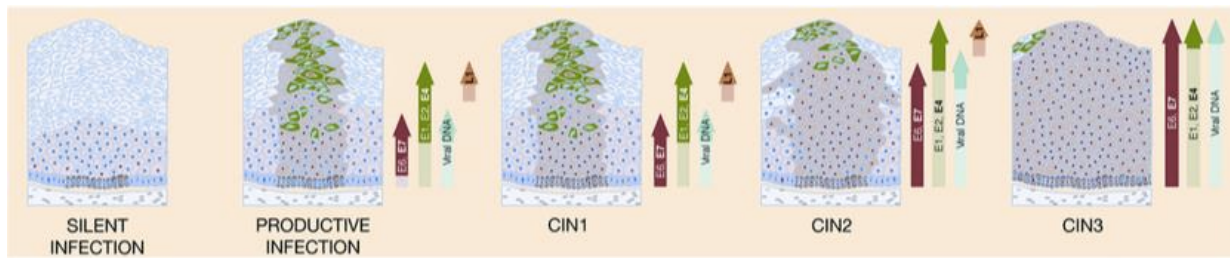
**Figur 1. Områder i livmorhalsen der HPV infeksjon kan forekomme.** De fleste tilfeller av livmorhalskreft oppstår ved infeksjon i transformasjonssonen (Transformation Zone) der vevet består av celler som er i forandring (vist i lilla farge på bildet i midten). I squamocolumnar junction finnes stamcelleliknende celler som er særlig utsatt for infeksjon (vist i gul farge på øverste bilde). En produktiv infeksjon vil sannsynligvis oppstå i ectocervix (vist i grønt på bildet til høyre), mens en ikke-produktiv eller mislykket infeksjon sannsynligvis vil oppstå i endocervix (venstre bilde). På det øverste bildet er viruspartikler vist som røde prikker (Virus Infection) og de røde pilene indikerer infeksjonssetene [5].

### 1.1.3 Persisterende HPV infeksjon i livmorhalsen og kreftutvikling

HPV av høyrisikotype kan hos noen smittede forårsake en persisterende infeksjon som på lang sikt kan føre til kreftutvikling i livmorhalsen. De onkogene egenskapene til HPV kommer fra onkoproteinene E6 og E7 som kodes fra genene uttrykt tidlig i virusets livssyklus. Genproduktene endrer vertscellens naturlige cellesyklus og kan indusere utvikling av neoplasier, eller vev med unormal cellevekst, som kan utvikle seg til svulster. E6 binder til og fører til degradering av vertscellens p53 protein. Normalt fungerer p53 som en sensor for DNA skade og kan indusere celledød eller stans i cellesyklus dersom en skade ikke repareres. E7 binder til vertscellens retinoblastoma protein (pRB), et protein som normalt regulerer cellesyklusen til vertscellen, og hindrer dets funksjon. Siden både p53 og pRB fungerer som tumor-suppressorer og bidrar til å hemme veksten av kreftceller, så kan konsekvensen av onkoproteinbinding være en forandring av vertscellen som gjør at den vil fortsette å dele seg i det smittede epitelet [7].

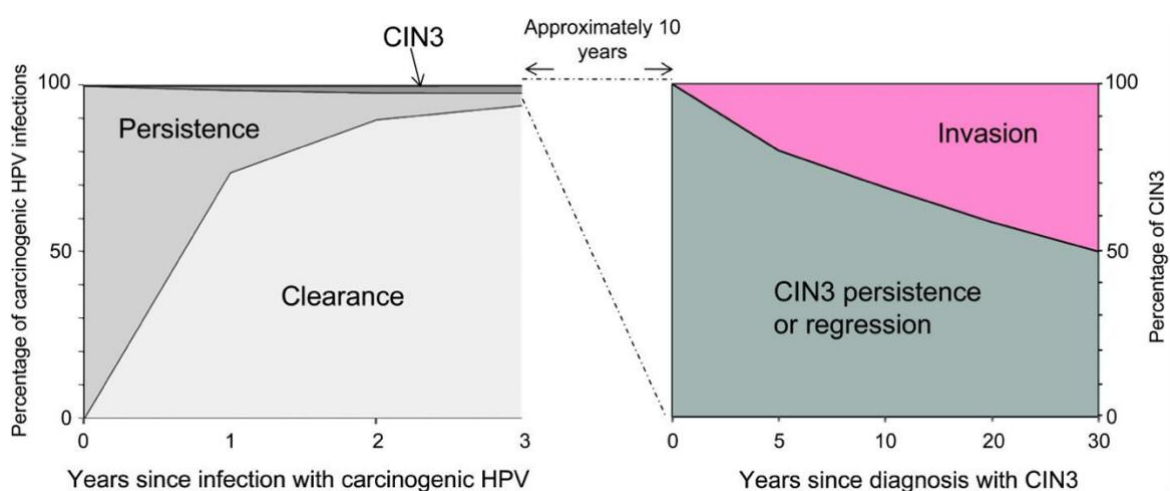
En persisterende infeksjon kan føre til dannelse av lesjoner i livmorhalsen. Graden E6 og E7 uttrykkes ved er høyt korrelert med type lesjon. I lavgradige lesjoner er E6 og E7 uttrykt i de parabasale cellene, men ikke i de øvre lagene i epitelet. I høygradige lesjoner er E6 og E7 uttrykt i stor grad gjennom hele epitelet [7]. Lesjonene graderes etter en histopatologisk CIN (cervikal intraepitelial neoplasi) skala, fra CIN1 til CIN3 (Figur 2). CIN1 representerer lavgradige lesjoner og CIN2/3 høygradige lesjoner i plateepitel. CIN3 er det siste stadiet før kreft, og på dette stadiet produseres det ikke lenger nye viruspartikler grunnet overproduksjon av E6 og E7 i øvre del av epitellaget og en nedregulering av L1 og L2 overflateproteiner. Det finnes også subkliniske, latente infeksjoner uten symptomer der virale genomer persisterer i basalcellene uten utvikling av sykdom [1]. Adenokarsinoma *in situ* (ACIS) representerer høygradige lesjoner i sylinderepitel, og er forstadiet til adenokarsinomer i livmorhalsen [8].





**Figur 2. Ulike stadier på den histopatologiske CIN skala og endringen av genuttrykk i epitelet.** HPV infeksjon kan føre til en asymptomatisk, subklinisk latent infeksjon, eller alternativt til en produktiv infeksjon som i CIN1. I noen tilfeller kan en produktiv infeksjon føre til utvikling av neoplasi som i CIN2 og CIN3. I disse stadiene er det virale genuttrykket deregulert (vist som oppadgående piler for aktuelle gener), og det produseres ikke lenger nye viruspartikler ved CIN3. CIN2 og CIN3 betraktes som forstadier til kreft [3].

HPV-infeksjon er dermed en forutsetning for utvikling av livmorhalskreft. På verdensbasis er livmorhalskreft den tredje mest diagnostiserte kreftformen blant kvinner og den fjerde mest vanlige årsaken til kreftrelatert dødelighet [9]. Selv om en HPV infeksjon i over 90 % av tilfellene vil gå i regress, er det fortsatt opp mot 10 % som vil utvikle lesjoner i livmorhalsen ved en persisterende infeksjon (Figur 3). Flesteparten av lesjonene vil gå tilbake av seg selv, men hos noen kvinner utvikler disse seg videre til kreft. Ca. 50 % av kvinner diagnostisert med CIN3 vil utvikle kreft i løpet av 30 år dersom de ikke mottar behandling [10]. Årlig i Norge utvikler omlag 6000 kvinner behandlingstrengende forstadier til kreft, ca. 300 kvinner får livmorhalskreft, og omlag 70 kvinner dør av denne kreftformen [11-13].



**Figur 3. Persistens og progresjonsrisiko ved HPV infeksjon.** Grafen til venstre viser prosentvis hvordan andel hrHPV infeksjoner enten klareres, persisterer eller utvikles til høygradige lesjoner i løpet av de tre første årene etter deteksjon av infeksjon. Grafen til høyre viser prosentvis andel individer diagnostisert med CIN3 som utvikler livmorhalskreft uten behandling [10].

#### 1.1.4 Screeningprogrammet og behandling av forstadier til kreft

Vanligvis utvikler livmorhalskreft seg i løpet av ca 10-30 år [11]. Den langsomme utviklingen fra HPV infeksjon til kreft har gjort det mulig å etablere effektive screeningprogrammer med hensikt om å oppdage forstadier til livmorhalskreft slik at disse kan behandles før en eventuell kreftutvikling. Innføring av screeningprogram har ført til en betraktelig nedgang i forekomsten av livmorhalskreft, og mer enn 80 % av nye tilfeller oppstår i land som enda ikke har innført dette. Den stadig økende forståelsen for betydningen av HPV infeksjon i utvikling av livmorhalskreft har i tillegg nylig ført til to avgjørende strategier for å forhindre kreftutvikling: primær beskyttelse gjennom vaksiner og sekundær beskyttelse gjennom HPV testing for oppdagelse av forstadier til kreft og kreft. Antall tilfeller med forstadier til livmorhalskreft er betraktelig redusert som følge av innføringen av vaksinasjonsprogram, men ettersom livmorhalskreft utvikles langsomt har man enda ikke rukket å se effekten av vaksiner på selve kreftutviklingen [1, 12, 14].

Et screeningsprogram inneholder i de fleste tilfeller først en primærscreening for oppdagelse av lesjoner, videre en eventuell triage test for individer som testet positivt på primærscreening, og til slutt en histologisk undersøkelse med kolposkopi og biopsi av individene med høyest risiko for kreftutvikling. Dersom alvorlige lesjoner (CIN2/3 eller ACIS) oppdages i biopsiprøvene følger det behandling med konisering [1]. Dette er et lite kirurgisk inngrep hvor områdene i livmorhalsen med høygradige celleforandringer fjernes [15]. De mest benyttede screeningsmetodene for livmorhalskreft er cytologi og HPV-test. Cytologi innebærer en mikroskopisk evaluering av celleprøve tatt fra livmorhalsen under en gynekologisk undersøkelse. En HPV-test innebærer påvisning av DNA (eller i noen tilfeller RNA) fra høyrisikotype HPV i cellematerialet ved bruk av molekylærbiologiske teknikker. Cytologiscreening har lavere sensitivitet enn HPV-testing og krever kortere intervaller mellom screeninger [1]. Lesjoner eller celleforandringer påvist i celleprøve tatt ved cytologisk undersøkelse betegnes som skvamøse intraepiteliale lesjoner (SIL) med stigende alvorlighetsgrad (Tabell 1). Lavgradige skvamøse intraepiteliale lesjoner (LSIL) tilsvarer ofte CIN1, mens høygradige skvamøse intraepiteliale lesjoner (HSIL) som regel gjenspeiler CIN2, CIN3 og plateepitel karsinom. ACIS graderes felles for både cytologi og histologi [16].

**Tabell 1. Gradering av cytologi og histologi.** Tabellen er utarbeidet fra kreftregisterets flytskjema for masseundersøkelse mot livmorhalskreft og Pedersen et al. [17, 18].

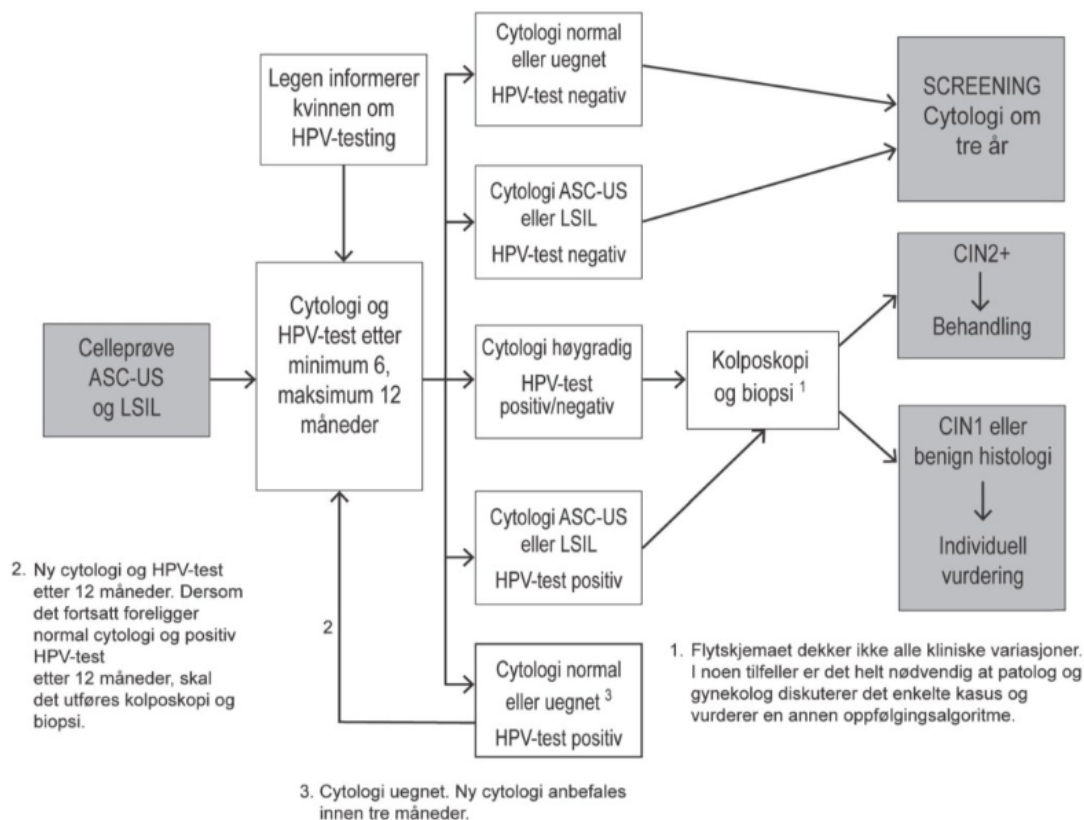
<b>Cytologi</b>	
NILM	Negativ for intraepitelial lesjon eller malignitet
*ASC-US	Atypiske skvamøse celler av usikker betydning
*LSIL	Lavgradig skvamøs intraepitelial lesjon
*ASC-H	Atypiske skvamøse celler, kan ikke utelukke HSIL
*HSIL	Høygradig skvamøs intraepitelial lesjon
**AGUS	Atypisk sylindere/kjertelceller av usikker betydning
**ACIS	Adenokarsinoma in situ
***Kreft	Kreft
<b>Histologi</b>	
Normal	Uten påviste neoplastiske forandringer
CIN1	Cervical intraepitelial neoplasi grad 1
CIN2	Cervical intraepitelial neoplasi grad 2
CIN3	Cervical intraepitelial neoplasi grad 3
**ACIS	Adenokarsinom in situ
***Kreft	Kreft
CIN2+	CIN grad 2, 3, ACIS eller kreft
CIN3+	CIN3, ACIS eller kreft

\* Skvamøse celler som representerer plateepitelceller.

\*\* Celleforandringer i sylinderepitel.

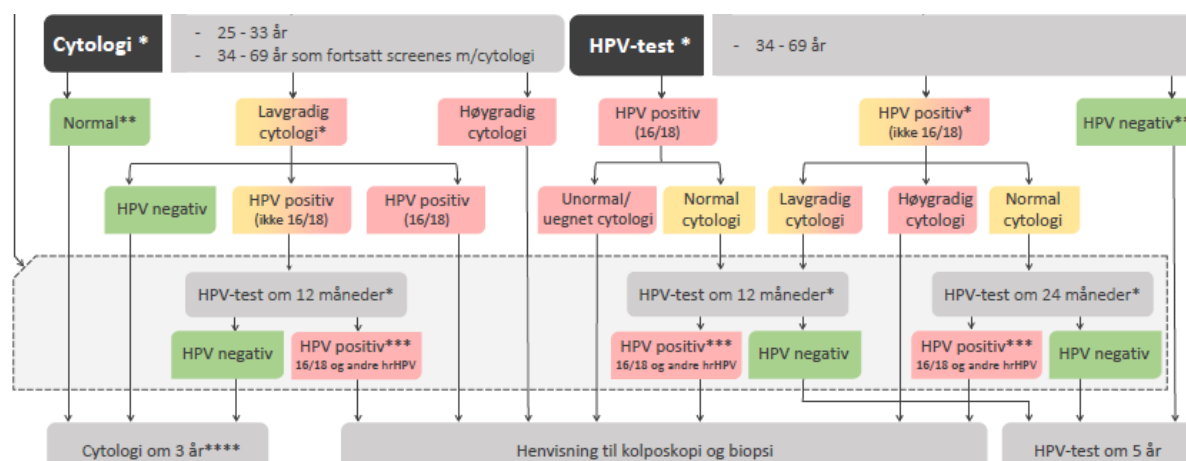
\*\*\* Plateepitelkarsinom eller adenokarsinom.

I Norge ble cytologi tatt i bruk som screening mot livmorhalskreft fra 1950-tallet, men denne prøvetakingen var uorganisert. Et landsdekkende organisert screeningprogram og masseundersøkelse for livmorhalskreft ble innført fra 1995, og innebærer cytologi-basert screening hvert tredje år for kvinner i alderen 25-69 år. Kvinner som får påvist ulike grader av celleforandringer i en celleprøve ved den cytologiske undersøkelsen henvises til videre oppfølging [18, 19]. I 2009 ble HPV-test innført som sekundærscreening i screeningsprogrammet for kvinner med påvist lavgradige og usikre celleforandringer etter primær cytologiscreening. Testen ble utført samtidig med ny cytologisk undersøkelse 6-12 måneder etter et primær ASC-US/LSIL cytologifunn (Figur 4) [20].



**Figur 4. Masseundersøkelse mot livmorhalskreft i perioden 2009-2014.** Nasjonalt flytskjema for utredning av ASC-US/LSIL og bruk av HPV-test i sekundærscreening. Algoritmen gjaldt kvinner mellom 25-69 år [20].

I 2014 ble algoritmen endret for å avklare kvinner raskere, da erfaringer fra den tidligere algoritmen tilsa at flere kvinner ikke kom tilbake til sine oppfølgingsprøver. Det ble derfor bestemt at kvinner som fikk påvist ASC-US/LSIL etter primærscreening skulle HPV-testes umiddelbart i en reflekstest, altså at HPV-test gjøres i samme prøve som celleprøven. Denne algoritmen ble modifisert ytterligere, og i 2018 ble påvist genotype i HPV test (HPV16/18 versus andre hrHPV) inkludert i algoritmens oppfølgingsstrategier. I tillegg blir HPV-testing innført som primær screeningstest med en egen algoritme for kvinner mellom 34 og 69 år i hele landet, med en implementeringsperiode fra 2019-2021 (Figur 5) [21]. Kvinnene dette gjelder vil i dag testes hvert femte år fremfor hvert tredje år, da HPV-testen har høyere sensitivitet enn cytologi og høyere langtids negativ prediktiv verdi [22]. For kvinner under 34 år, og som er uvaksinerte, er det ikke hensiktsmessig at HPV-test erstatter cytologi som primærscreening, da forbigående HPV-infeksjon er svært vanlig i denne aldersgruppen [21].



**Figur 5. Masseundersøkelse mot livmorhalskreft fra 2018.** Flytskjema for vurdering av væskebaserte livmorhalsprøver. Grønne, gule og rosa ruter representerer henholdsvis lav, middels og høy risiko for alvorlige celleforandringer (CIN2+). \*Ved uegnet prøve (primær eller refleks) tas ny prøve innen 1-3 måneder, og ved uegnet cytologi andre gang gjøres reflekstest. \*\*For kvinner over 34 år uten tidligere livmorhalsprøver anbefales det å gjøre cytologi og HPV-test ved første livmorhalsprøve. \*\*\*For HPV positive prøver skal cytologi utføres, men prøvesvar skal ikke påvirke oppfølging. Resultatet brukes av gynekolog ved kolposkopisk undersøkelse. \*\*\*\*Ny HPV-test om 3 år dersom kvinnen ved tidspunkt for ny prøve er fylt 34 år og regionen har implementert HPV-screening i istedenfor cytologi [21].

I dag behandles høygradige lesjoner i livmorhalsen med konisering [15]. I nesten alle land tilsier retningslinjene for forebygging av livmorhalskreft at individer diagnostisert med CIN2+ skal gjennomgå dette inngrepet. Mens CIN3 er en veldig klar høygradig histologisk diagnose blant patologer, er CIN2 en litt uklar diagnose da den i stor grad avhenger av hva den individuelle patologen ser ved undersøkelse av livmorhalsprøver. For å være på den sikre siden er derfor CIN2 satt som en terskel for behandlingsbehov for de aller fleste kvinner i dag. Nåværende tester, dvs. cytologi og HPV-test, klarer ikke å skille mellom lesjoner som vil gå over av seg selv og lesjoner som kan utvikle seg til kreft [18]. Ettersom celleforandringene i mange av disse tilfellene ville gått tilbake av seg selv fører denne praksisen til en overbehandling av kvinner. Selv om koniseringen er avgjørende for å forebygge utvikling av livmorhalskreft er den ikke uten bivirkninger. Konisering kan forårsake nedsatt fertilitet, sen-aborter og premature fødsler [1, 23]. Det er et behov for identifisering av gode progresjonsmarkører slik at oppfølgingsundersøkelser og overbehandling kan reduseres i fremtiden. En progresjonsmarkør som skiller mellom CIN1 infeksjoner som vil utvikles til CIN2+ fra de som mest sannsynlig vil gå i regress, vil også kunne redusere behov for oppfølgingsprøver hos kvinner med lavest risiko. Dagens oppfølgingsstrategier ved cytologi og HPV-testing vil dermed kunne optimaliseres.

Siden masseundersøkelsen for livmorhalskreft ble innført i Norge har forekomsten av livmorhalskreft sunket betraktelig. Det er estimert tre ganger høyere risiko for utvikling av livmorhalskreft blant dem som ikke screenes med celleprøve fra livmorhalsen, og uten screening ville det anslagsvis vært 1000 nye tilfeller av livmorhalskreft per år i motsetning til de ca. 300 som er i dag [24]. I tillegg til screening er vaksinering en avgjørende forebyggende faktor. I Norge har HPV vaksiner vært en del av barnevaksineringsprogrammet til jenter på 7. klassetrinn siden høsten 2009, og fra høsten 2018 fikk også gutter tilbud om vaksine [25]. Selv om det har blitt vist at HPV-vaksiner forebygger mot livmorhalskreft og andre kreftformer som skyldes HPV, er det fremdeles store deler av verden der vaksineringen enda ikke er innført [1].

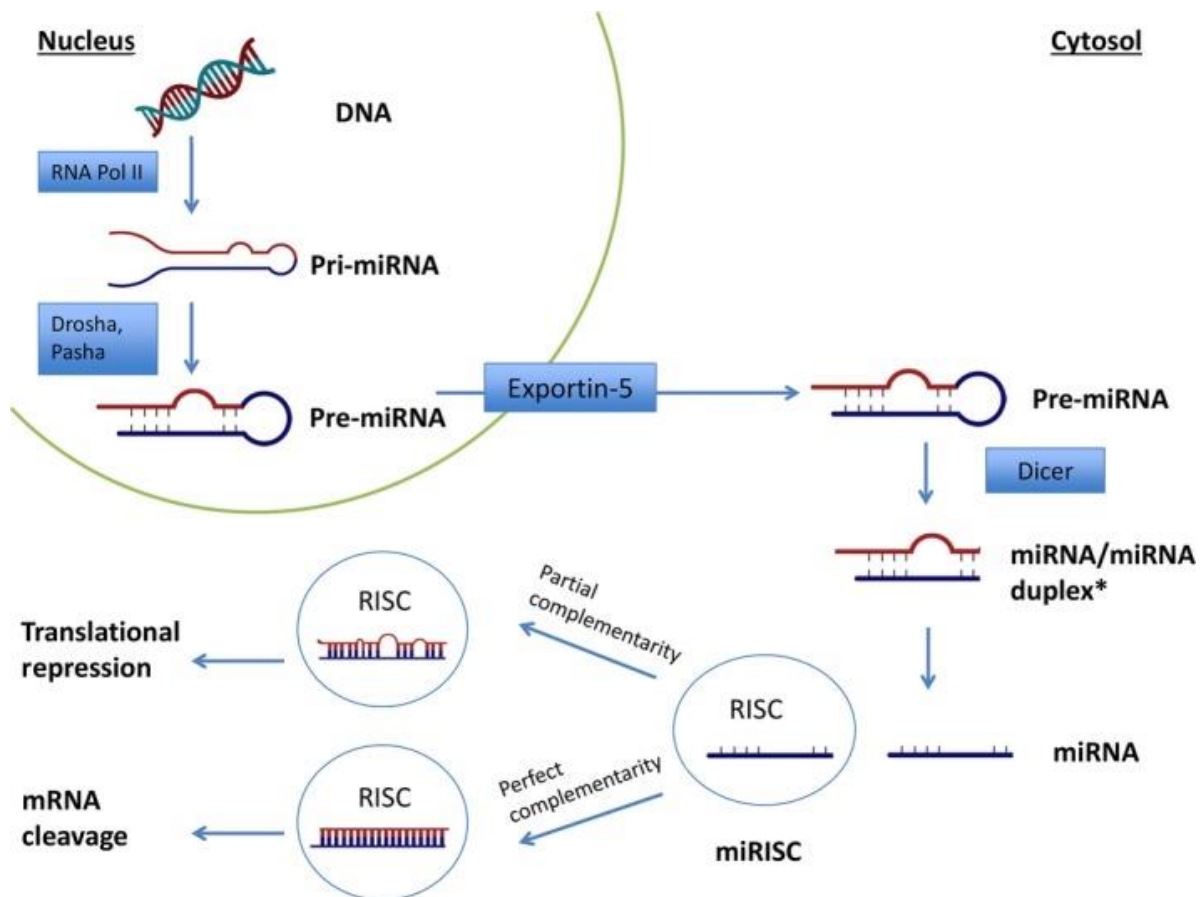
## 1.2 miRNA som biomarkør

### 1.2.1 Definisjon og virkemekanisme av miRNA

MikroRNA (miRNA) er små ikke-kodende RNA molekyler som fungerer som posttranskripsjonelle regulatorer ved å binde seg til messenger RNA (mRNA) med komplementær sekvens. Oppdagelsen av miRNA ble først gjort i *Caenorhabditis elegans*, men det er nå kjent at disse finnes hos de aller fleste eukaryoter, inkludert mennesker. Det er estimert at miRNA står for 1-5 % av det menneskelige genomet og regulerer minst 30 % av alle protein-kodende gener. De spiller derfor en avgjørende rolle i regulering av genuttrykk og kontroll av cellulære og metabolske veier hos mennesker [26].

MiRNA er konserverte enkelttrådede RNA molekyler på 21-23 nukleotider som genereres i en flertrinnsprosess (Figur 6). Først avleses, eller transkriberes, genene som koder for miRNA av RNA polymerase II i cellekjernen, og det dannes et primært miRNA transkript (pri-miRNA). Pri-miRNA består av en løkkestruktur (stem-loop) med et dobbeltrådet område, en 5' cap og en poly-A-hale. Spesifikke RNaser kalt Drosha vil sammen med DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8) og kofaktoren Pasha i et mikroprosessorkompleks gjenkjenne løkkestrukturen til pri-miRNA og kutte i det dobbeltrådede området. Dette frigjør en forløper, precursor-miRNA (pre-miRNA), som videre eksporteres til cytoplasma ved hjelp av proteinet Exportin-5. Her gjenkjennes pre-miRNA av en annen RNase kalt Dicer, som kutter ut en dupleks av miRNA-molekylet. Modent miRNA genereres ved at en av trådene i duplekset binder til en gruppe enzymer kalt RISC (RNA-induced silencing complex). I kompleks med RISC kan miRNA forhindre proteinsyntese på ulike måter. Hvert enkelt miRNA-molekyl har

ulike nivåer av komplementaritet til bestemte mRNA-molekyler, ofte i 3' UTR (3 prime untranslated region). Dersom nivå av komplementaritet mellom miRNA-RISC komplekset og mål-mRNA er 100 % vil mRNA spaltes. Ved delvis komplementaritet vil translasjonsprosessen hemmes eller avsluttes. Når miRNA-RISC komplekset hybridiserer med mRNA vil det dannes dobbeltrådet mRNA som ikke kan translateres til protein [26-28].



**Figur 6. MiRNA transkripsjon og dannelse av modent miRNA i en flertinnsprosess.** Først transkriberer RNA polymerase II et pri-miRNA. Dette gjenkjennes og kuttet av RNasen Drosha sammen med kofaktoren Pasha, og frigjør pre-miRNA som videre eksporteres til cytoplasma av Exportin-5, hvor den gjenkjennes av RNasen Dicer som så kutter ut en dupleks av miRNA. En av trådene i miRNA-duplekset bindes som modent miRNA til RISC-komplekset (miRISC), som videre binder til mål-mRNA molekyler med ulike grader av komplementaritet. Illustrasjonen er hentet fra Magri et al. [28].

### 1.2.2 Sirkulerende miRNA som biomarkør

Et stigende antall studier demonstrerer at miRNA regulerer flere karsinogene prosesser inkludert modning og utvikling av celler, apoptose, autofagi og metastaser. MiRNA har derfor et stort potensial som biomarkør innenfor kreftdiagnose, -prognose og til utvikling av persontilpasset medisin [29, 30]. Påvisning av cellefrie sirkulerende miRNA-molekyler i blod

har også fått en økende oppmerksomhet grunnet deres potensiale som biomarkører. Disse skilles aktivt ut fra celler via mikrovesikler som eksosomer, eller ved å binde til lipoproteiner. Vesiklene/lipoproteinene beskytter sirkulerende miRNA mot RNase aktivitet, men også mot degradering under tilstander med lav eller høy pH/temperatur. Dette gjør at de holder seg stabilt i blodet og lett kan detekteres [27, 29, 31]. Sirkulerende miRNA kan forholdsvis enkelt standardiseres, i motsetning til miRNA fra ulike celler eller vev der mengde celler og celledammensetning i vevet vil påvirke analyseresultater. En annen fordel er at sirkulerende miRNA ikke krever invasive prosedyrer ved prøvetaking, kun en enkel blodprøve. I tillegg er sirkulerende miRNA egnet for absolutt kvantifisering da det kan måles per fast serum/plasma volum. Uttrykksnivå påvirkes lite av alder, kjønn, BMI (Body Mass Index), røyking eller andre karakteristikk hos pasienten. Dette er en fordel når patogenet potensiale skal vurderes. Mange typer sirkulerende miRNA er like stabile i friske som i syke individer, i motsetning til tradisjonelle biomarkører som i hovedsak produseres i vev eller blod ved sykdom. Endring i uttrykksmønster for sirkulerende miRNA kan potensielt introduseres ved rutinemessig undersøkelse for overvåkning og tidlig diagnose av for eksempel kreft eller forstadier til kreft [32].

### 1.2.3 Bruk av ddPCR til kvantifisering av miRNA

For at sirkulerende miRNA skal kunne brukes som en biomarkør for diagnostisering må nøyaktig kvantifisering være mulig. Relativ kvantitativ real-time RT-PCR (qPCR) har lenge vært ansett som en god metode for å kvantifisere bestemte RNA molekyler relativt til endogene konstant uttrykte RNA i celler. Selv om denne metoden er mye brukt, er den ikke uten svakheter. Det er en utfordring å finne pålitelige endogene referanse miRNA i serum. Metoden kan heller ikke generere antall kopier av en målsekvens som et svar eller resultat (output) i analysen, noe som gjør den upraktisk ved bruk i kliniske tester. Det er mulig å foreta absolutt kvantifisering av miRNA med qPCR ved bruk av kalibreringskurver. Disse er som oftest bygget på syntetiske kalibratorer med kjent konsentrasjon, og PCR effektiviteten kan avvike mellom syntetiske standarder og serumprøver [31].

Droplet digital PCR (ddPCR) er en teknologi som i senere tid har blitt introdusert som en mulig metode for absolutt kvantifisering av miRNA [31]. Den er basert på fordeling av molekylene i prøven (nukleinsyrer, enzymer, dNTP, probe eller DNA-bindende fargestoff fra PCR reaksjonsoppsett) i tusenvis av mikro-reaksjoner med definert volum i form av dråper. Opp til 20 000 dråper lages med olje-vann emulsjoner. Etter PCR-reaksjon vil hver dråpe enten



inneholde den amplifiserte ønskede nukleinsyren eller ikke. Dråpene analyseres enkeltvis gjennom et to-farge-deteksjonssystem for å avgjøre om disse er positive eller negative (Figur 7). Ved å anta Poisson distribuering av PCR-positive og PCR-negative dråper er det mulig å beregne antall molekyler i reaksjonen, og dermed få en absolutt kvantifisering av mål-DNA. Resultatene uttrykkes som antall kopier av målsekvens per mikroliter av reaksjonen [31].



**Figur 7. Hovedprinsippene ved droplet digital PCR systemet.** 1. Dråpene lages ved olje-vann emulsjoner, der hver dråpe inneholder en mikroreaksjon med alle molekylene i prøven. 2. Separat PCR amplifisering av templatet i hver enkelt dråpe. 3. Enkeltvis opptelling av PCR-positive og PCR-negative dråper gjennom et to-farge-deteksjonssystem. Illustrasjon er hentet fra Bio-Rad sine hjemmesider [33].

Metoden har flere fordeler som gjør den til en mer sensitiv og pålitelig kvantifiseringsmetode enn qPCR. Ettersom absolutt kvantifisering i ddPCR baseres på prinsippene om fordeling av molekylene i prøven og Poisson statistikk, unngås normaliserings- og kalibratorproblemer som ofte oppstår ved qPCR. Metoden har også vist økende presisjon og sensitivitet ved detektering av målsekvenser som er tilstede i få kopier, samtidig som den ikke er spesielt følsom for potensielle PCR inhibitorer (hemmere) eller forskjeller i prøve kvalitet. Den største fordel er likevel at ddPCR, i motsetning til qPCR, ikke krever noen referanse eller en standard kalibreringskurve for kvantifiseringen. Dette gjør metoden robust og pålitelig for kvantifisering av sirkulerende biomarkører som miRNA [31].

#### 1.2.4 miRNA og livmorhalskreft

Kreftutvikling er et resultat av en multifaktoriell flertrinnsprosess som involverer flere endringer i onkogene og tumor-suppressor-gener over lengre tid, ofte over flere år. Mange studier fastslår den viktige rollen miRNA har blant de mange regulerende faktorene involvert i kreftutvikling. Flere typer miRNA fungerer som onkogene eller tumor-suppressorer i forskjellige krefttyper, og er involvert i både stimulering og undertrykking av tumorer [30, 34]. Hos mennesker har miRNA ofte blitt funnet i kromosomale områder berørt av de genetiske endringene som oppstår under kreftutvikling. Derfor antas det at kromosomale endringer utgjør

en av de største mekanismene som ligger til grunn for endret miRNA-uttrykk i kreft. Dette har allerede blitt vist i føflekkreft, nevroblastom (svulstsykdom), beinmargskreft, eggstokkreft og brystkreft [35].

Også for livmorhalskreft har flere studier foreslått miRNA som en mulig biomarkør. For livmorhalskreft er progresjonsutfallet av både forstadier til kreft og kreft vanskelig å forutsi [36]. Den mest benyttede biomarkøren for livmorhalskreft i dag er SCC (squamous cell carcinoma) antigen, som er et antigen assosiert med tumorutvikling i livmorhalsen. Denne markøren unngår ofte å fange opp forstadier til livmorhalskreft, da nivå av antigen under forstadiene kan være for lave til å detekteres. [37, 38].

Ulikheter i tumor-spesifikke miRNA signaturer kan være hjelpsomme for å skille kvinner med ulike lesjoner i livmorhalsen. Studier på livmorhalskarsinom deriverte cellelinjer og vev fra ulike lesjonsgrader støtter involvering av miRNA i alle stadier av livmorhalskreftutvikling. Det har blitt observert flere interaksjoner mellom miRNA og HPV onkoproteiner som kan skje på ulike tidspunkt i karsinogenesen. Flere typer miRNA er lokalisert i kreftrelaterte områder i genomet hvor HPV integreres, og er dermed særlig utsatt for endring i genuttrykk. Det har også blitt foreslått at endringer i DNA metylering, som er en viktig epigenetisk modifisering for regulering av genaktivitet i celler, forårsaker unormalt uttrykk av miRNA i livmorhalskreft. E6- og E7-onkoproteinene fra hrHPV kan indukere økt genuttrykk av DNA-metyltransferaser som kan føre til økt DNA metylering i miRNA kodende områder [35, 39-41]. Selv om mange studier har identifisert en rekke unormalt uttrykte miRNA i cellelinjer og biopsier fra livmorhalskreft, er det få som har sett på sirkulerende miRNA i serum eller plasma, og enda færre har inkludert prøver fra kvinner med forstadiene til livmorhalskreft [35].

De fleste studier som har blitt gjort på utvikling av livmorhalskreft og miRNA er basert på biopsiprøver eller livmorhalskarsinom deriverte cellelinjer. Eksempelvis viste Wang et al. [42] at nivå av miR-25, miR-92a og miR-378 økte med lesjonsprogresjon. Flere studier har presentert at nivå av miR-21 er oppregulert i kvinner med CIN og ICC (Invasive Cervical Cancer), og den er av spesiell interesse siden den er en av de mest uttrykte miRNA typene i celler hos pattedyr. miR-21 er også funnet oppregulert i flere andre krefttyper [35, 43-46]. Wang et al. [47] viste at nivå av miR-214 var signifikant nedregulert i vev fra livmorhalskreftpasienter og livmorhalskarsinom deriverte cellelinjer. Nedreguleringen ble knyttet til interaksjon mellom miR-214 og FOXM1, som er en transkripsjonsfaktor assosiert med utvikling av mange ulike

krefttyper. I samme studie ble det også observert nedregulering av miR-214 i vev fra pasienter med CIN3, som antydte miR-214s hemmende rolle i forstadiene til livmorhalskreft. Li et al. [48] demonstrerte at nivå av miR-218 var nedregulert i vevsprøver fra pasienter med CIN1-3, der genuttrykket var negativt assosiert med lesjonsgrad. I studien ble det også funnet at kvinner infisert med hrHPV hadde lavere nivå av miR-218 enn kvinner infisert med lrHPV eller kvinner uten HPV infeksjon. Li et al. [49] viste en gradvis og signifikant nedregulering av miR-100 i vev fra kvinner med forstadier til livmorhalskreft og livmorhalskreft, via interaksjon med PLK1 (Polo-like-kinase 1). Reduksjon i genuttrykk var omvendt korrelert med alvorlighetsgrad av celleforandringer, og lavest nivå av miR-100 ble observert i kvinner med livmorhalskreft.

Av de få publiserte studiene som har sett på assosiasjonen mellom nivå av sirkulerende miRNA i serum eller plasma og utviklingen av livmorhalskreft viste Wang et al. [37] at nivå av sirkulerende miR-646 var signifikant oppregulert, og at nivå av sirkulerende miR-141 og miR-542-3p var signifikant nedregulert i serum fra pasienter med livmorhalskreft. Det ble derimot ikke undersøkt nivå av disse miRNA typene i de ulike forstadiene til livmorhalskreft. Chen et al. [50] presenterte at sirkulerende miR-1246, miR-20a, miR-2392, miR-3147, miR-3162-5p og miR-4484 var oppregulert i både plasma og vev fra pasienter med livmorhalskreft med lymfeknutemetastaser sammenliknet med pasienter med livmorhalskreft uten metastaser. De ulike typene miRNA ble foreslått som mulige biomarkører for tidlig identifisering av kvinner med livmorhalskreft som vil utvikle metastaser. Jia et al. [51] demonstrerte et oppregulert nivå av sirkulerende miR-21, miR-29a, miR-25 og miR-486-5p i serum fra pasienter med livmorhalskreft. Nagamitsu et al. [38] viste at spesielt nivå av sirkulerende miR-1290 i serum steg i takt med alvorlighetsgraden av histologiske diagnoser, og foreslo denne som en mulig diagnostiske biomarkør. Zheng et al. [52] demonstrerte at sirkulerende miR-30d-5p og let-7d-3p var signifikant nedregulert i eksosomer ekstrahert fra plasmaprøver hos pasienter diagnostisert med CIN2+, sammenliknet med pasienter diagnostisert med CIN1 eller normal cytologi. De foreslo dermed begge disse typene sirkulerende miRNA som verdifulle diagnostiske biomarkører.

## 2 Formålet med studien

For å velge den beste oppfølgingen av kvinner med ulike grader av livmorhalslesjoner er det behov for bedre biomarkører som kan identifisere kvinnene som har størst risiko for progresjon til livmorhalskreft. Mange studier på sirkulerende miRNA har hittil fokusert på kvinner med livmorhalskreft, og i liten grad på kvinner med forstadier til kreft.

Formålet med studien var å undersøke om konsentrasjonen av fire ulike kandidat sirkulerende miRNA; miR-142-5p, miR-423-5p, miR-451a og miR-29c-3p, korrelerte med ulike grader av celleforandringer i livmorhalsen. Disse miRNA var blitt identifisert som de mest aktuelle i en pre-screeningsstudie ved bruk av Serum/plasma Focus Panel på serumprøver fra et begrenset antall kvinner med ulike lesjonsgrader i livmorhalsen. Konsentrasjonen av de fire selekterte typene miRNA ble målt med ddPCR i en kohort bestående av 280 serumprøver fra kvinner med CIN1-3, ACIS, kreft eller normalhistologi, for å vurdere deres assosiasjon med alvorlige celleforandringer (CIN2+/ CIN3+), og dermed evaluere deres potensiale som biomarkører for prognose av kvinner med ulike grader av lesjoner i livmorhalsen.

## 3 Materialer og metoder

### 3.1 Studiepopulasjon

Prøvematerialet benyttet under denne studien var serumprøver fra kvinner rekruttert som en del av doktorgradsstudiet til gynekolog Ingrid Baasland ved St. Olavs Hospital, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Studiet er godkjent av de Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK Vest 2010/420). Kohorten bestod av 305 kvinner henvist til gynekolog for kolposkopi og biopsi etter unormale cytologieresultater og/eller HPV positivitet etter screening av celleprøve fra livmorhalsen. Median alder i populasjonen var 35 år (19 – 75 år), og prøvene ble samlet i tidsrommet 2010 – 2012. Ved inklusjon i kohorten ble det tatt celleprøver, biopsier, og serumprøver. Serumet ble prosessert etter rutiner ved det aktuelle laboratoriet og frosset ved -80 °C til det ble tatt i bruk. Celleprøvene ble HPV-testet med en kommersiell genotype test; Anyplex™ II HPV28 detection (Seegene, Seoul, Korea, katalognummer: HP7S00X) som påviser og genotyper 28 ulike hrHPV/lrHPV typer. For alle kvinnene i kohorten forelå det dermed informasjon om HPV typer funnet i livmorhalsprøvene, samt histologigrad fra biopsier og eventuelle senere konisater fra livmorhalsen (prøver tatt ved konisering) [53, 54]. I videre omtale av histologidiagnose brukes den alvorligste diagnosen (fra biopsi eller konisering) i tilfeller der det er mangel på samsvar.

Av de 305 pasientene fikk 216 diagnostisert histologiske prøver med ulike grader av celleforandringer eller kreft. 250 pasienter viste positivt resultat for minst en HPV-type: 165 pasienter med hrHPV, 11 med lrHPV og 74 med både hrHPV og lrHPV. 89 pasienter hadde normale celleprøver, 38 ble diagnostisert med CIN1, 33 med CIN2, 137 med CIN3, 5 med ACIS og 3 med kreft. Alle pasientene diagnostisert med kreft i studien fikk påvist dette på det tidligste stadiet (Ia) og tumoren var begrenset til livmorhalsen.

### 3.2 Forarbeid

I forkant av dette prosjektet hadde serumprøver fra utvalgte kvinner i kohorten med og uten CIN 2+ (18 stk. normale, 24 stk. CIN3, 5 stk. ACIS og 3 stk. kreft), og med ulike typer HPV påvist i livmorhalsen, blitt screenet for 179 relevante humane sirkulerende miRNA ved hjelp av et spesifikt qPCR basert Serum/plasma Focus microRNA PCR Panel (Exiqon (nå Qiagen), katalognummer: 203699). Ut ifra resultatene fra panelet ble det i denne studien valgt å legge vekt på å validere fire ulike miRNA typer identifisert i pre-screeningsstudien: miR-142-5p,

miR-423-5p, miR-451a og miR-29c-3p. Av de 16 omtalte sirkulerende miRNA typene som er funnet assosiert med livmorhalskreft i tidligere studier er åtte inkludert i fokus-panelet fra Exiqon. Av omtalte sirkulerende miRNA funnet assosiert med forstadier til livmorhalskreft er alle inkludert i fokus-panelet [51, 52], med unntak av miR-1290 [38]. Blant disse var det kun miR-25-3p som var signifikant oppregulert hos kvinner med CIN3 lesjoner i pre-screeningsstudien, men da med en lavere signifikans enn de fire selekterte typene miRNA. Valideringen ble utført ved hjelp av ddPCR på alle prøver i pasientkohorten, for utenom hemolyserte prøver. MiR-451a er blant de miRNA som finnes i røde blodceller og brukes ofte i hemolysekontroll. Likevel var denne blant de mest signifikant nedregulert i kvinner med CIN3+ i fokus-panelet. Uttrykk av andre miRNA som også finnes i røde blodceller slik som miR-16 eller miR-106a var ikke signifikant endret i pre-screeningen med fokus-panelet, og derfor ble miR-451a likevel valgt som en av de aktuelle kandidatene [55].

### 3.3 Ekstraksjon av miRNA fra serumprøver

Total RNA, som også inkluderer miRNA, ble ekstrahert fra serumprøver ved hjelp av miRNA Serum/Plasma Advanced kit (Qiagen, katalognummer: 217204). Ekstraksjonen ble utført på 200 µl serum i henhold til protokoll. I et første lyseringstrinn degraderes proteiner og nukleinsyrer frigjøres, deretter fjernes inhibitorer i et presipiteringstrinn, videre tilsettes isopropanol for bedring av bindingsegenskaper til alle RNA-molekyler i prøven, før denne overføres til en affinitetskolonnes. I kolonnen binder RNA til en membran og kontaminanter vaskes bort i flere steg ved tilsetning av vaskebuffer og etanol. Til slutt elueres RNA i 20 µl nukleasefritt vann og lagres ved – 80 °C. For å kunne vurdere ekstraksjonseffektivitet og mulige PCR inhibitorer ved senere qPCR kjøring ble det tilsatt 3.5 µl ( $1.6 \cdot 10^8$  kopier/µl) av *C. Elegans* miR-39 spik-in (miRNeasy Serum/Plasma Spike-in Control, Qiagen, katalognummer: 219610) før ekstraksjonen, i henhold til produsentens anbefalte protokoll. Synlig hemolyserte prøver (røde/blodige) ble ekskludert.

### 3.4 cDNA syntese

Etter RNA ekstraksjon ble det utført en cDNA syntese der RNA revers transkribes til cDNA før videre kvantifisering av miRNA ved ddPCR. En slik syntese er nødvendig siden RNA ikke er templat for polymerasen i PCR. cDNA syntese ble utført ved hjelp av miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, katalognummer: 339340) i henhold til produsentens protokoll, på alle prøver som ikke var ekskludert på grunn av synlig hemolyse. For en 10 µl reaksjonsmikse ble 2 µl total RNA

benyttet som templat for revers transkriptasen. Under tillagingen av cDNA ble det også laget negative kontroller der nukleasefritt vann ble tilsatt miksen istedenfor templat (NTC – Negative Template Control). Disse var med i syntesen for å utelukke eventuelle kontamineringer med uønsket RNA eller DNA. Prøvene ble inkubert i en T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) med følgende betingelser: 42 °C i 60 minutter, 95 °C i 5 minutter for å denaturere reverstranskriptasen, og 4 °C ∞. cDNAet ble deretter alikvotert i 2 stk 96-brønns plater, med 4 µl i hver brønn, og fryst ved - 80 °C inntil videre analyse med ddPCR. Av resterende cDNA ble det laget en 1:30 fortykning med nukleasefritt vann. Disse ble oppbevart ved 4 °C inntil hemolysekontroll ved real-time PCR.

### 3.5 Hemolysekontroll

Hemolysekontroll ble utført for å undersøke om det fantes miRNA i serumprøvene som stammet fra lyserte røde blodceller. Ettersom formålet var å kvantifisere nivå sirkulerende miRNA i serum, ville eventuelle hemolyserte serumprøver gitt feilaktige resultater. Hemolysekontroll ble utført ved real-time PCR på to ulike miRCURY LNA™ miRNA PCR assay (Qiagen); hsa-miR-451a (katalognummer: YP02119305) og hsa-miR-23a-3p (katalognummer: YP00204772), der mengdeforskjell mellom de to ulike miRNA typene (målt i forskjell i Cycle threshold (Ct) verdier:  $\Delta Ct$ ) ble vurdert. I serum finnes miR-23a-3p som regel svært stabilt uttrykt, og den påvirkes ikke av hemolyse. miR-451a finnes derimot i store mengder inne i røde blodceller, og en forhøyet  $\Delta Ct$  verdi vil være en god indikator for hemolyse.

Til real-time PCR ble det laget en 10 µl reaksjonsmikse for hver av de to miRNA assayene. Reaksjonsmiksen bestod av 5 µl 2x miRCURY SYBR Green Master Mix (Qiagen, katalognummer: 339345), 1 µl resuspendert miRNA PCR assay og 4 µl 1:30 fortynt cDNA. Som negativ kontroll ble nukleasefritt vann tilsatt miksen istedenfor cDNA templat (NTC). Real-time PCR ble utført på AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies) med følgende betingelser: 95 °C i 10 minutter, etterfulgt av 40 sykluser bestående av denaturering ved 95 °C i 10 sekunder og hybridisering/elongering ved 60 °C i 1 minutt.

Av Ct verdiene generert i AriaMx ble det beregnet en  $\Delta Ct$  verdi mellom de to miRNA assasyene for hver prøve,  $\Delta Ct = Ct(miR-23a-3p) - Ct(miR-451a)$ , og  $\Delta Ct > 7.0$  indikerte hemolysering. Hemolyserte prøver ble ekskludert fra videre analyser.

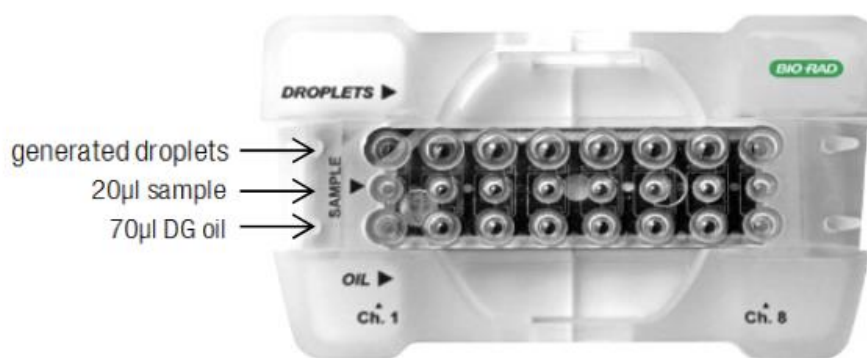
## 3.6 Optimalisering for kvantifisering ved digital droplet PCR

### 3.6.1 Optimalisering av temperatur

Optimal amplifiseringstemperatur til hvert miRNA kan variere. Hvert miRCURY LNA™ miRNA PCR assay (Qiagen); hsa-miR-142-5p (katalognummer: YP00204722), hsa-miR-423-5p (katalognummer: YP00205624), hsa-miR-451a, og hsa-miR-29c-3p (katalognummer: YP00204729), ble derfor optimalisert med tanke på temperatur brukt i QX200 Droplet Digital PCR Systemet. Det ble utført PCR på en temperaturgradient fra 55 °C til 65 °C på T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) for hvert miRNA assay. Instrumentet delte temperaturgradienten automatisk inn i følgende temperaturer: 65.0 °C, 64.3 °C, 63.0 °C, 61.1 °C, 58.8 °C, 56.9 °C, 55.7 °C og 55.0 °C. Til optimaliseringen ble cDNA fra en av prøvene i prøvesettet, og negative kontroller benyttet. MiRNA assayene mottas som tørrstoff og lagres ved -20 °C. Før bruk ble disse først spunnet ned, resuspendert i 220 µl RNasefritt-vann som beskrevet i produsentens manual, og lagret ved -80 °C. For hvert miRNA assay ble det laget en ddPCR mastermiks bestående av 11 µl QX200™ ddPCR EvaGreen supermiks (Bio-Rad, katalognummer: 1864036) og 1 µl miRNA PCR assay. Mastermiksen ble tilsatt 10 µl cDNA fortynnet 1:50 i nukleasefritt vann, eller kun nukleasefritt vann (negativ kontroll), og blandet godt ved vortexing. Hver reaksjon ble laget i duplikater.

Dråper til ddPCR ble deretter laget i henhold til Bio-Rads anbefalinger. Kort forklart ble 20 µl av hver prøve først tilsatt brønnene i midten av DG8™ Cartridge (Bio-Rad, katalognummer: 1864008), deretter ble 70 µl QX200™ Droplet Generation Oil for EvaGreen (Bio-Rad, katalognummer: 1864006) tilsatt i nederste brønn (Figur 8). Etter tilsetning ble DG8™ Cartridge med beholder tildekket av en DG8™ Gasket for QX200™ (Bio-Rad, katalognummer: 1863009) og satt i QX200 Droplet Generator (Bio-Rad) for tillaging av dråper ved hjelp av emulsjon. Dråper på ~ 40 µl ble forsiktig pipettert over i en ddPCR™ 96-brønns plate (Bio-Rad, katalognummer: 12001925). Underveis i dråpelagingen ble PCR platen tildekket med tape for å unngå fordamping av dråpene. Etter at alle dråpene var overført til PCR platen ble denne forseglest med Hot Pierceable foil (Bio-Rad, katalognummer: 1814040) ved hjelp av PX1™ PCR Plate Sealer (Bio-Rad) ved 170 °C i 5 sekunder. PCR ble utført i en T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) ved betingelsene beskrevet i Tabell 2. Produsenten anbefaler å starte PCR reaksjonen innen 30 minutter etter dråpelaging. Praktisk utførelse av dette var vanskelig å gjennomføre. Ved tillaging av en hel plate ble PCR i disse forsøkene satt på innen 45 minutter etter første dråpelaging.





**Figur 8. DG8™ Cartridge med brønner for tilsetning av prøver, olje, og brønner der dråper genereres.** Illustrasjon fra biotype.de [56].

**Tabell 2. PCR betingelser benyttet ved optimalisering av amplifiseringstemperatur før kvantifisering med ddPCR.**

Steg	Temperatur (°C)	Tid	Antall syklers
<b>Polymerase aktivering/denaturering</b>	95	5 min	1
<b>Amplifisering</b>	95	30 sek	40
	Temperaturgradient fra 55 °C – 65 °C	1 min	Ramp rate: 1.6 C/s
<b>Signal stabilisering</b>	4	5 min	1
	90	5 min	1
	4	∞	1

Etter PCR ble dråpene lest av i QX200™ Droplet Reader (Bio-Rad) med ddPCR™ Droplet Reader Oil (Bio-Rad, katalognummer: 1863004), og resultater ble analysert i programmet QuantaSoft™ software tilgjengelig via Bio-Rad [57].

### 3.6.2 Optimalisering av fortynningsgrad av cDNA templat

Etter initiale forsøk med optimalisering av temperatur ble det for to av assayene, miR-29c-3p og miR-451a, nødvendig å optimalisere på fortynningsgrad da disse var svært konsentrert ved en 1:50 fortynning. Optimaliseringen ble utført på samme måte som beskrevet i avsnitt 3.6.1, men istedenfor en temperaturgradient ble det laget en fortynningsrekke av cDNA. Til optimaliseringen ble det benyttet cDNA fra 8 vilkårlige ikke-hemolyserte prøver samt negativ

kontroll. Følgende fortyninger ble testet for miR-451a: 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 og 1:1000, mens kun 1:100 og 1:200 ble testet for miR-29c-3p. Etter optimaliseringen av fortynningsgrad ble optimalisering av temperatur gjentatt for disse to assayene (avsnitt 3.6.1). Grunnet alikvotering og begrensninger i antall tining/frysingsrunder anbefalt for cDNA, ble det til de nye optimaliseringene av fortynningsgrad og temperatur benyttet en 1:30 fortyning av cDNA som var oppbevart ved 4 °C i 2-3 dager. I henhold til protokoll er det anbefalt å benytte ferskt tint cDNA til dette formålet. Det ble derfor undersøkt og bekreftet at prøvematerialet fremdeles var egnet til å sammenligne ulike temperaturer og fortyninger av miRNA i de samme prøvene.

### 3.7 Digital droplet PCR

Valideringsforsøkene på de fire ulike sirkulerende miRNA typene ble utført på pasientprøvene ved å kvantifisere med ddPCR med optimale betingelser for temperatur og templatfortynning. cDNA fra alle prøvene i kohorten ble overført til 4 stk. 96-brønnsplater, og hver plate hadde i tillegg 7-14 NTC. Alle fire miRNA assay ble kvantifisert på samme dag på ferskt tint cDNA for hver plate med prøver. Dette ble gjort for å sikre best mulig kvalitet på cDNA i alle prøvene på hvert oppsett. Kvantifiseringen ble utført i rekkefølgen hsa-miR-29c-3p - hsa-miR-423-5p - hsa-miR-142-5p - hsa-miR-451a, noe som tillot sammenligning av absolutte verdier på tvers av oppsett for alle prøvene i studien.

Selve utførelsen av ddPCR metoden ble gjort på samme måte som under optimaliseringen. I korte trekk innebar dette å fortynne cDNA til riktig fortyning, blande med ddPCR mastermix og lage dråper. PCR ble kjørt på optimum amplifiseringstemperatur i syklusene, dråpene ble avlest i QX200 droplet reader, og resultatet analysert i programmet QuantaSoft™ software. Mengde miRNA ble i QuantaSoft oppgitt i antall kopier/μl prøve og derfra omregnet til kopier/μl serum utfra fortynningsfaktorer (55x for miR-142-5p og miR-423-5p, 220x for miR-29c-3p og 1100x for miR-451a). Disse ble beregnet fra fortyningene i de ulike analysetrinnene: ekstraksjon, cDNA og PCR. Det ble også satt en individuell terskelverdi i alle prøvene for å skille positive og negative dråper.

### 3.8 Statistisk analyse

Den statistiske analysen ble utført i SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc.). Ikke-parametriske tester ble utført, da initielle Q-Q plot analyser for de ulike miRNA typene viste at mengde miRNA ikke var normalfordelt i populasjonen. En Kruskal-Wallis test

ble benyttet for å undersøke om konsentrasjonen av miRNA var signifikant forskjellig mellom de ulike histologiske diagnosene. Mann-Whitney U test ble benyttet i analyser for sammenligning av to uavhengige grupper i datasettet. Data fra kvinner med CIN2+ versus Normal eller CIN1, og data fra kvinner med CIN3+ versus Normal, CIN1 og CIN2 ble analysert. Ettersom kvinner infisert med visse hrHPV typer har større risiko for å utvikle livmorhalskreft, ble Mann-Whitney U testing også brukt for å analysere data fra kvinner sortert på HPV type påvist i livmorhalsen. Mengde sirkulerende miRNA i kvinner påvist med HPV16/18 eller en av de syv mest karsinogene HPV typene i vaksinen Gardasil 9, ble sammenlignet med mengde sirkulerende miRNA i kvinner som ikke har fått påvist en av de mest karsinogene typene i livmorhalsen. Dette ble testet blant alle kvinnene i kohorten, men også blant kvinner med CIN2+, CIN3+, CIN1 og normalhistologi. Signifikansnivået ble satt til 0.05 for de statistiske analysene, og boksplokk ble generert.

Det ble generert ROC (Receiver operating characteristic) kurver for å vurdere de ulike typene sirkulerende miRNA sin evne til å diskriminere kvinner med CIN2+ fra kvinner med CIN1 eller normalhistologi, og kvinner med CIN3+ fra kvinner med CIN2, CIN1 eller normalhistologi. ROC kurver ble generert både for hvert miRNA enkeltvis og for ulike kombinasjoner av alle fire miRNA etter en binær logistisk regresjonsanalyse.

## 4 Resultater

I denne studien ble assosiasjonen mellom ulike grader av celleforandringer i livmorhalsen og sirkulerende miR-142-5p, miR-423-5p, miR-451a og miR-29c-3p i serum undersøkt. Nivå av de ulike typene miRNA ble kvantifisert med ddPCR og validert i en kohort bestående av 280 serumprøver fra kvinner diagnostisert med ulike celleforandringer eller kreft i livmorhalsen, i tillegg til friske kvinner med normalhistologi.

### 4.1 Hemolysekontroll

Hemolyserte prøver ble ekskludert fra analysen for å unngå feilaktig kvantifiseringen av sirkulerende miRNA i serum for disse. Totalt utgjorde dette 10 prøver før ekstraksjon, basert på et blodig utseende (9 stk. CIN3 og 1 stk. normal). Videre ble resten av prøvene vurdert for hemolyse etter cDNA syntese ved Ct verdier generert ved real-time PCR i to ulike miRNA assay; miR-23a-3p og miR-451a. Totalt ble 14 prøver ekskludert (7 stk. CIN3, 3 stk. CIN2, 1 stk. CIN1 og 3 stk. normal) fra videre validering av sirkulerende miRNA, da disse hadde en  $\Delta Ct$  verdi  $> 7.0$ , indikativ for hemolyse. I tillegg ble en prøve (CIN3) ekskludert fra videre analyse grunnet pipetteringsfeil under alikvotering etter cDNA syntese. Totalt ble derfor 25 prøver av de opprinnelige 305 serumprøvene ekskludert fra prøvesettet. Tabell 3 viser hvordan de 280 prøvene benyttet til valideringen av miRNA assayene er fordelt etter histologisk diagnose.

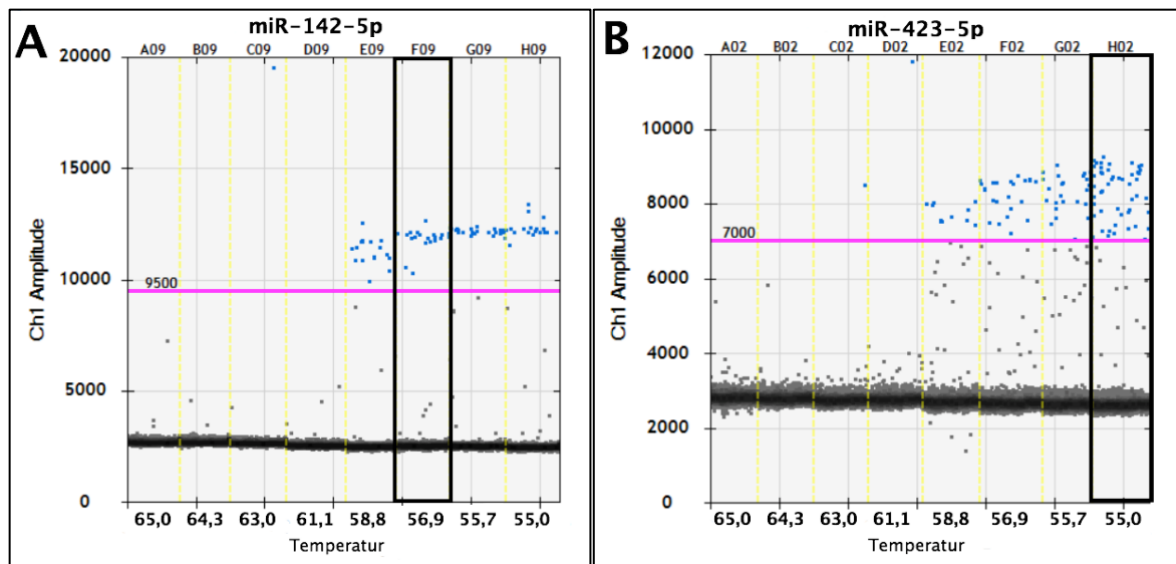
**Tabell 3. Histologisk diagnosefordeling av kvinnene i kohorten etter ekskludering av hemolyserte og uegnede prøver.**

<b>Histologisk diagnose</b>	<b>Antall (n)</b>	<b>Prosentvis andel (%)</b>
<b>Normal</b>	85	30.4
<b>CIN1</b>	37	13.2
<b>CIN2</b>	30	10.7
<b>CIN3</b>	120	42.9
<b>ACIS</b>	5	1.8
<b>Kreft</b>	3	1.1
<b>Totalt</b>	280	100

## 4.2 Optimalisering for kvantifisering på digital droplet PCR

### 4.2.1 Optimalisering av temperatur og cDNA templat fortynningsgrad

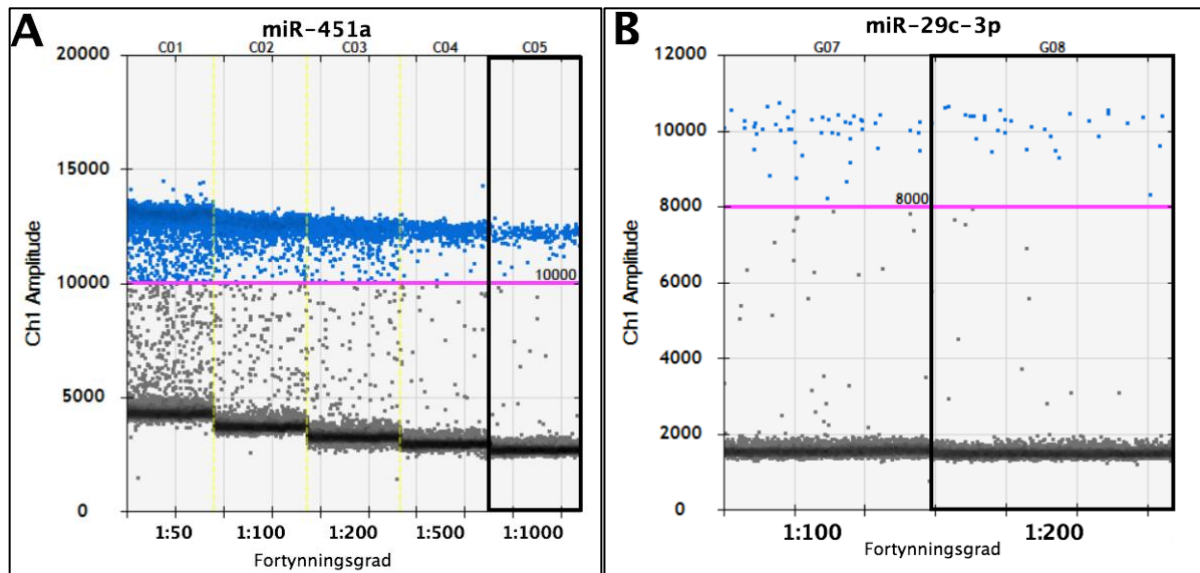
For hvert av de fire miRNA assayene ble optimal amplifiseringstemperatur valgt ut ifra dråpefordelingen i resultatene generert av QuantaSoft™ software, der temperaturen som gav minst regn og klarest skille mellom positive og negative dråper ble valgt. Figur 9 viser resultatene i antall målte dråper for miR-142-5p (Figur 9A) og miR-423-5p (Figur 9B) i prøver amplifisert ved temperaturer fra 55 til 65°C. Temperaturen som viste en optimal amplifiseringstemperatur for miR-142-5p og miR-423-5p var henholdsvis 56.9 °C og 55.0 °C (kolonner markert med svart i Figur 9). For miR-142-5p ble temperaturen rundet opp til 57 °C ved PCR i den kliniske valideringen.



**Figur 9. Optimalisering av temperatur med ddPCR. A) miR-142-5p. B) miR-423-5p.** Blå dråper indikerer positive dråper, grå dråper negative dråper og rosa linje den valgte terskelverdi mellom positive og negative dråper. Dråpene fordeler seg ulikt i prøver amplifisert ved ulike temperaturer, der de ulike prøvene er representert i hver sin kolonne skilt med gule linjer. Temperaturgradienten gikk fra 55 °C (kolonne H) til 65 °C (kolonne A), og prøven med valgt optimal temperatur er markert med en svart boks.

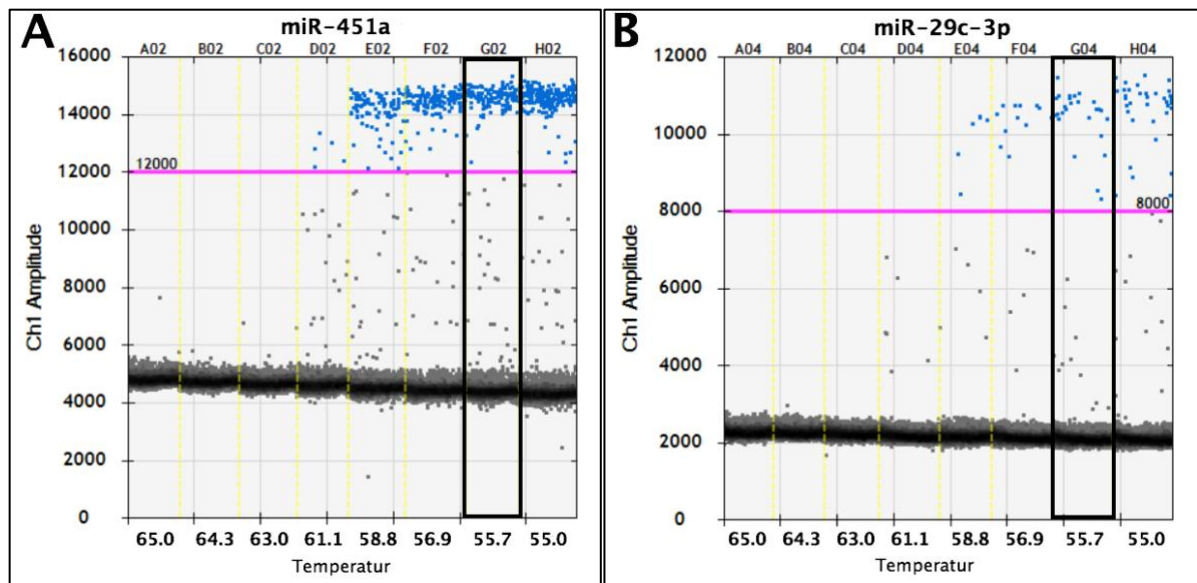
En 1:50 fortykning av cDNA gav for høy konsentrasjon av miR-451a og miR-29c-3p til at resultatet ble lesbart i den initielle optimaliseringen av temperatur. Det ble derfor utført en optimalisering av fortykningsgrad for disse to assayene. Ut ifra de preliminære resultatene

generert etter optimalisering av temperatur på 1:50 fortynning, ble amplifiseringstemperaturen satt til 56 °C for begge assay under optimaliseringen. Resultatene i Figur 10A viser at en 1:1000 fortynning var optimal for miR-451a, og 10B viser at 1:200 fortynning var optimal for miR-29c-3p.



**Figur 10. Optimalisering av konsentrasjon med ddPCR. A) miR-451a. B) miR-29c-3p.** Blå dråper indikerer positive dråper, grå dråper negative dråper og rosa linje den valgte terskelverdi mellom positive og negative dråper. Dråpene fordeler seg ulikt i prøver med ulik konsentrasjon av cDNA, der de ulike prøvene er representert i hver sin kolonne skilt med gule linjer. Plott A: dråpene fordelt gjennom en fortynningsrekke med følgende fortynninger av cDNA; 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 og 1:1000, der 1:1000 ble valgt som optimal fortynningsgrad (kolonne markert med svart). Plott B: dråpene fordelt ved to ulike fortynninger av cDNA; 1:100 og 1:200, der 1:200 ble valgt som optimal fortynningsgrad (kolonne markert med svart).

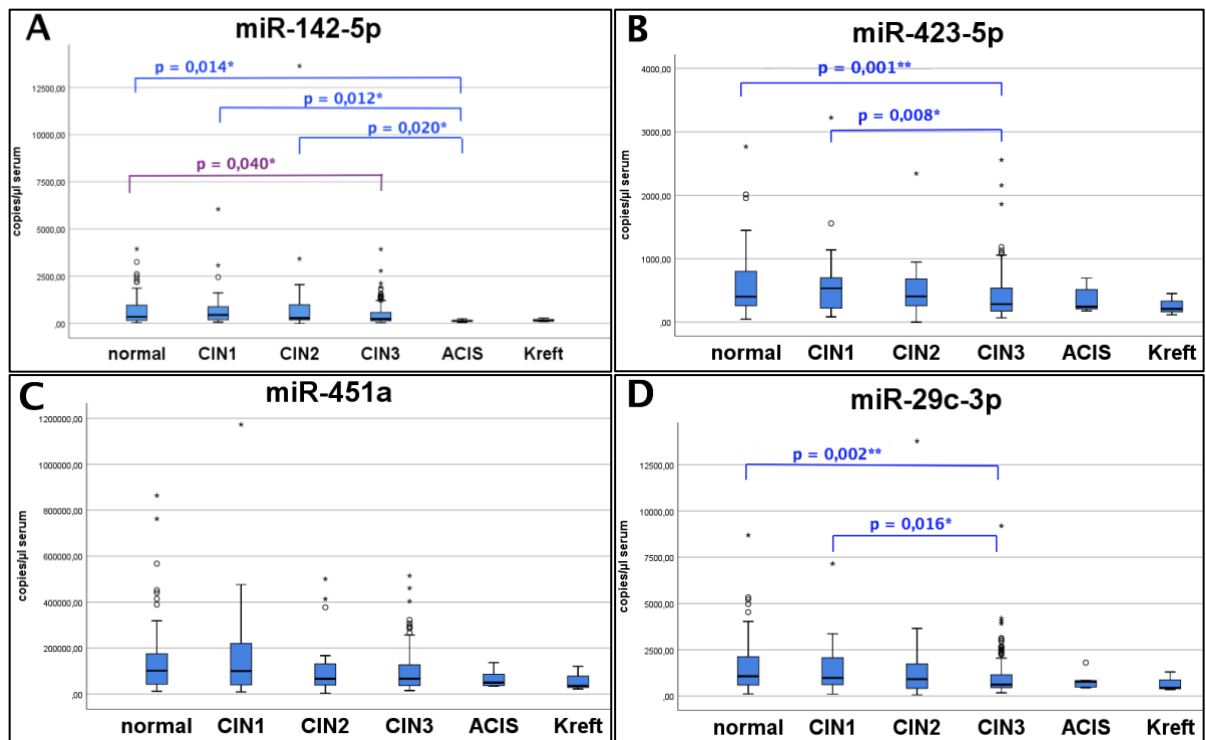
Etter optimalisering av fortynningsgrad for miR-451a og miR-29c-3p ble det på nytt optimalisert for temperatur. For begge disse miRNA ble en amplifiseringstemperatur på 55.7 °C funnet å være optimal, som vist i Figur 11A og 11B. For begge miRNA assay ble denne temperaturen rundet opp til 56 °C ved PCR i selve valideringen.



**Figur 11. Optimalisering av temperatur med ddPCR. A) miR-451a. B) miR-29c-3p.** Blå dråper indikerer positive dråper, grå dråper negative dråper og rosa linje den valgte terskelverdi mellom positive og negative dråper. Dråpene fordeler seg ulikt i prøver amplifisert ved ulike temperaturer, der de ulike prøvene er representert i hver sin kolonne skilt med gule linjer. Temperaturgradient fra 55 °C (kolonne H) til 65 °C (kolonne A). Prøve med valgt optimal temperatur er markert med en svart boks.

#### 4.3 Mengde sirkulerende miRNA per histologisk diagnose

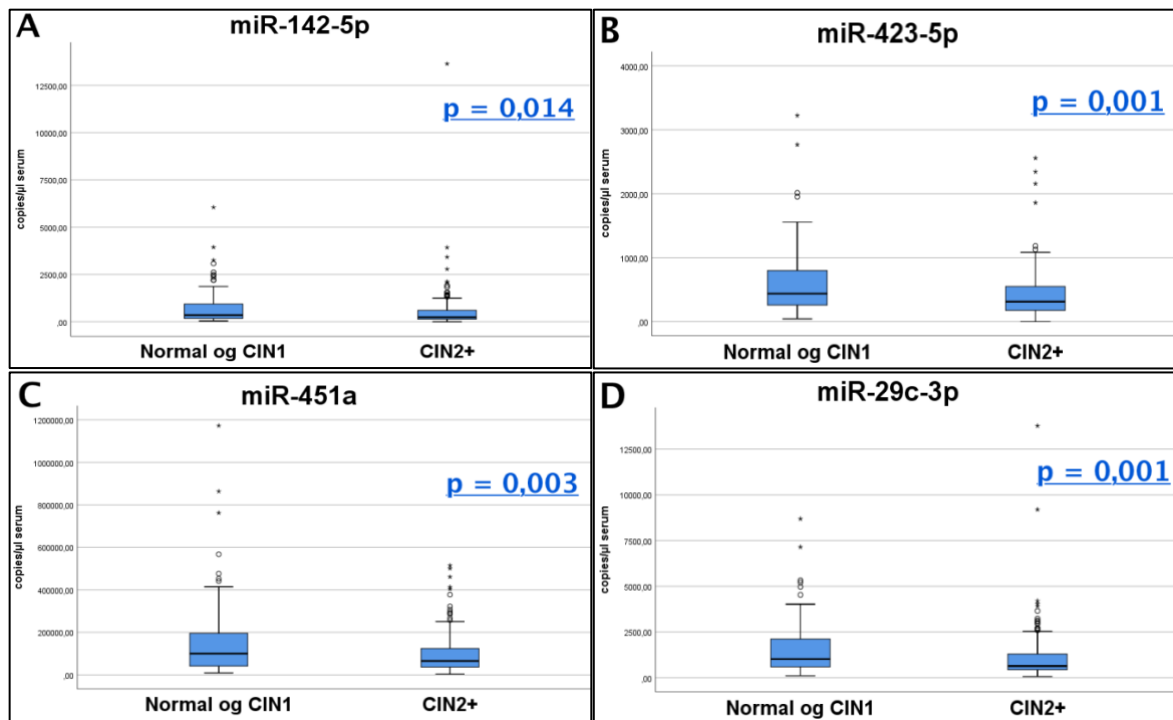
All statistikk ble utført i SPSS. Figur 12A-D viser at konsentrasjonen (kopier/ $\mu$ l serum) av alle de 4 undersøkte miRNA synker med økende alvorlighetsgrad av celleforandringer i livmorhalsen. Denne nedreguleringen var signifikant for både miR-142-5p ( $p = 0.020$ ), miR-423-5p ( $p = 0.008$ ) og miR-29c-3p ( $p = 0.024$ ) i en Kruskal-Wallis analyse, mens den var rett under 95 % signifikansnivå for miR-451a ( $p = 0.078$ ). Selve boksen i boksplottene representerer 50 % av prøvene i den aktuelle gruppen, og streken inne i boksen markerer medianverdi. Streken over og under boksen markerer den laveste og høyeste verdien i gruppen. Sirklene og stjernene over boksene indikerer henholdsvis uteliggere og ekstreme uteliggere.



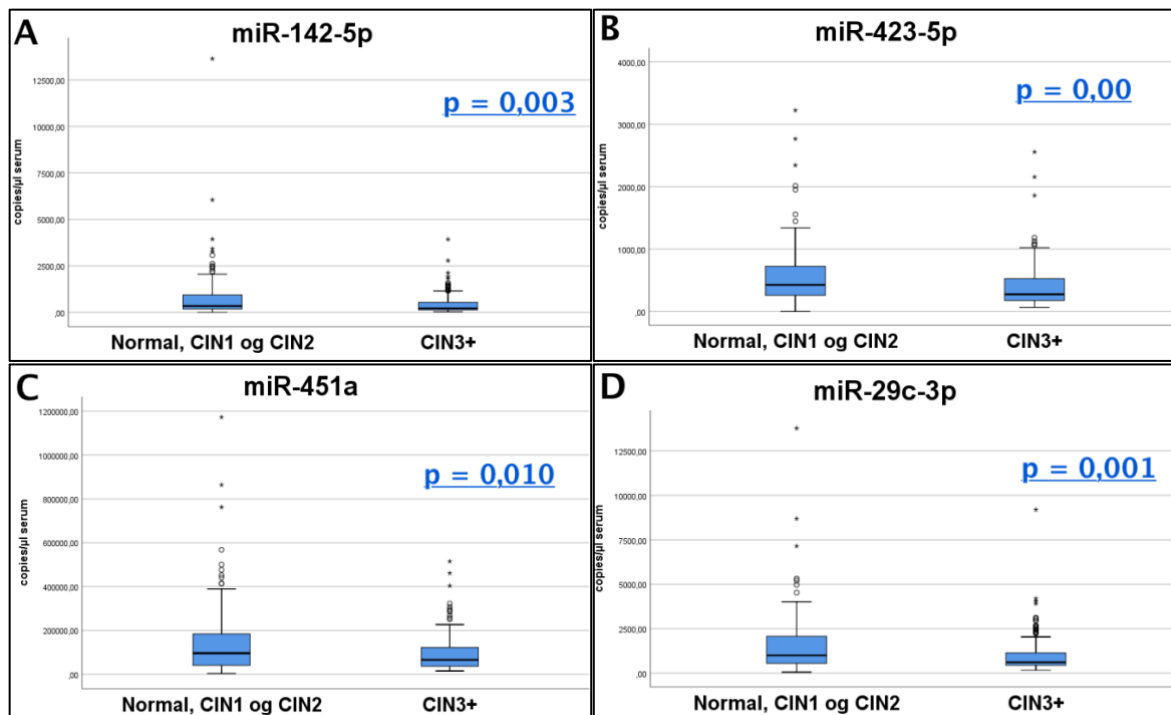
**Figur 12. Konsentrasjon av sirkulerende miRNA i ulike histologiske grupper. A)** miR-142-5p, **B)** miR-423-5p, **C)** miR-451a og **D)** miR-29c-3p. For miR-142-5p, miR-423-5p og miR-451a vises p-verdi for grupper som er parvis signifikante. (\*) ukorrigert signifikansnivå på 0.05. (\*\*) korrigert Bonferroni signifikansnivå på 0.0033 (\*\*).

For alle fire miRNA typene ble det funnet signifikante forskjeller mellom kvinner med CIN2+ og kvinner med CIN1 eller normalhistologi, og mellom kvinner med CIN3+ og kvinner med CIN2, CIN1 eller normalhistologi, i Mann-Whitney U analyser. Tilhørende boksploott (Figur 13A-D, og 14A-D) viser at nivået av alle fire miRNA typer er signifikant lavere i gruppen med CIN2+ og CIN3+.



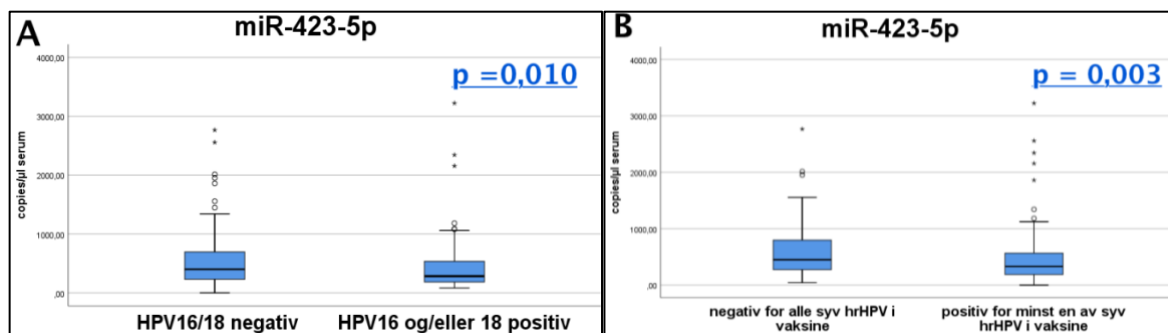


**Figur 13. Konsentrasjon av de ulike typene sirkulerende miRNA for kvinner diagnostisert med CIN2+ sammenlignet med kvinner diagnostisert med CIN1 eller normal histologi prøve. A) miR-142-5p. B) miR-423-5p. C) miR-451a. D) miR-29c-3p. P-verdier generert ved Mann-Whitney U testing er oppgitt i blått for de ulike typene miRNA.**



**Figur 14. Konsentrasjon av de ulike typene sirkulerende miRNA for kvinner diagnostisert med CIN3+ sammenliknet med kvinner diagnostisert med CIN1/2 eller normal histologi prøve. A) miR-142-5p. B) miR-423-5p. C) miR-451a. D) miR-29c-3p. P-verdier generert ved Mann-Whitney U testing er oppgitt for de ulike typene miRNA.**

Blant alle kvinner i kohorten var konsentrasjonen av miR-423-5p signifikant lavere ( $p = 0.010$ ) i gruppen av kvinner der HPV16/18 typer var påvist i livmorhalsen, i forhold til kvinnene der disse to typene ikke var påvist (Figur 15A). Mengde miR-423-5p var også signifikant lavere hos kvinner der minst en av de syv mest karsinogene hrHPV typene inkludert i den nivalente vaksinen Gardasil 9, var påvist i deres livmorhalsprøver ( $p = 0.003$ ) enn hos kvinnene der ingen av disse typene var påvist (Figur 15B). Det var ingen signifikante funn for de tre andre miRNA typene.

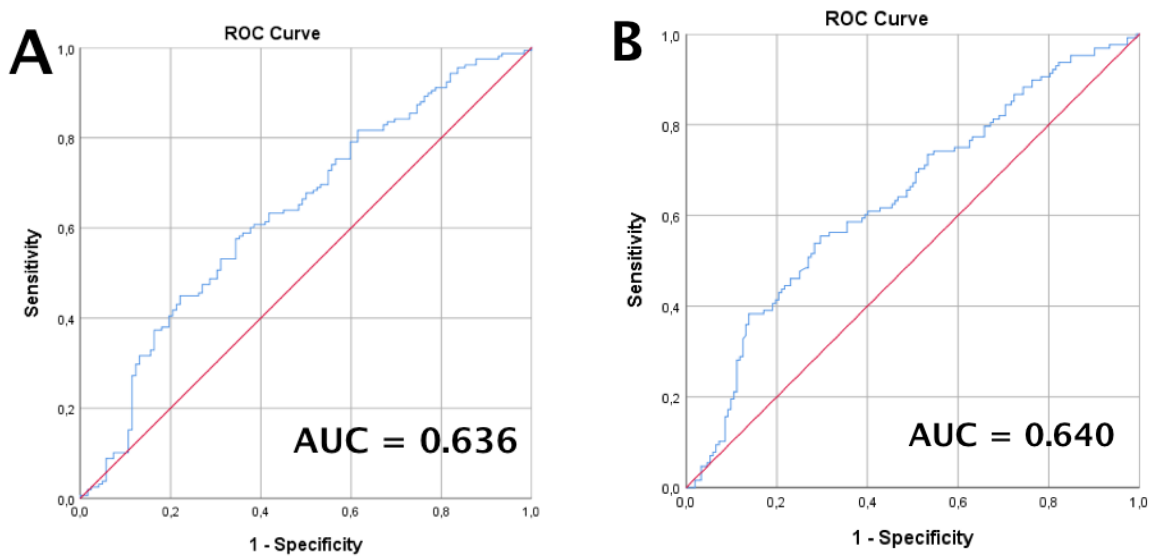


**Figur 15. Konsentrasjonen av miR-423-5p i ulike grupper. A)** Konsentrasjon av miR-423-5p hos kvinner som testet positivt på HPV16 eller HPV18 sammenliknet med de som testet negativt. **B)** Konsentrasjon av miR-423-5p hos kvinner som testet positivt på minst en av de syv hrHPV typene i vaksinen sammenliknet med de som testet negativt. P-verdier er oppgitt for de ulike typene miRNA.

Blant kvinner med CIN2+ var konsentrasjonen av miR-423-5p signifikant lavere ( $p = 0.046$ ) i gruppen av kvinner der minst en av de syv mest karsinogene typene inkludert i vaksinen var påvist i livmorhalsen, i forhold til kvinner der ingen av typene var påvist. Ellers var det ingen andre signifikante funn for noen av miRNA typene blant kvinner med CIN2+, CIN3+, CIN1 eller normalhistologi, sortert på HPV type påvist i livmorhalsprøvene.

#### 4.3.1 ROC-kurve

ROC kurver ble generert for å vurdere de ulike miRNA typene, enten enkeltvis eller i kombinasjoner, sine evner til å diskriminere kvinner med CIN2+ eller CIN3+ fra kvinner med lavgradige eller ingen lesjoner i livmorhalsen. Alle typene sirkulerende miRNA gav svake AUC verdier (under 0.7) både enkeltvis og i kombinasjoner. For CIN2+ varierte AUC (Area Under Curve) for de enkelte miRNA typene mellom 0.586 og 0.621, for henholdsvis miR-142-5p og miR-423-5p. Høyest verdi for AUC, på 0.636 (95 % konfidensintervall (KI): 0.570 – 0.701), for CIN2+ ble generert ved en kombinasjon av miR-142-5p, miR-423-5p og miR-29c-3p, som vist i Figur 16A. For CIN3+ varierte AUC for de enkelte miRNA typene mellom 0.590 og 0.632, for henholdsvis miR-451a og miR-423-5p. Høyest verdi for AUC, på 0.64 (95 % KI: 0.575 – 0.705), for CIN3+ ble generert ved en kombinasjon av miR-423-5p og miR-29c-3p, som vist i Figur 16B.



**Figur 16. ROC kurve generert for ulike kombinasjoner av miRNA. A)** ROC kurve generert for kvinner med CIN2+ ved en kombinasjon av miR-142-5p, miR-423-5p og miR-29c-3p. **B)** ROC kurve generert for kvinner med CIN3+ ved en kombinasjon av miR-423-5p og miR-29c-3p. Kurvene viser potensialet kombinasjonene av miRNA har til å diskriminere mellom ulike histologiske grupper.

## 5 Diskusjon

I denne studien ble mengden av sirkulerende miR-142-5p, miR-423-5p, miR-451a og miR-29c-3p målt ved ddPCR i serum fra kvinner med ulike lesjonsgrader i livmorhalsen. Friske kvinner med normalhistologi ble benyttet som kontroller. Resultatene viser at konsentrasjonen (kopier/ $\mu$ l serum) av alle de fire undersøkte sirkulerende miRNA typene var omvendt assosiert med alvorlighetsgrad av celleforandringer i livmorhalsen. Nedreguleringen var signifikant for miR-142-5p, miR-423-5p og miR-29c-3p, men ikke for miR-451a selv om resultatene indikerte en klar trend blant histologigruppene. Ved å slå sammen pasientgrupper var konsentrasjonen av alle fire miRNA typene, også miR-451a, signifikant lavere hos kvinner med CIN2+ i forhold til kvinner med CIN1 eller normalhistologi, og signifikant lavere hos kvinner med CIN3+ i forhold til kvinner med CIN2, CIN1 eller normalhistologi.

Flere typer miRNA er funnet signifikant opp- eller nedregulert både i kvinner med livmorhalskreft, og med forstadier til livmorhalskreft. De fleste publiserte studier er basert på kvantifisering av miRNA i vev fremfor sirkulerende i serum eller plasma. Eksempelvis er både miR-100 og miR-218 funnet signifikant nedregulert i vev fra kvinner med livmorhalskreft, via en gradvis reduksjon fra lavgradige og høygradige celleforandringer i forstadiene til livmorhalskreft [48, 49]. Undersøkelse av miRNA konsentrasjon i serum eller plasma er en ikke-invasiv profileringsmetode som nylig har fått mye oppmerksomhet. Flere sirkulerende miRNA typer har blitt foreslått som potensielle prediktive biomarkører i ulike krefttyper som brystkreft [58] og tykktarmkreft [59], men også i utviklingen av livmorhalskreft med forstadier. Eksempelvis er miR-21, miR-29a, miR-25 og miR-486-5p funnet gradvis oppregulert i serum fra pasienter med livmorhalskreft. De ble også funnet oppregulert hos kvinner med forstadier, men det fremgår ikke hvor mange kvinner dette gjaldt eller hvilke CIN stadier kvinnene var diagnostisert med [51]. Ingen av de sirkulerende miRNA typene som ble funnet i denne studien er blant de som ble selektert etter pre-screening i vår studie. I vår kohort var det få prøver fra kvinner med livmorhalskreft, slik at de fire utvalgte miRNA typene hovedsakelig stammet fra en screening av miRNA hos kvinner med ulike grader av forstadier til kreft. Samtidig er andre typer sirkulerende miRNA som miR-30d-5p og let-7d-3p funnet signifikant nedregulert i eksosomer ekstrahert fra plasma hos kvinner diagnostisert med CIN2+ [52]. Disse miRNA typene ble heller ikke selektert i vår studie, men det er vist tidligere at sammensetning av miRNA kan variere mellom serum og plasmaprøver [60]. Det har også blitt observert ulikt nivå av plasma miRNA og eksosom miRNA hos kreftpasienter, i motsetning til hos friske individer

[61]. Selv om flere av de publiserte studiene motstrider hverandre, er det tydelig at det finnes en assosiasjon mellom sirkulerende miRNA og utviklingen av livmorhalskreft. Ulikheter i de rapporterte resultatene skyldes antageligvis både ulike prøvematerialer (serum/plasma/eksosomer) og screeningsmetoder (NGS (Next Generation Sequencing)/PCR basert panel). For å finne ut om sirkulerende miRNA har potensiale biomarkør i utviklingen av livmorhalskreft kreves det derfor ytterligere forskning.

Basert på pre-screeningen med serum/plasma Focus Panel ble miR-142-5p, miR-423-5p, miR-451a og miR-29c-3p selektert grunnet høy signifikans. Screeningen genererte flere aktuelle kandidater, men grunnet begrenset tid, begrenset holdbarhet av cDNA, og et stort prøvesett med mange prøver som skulle kjøres parallelt på de ulike miRNA typene samme dag, ble det valgt å fokusere på de fire mest signifikante miRNA typene i denne studien. Våre funn med ddPCR kvantifisering på hele kohorten bekreftet funnene fra screeningen, og indikerer at fokus-panelet er egnet til å identifisere gode miRNA kandidater i kreftsammenheng, også blant kvinner med forstadier til kreft. Et flertall andre studier benytter NGS baserte metoder til screening av miRNA, hvor alle miRNA typer tilstede i en prøve sekvenseres, og signifikante typer selekteres blant disse. Med NGS basert screening unngår man å selektere miRNA typene som skal undersøkes på forhånd som i en panelbasert screening. Til gjengjeld kan NGS teknologi introdusere ulike bias i linearitet og kvantifisering av hvert enkelt miRNA ved ulike trinn i metoden, som eksempelvis ved ligering av adaptere eller amplifikasjon av sekvensbiblioteker [62, 63]. Dette unngås i panelbaserte screeninger der spesifikke PCR reaksjoner for hvert miRNA kjøres hver for seg i separate brønner. I fremtidige studier kunne det vært interessant å undersøke om flere typer sirkulerende miRNA enn de inkludert i serum/plasma fokus-panelet, som eksempelvis miR-1290 [38], hadde blitt identifisert som like eller mer signifikant enn disse fire selekterte, i en sekvenseringsbasert screeningsmetode på vår kohort. Med unntak av miR-1290, er alle sirkulerende miRNA typer funnet hos pasienter med forstadier til livmorhalskreft [51, 52], blant de typene som finnes i serum/plasma fokus-panelet vi har brukt, og det er derfor usikkert om en annen pre-screeningsstrategi hadde gitt andre resultater. Det har også blitt vist at noen typer HPV koder for sitt eget miRNA, og på denne måten kan regulere sitt virale genuttrykk. Det har dermed blitt foreslått at viralt miRNA vil kunne spille en rolle i virusinfeksjon og karsinogenese [64, 65]. Som en eventuell biomarkør vil HPV-kodet miRNA likevel være vanskeligere å standardisere da disse er sekvensspesifikke for hver HPV type, og derfor vil variere grad av genuttrykk etter hvilke typer HPV som gir høygradig lesjon hos hver enkelt kvinne. I denne studien har vi derfor valgt å fokusere på miRNA kodet av vertscellen,

men HPV-kodet miRNA kunne vært interessant å undersøke i denne populasjonen, da det er blitt utført genotyping av HPV typene i livmorhalsprøvene til alle kvinnene inkludert i studien.

MiR-423-5p, miR-142-5p og miR-451a har blitt rapportert som både oppregulert og nedregulert i ulike krefttyper, som indikerer at de kan fungere som både onkogener og tumor-suppressorer i kreftutvikling avhengig av krefttype. MiR-29c-3p er derimot tidligere kun rapportert som nedregulert i kreft. I denne studien var miR-423-5p den typen sirkulerende miRNA som ble funnet med høyest signifikans i serum fra kvinner med alvorlige forstadier til livmorhalskreft og livmorhalskreft. Tidligere har unormalt uttrykk av miR-423-5p blitt observert i flere ulike krefttyper. I pasienter med eggstokkreft ble miR-423-5p funnet nedregulert i både vev og plasmaprøver, der uttrykk av miR-423-5p var omvendt korrelert med progresjonen av eggstokkreft, og nedreguleringen var aller høyest hos kvinner med metastaser [66]. Også hos pasienter med tykktarmkreft, inkludert de med kreft på et tidlig stadium, er nivået av miR-423-5p i plasma funnet å være lavere enn hos friske kontroller. I samme studie ble det observert økt plasmakonsentrasjon av miR-423-5p i pasienter som viste klinisk forbedring etter gjennomgått operasjon [59]. I andre krefttyper har miR-423-5p vist å ha en motsatt rolle, altså være assosiert med kreftutvikling. I vev fra pasienter med gliomer (hjernesvulster) og magekreft er miR-423-5p funnet oppregulert via henholdsvis regulering av tumor-suppressorene ING-4 og TFF1 [67, 68]. Det er tidligere kun rapportert om én studie som har sett på uttrykk av miR-423-5p i forbindelse med utvikling av livmorhalskreft. Denne studien viste at uttrykket av miR-423-5p var nedregulert i både livmorhalskarsinom deriverte cellelinjer og vev fra indiske kvinner med livmorhalskreft eller forstadier til livmorhalskreft [69]. Dette er i tråd med våre funn i serumprøver. MiR-423-5p var den typen miRNA i vår studie som alene viste størst AUC verdi i ROC analyse, og dermed best skilte kvinner med alvorlige forstadier til kreft fra de andre kvinnene. MiR-423-5p var også den eneste miRNA typen som var signifikant nedregulert hos kvinner infisert med en eller flere av de mest karsinogene HPV typene. Dette kan tyde på at nedregulering av miR-423-5p i høyere grad er assosiert med kreftutvikling enn de andre undersøkte typene sirkulerende miRNA i vår studie.

Den nest mest signifikante miRNA identifisert i vår studie var miR-29c-3p, som er en tumor-suppressor miRNA funnet nedregulert i flere krefttyper [70, 71]. Eksempelvis er miR-29c-3p funnet nedregulert i vev fra pasienter med tykktarmkreft og leverkreft via interaksjon med henholdsvis det onkogene proteinet SPARC (secreted protein acidic, rich in cysteine) og DNMT3B (DNA methyltransferase 3B) [72, 73]. Ingen studier er gjort på miR-29c-3p og

livmorhalskreftutvikling. Til gjengjeld er miR-29c-3p vist å være nedregulert i kreftvev fra pasienter med hode- og nakkekraft. Dette er en kreftsykdom som kan være HPV-relatert, men i den studien ble det ikke rapportert om kreftpasientenes HPV status. Genuttrykk av miR-29c-3p ble funnet negativt assosiert med alvorlighetsgrad av svulst, og nedregulert nivå av miR-29c-3p i histologisk normalt vev ble assosiert med dårligere prognose [74]. Etersom HPV status blant pasientene i denne hode- og nakkekraftstudien var ukjent, kan det derfor ikke utelukkes at den prognostiske verdien av nedregulering av miR-29c-3p er ulik for HPV positive og HPV negative hode- og nakkekrafttilfeller.

For miR-142-5p, finnes det flere studier som har rapportert assosiasjonen mellom dets uttrykk og kreft. Eksempelvis er miR-142-5p funnet signifikant nedregulert i vev fra pasienter med ikke-småcellet lungekreft via regulering av PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha), som er en kjent onkogen komponent i PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) signalvei [75]. På en annen side er miR-142-5p funnet signifikant oppregulert i vev fra pasienter med brystkreft via regulering av tumor-suppressoren PTEN (phosphatase and tensin homolog) [76]. MiR-142-5p har også tidligere blitt assosiert med utvikling av livmorhalskreft. En studie viste at miR-142-5p var nedregulert i livmorhalskarsinom deriverte cellelinjer sammenlignet med normale epitelceller dissekert fra livmorhalsen [77]. Pereira et al. [78] demonstrerte et unormalt uttrykk av miR-142-5p i livmorhalskarsinom deriverte cellelinjer og vev fra pasienter med livmorhalskreft og forstadier til livmorhalskreft. Det ble vist at nivå av miR-142-5p var nedregulert i overgangen fra normal livmorhals til lavgradige og høygradige celleforandringer, og oppregulert i overgangen fra høygradige celleforandringer til kreft i livmorhalsen. Nedreguleringen i vevsprøver med CIN1-3 antydte at miR-142-5p kunne spille en viktig rolle i unormal transformasjon av livmorhalsceller ved HPV infeksjon. Samtidig var uttrykket tilnærmet likt i kreftprøver og normale livmorhalsprøver slik at det ble antydte at miR-142-5p ikke var direkte involvert i utviklingen til ondartet tilstand. Deler av resultatene funnet av denne gruppen er i tråd med resultatene i vår studie, da nivå av miR-142-5p ble funnet negativt assosiert med graden av celleforandringer i livmorhalsen i begge studier. På en annen side ble nivå av miR-142-5p undersøkt i serumprøver fra kun tre kreftpasienter i vår studie, alle med et tidlig kreftstadium, og er dermed ikke sammenlignbare med resultatene generert fra kreftpasientene i den andre studien. Selv om mengde sirkulerende miR-142-5p i snitt var lavere hos disse tre kvinnene enn hos kvinner med CIN3/ACIS, trengs det undersøkelse av flere kvinner med kreft for å ytterligere evaluere dets genuttrykk i denne diagnosen.



I vår studie var miR-451a kun signifikant nedregulert i gruppene av kvinnene med CIN2+ eller CIN3+. MiR-451a har tidligere blitt assosiert både positivt og negativt med flere krefttyper. I vev fra pasienter med kreft i nedre svelg og nyrecellekreft er miR-451a funnet nedregulert via interaksjon med henholdsvis onkogenet ESDN/DCBLD2 (endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin-like molecule) og PMM2 (phosphomannomutase 2) [79, 80]. På en annen side er miR-451a funnet oppregulert i vev fra pasienter med HPV-relatert analkreft, mulig via interaksjon med proteinene CDKN2B og BAK1 som normalt regulerer cellyklus [81]. Flere studier har også tidligere vist en assosiasjon mellom miR-451a og livmorhalskreft, men også her er de rapporterte resultatene motstridende. En studie utførte dataanalyser med søk i GEO (Gene Expression Omnibus) databasen og fant nedregulert uttrykk av miR-451a i kvinner med livmorhalskreft ved regulering PI3K-Akt signalvei og EREG [82], mens en annen studie fant miR-451a oppregulert i livmorhalskarsinom deriverte cellelinjer og vev fra pasienter med livmorhalskreft [83]. Også i slimprøver fra livmorhalsen til kvinner med livmorhalskreft eller forstadier til livmorhalskreft ble miR-451a funnet oppregulert. Oppreguleringen var korrelert med alvorlighetsgrad av forstadier og med høyest nivå i pasienter med ACIS og kreft. MiR-451a ble dermed foreslått som en lovende biomarkør for oppdagelse av både forstadier til kreft, ACIS og kreft [84]. Disse resultatene strider imot våre funn. Riktignok kan ikke verdiene på ACIS og kreft sammenlignes med våre grunnet det lave antallet undersøkte kvinner med ACIS og kreft. I tillegg er det benyttet ulike prøvetyper i denne studien i forhold til vår. Samtidig er miR-451a den miRNA typen i vår studie som ikke ble funnet signifikant negativt assosiert med lesjonsgrad når alle histologiske grupper ble vurdert. Den hadde også lavest diskrimineringsverdi i ROC analysene, slik at dets potensiale som biomarkør fra serumprøver hos kvinner med forstadier til kreft og kreft i livmorhalsen i denne studien ikke er like lovende.

Resultater generert i denne studien viser både likheter og avvik fra det som tidligere er rapportert. Forskjeller i forsøksoppsett og prøvemateriale gjør det vanskelig å sammenligne funnene i denne studien med tidligere studier. De fleste studiene kvantifiserer miRNA i vev eller cellelinjer fremfor i serum eller plasma. Ved bruk av vev eller celleprøver vil cellesammensetningen variere, da det kan medfølge celler som ikke er infisert med HPV og ekstracellulært materiale. Sirkulerende miRNA i serum er enklere å standardisere og medfører færre faktorer som kan påvirke analyseresultatet. Til gjengjeld er serum eller plasma følsom for hemolyse som kan gi feilaktige resultater. Kirschner et al. [55] viste at nivå av flere tidligere foreslåtte biomarkører ble påvirket av hemolyse. I studien ble 136 typer miRNA detektert i

serum, og blant disse var det kun 11 som ikke viste nivåforskjell ved hemolyse. Blant de fire kandidat miRNA typene undersøkt i vår studie, viste gruppen at nivå av miR-451a var en av de mest påvirkelige, men at også nivå av miR-29c-3p kunne påvirkes til en viss grad. Samtidig ble det vist at miR-142-5p var upåvirket av hemolyse, og at miR-423-5p verken var blant dem som var mest eller minst påvirket av miRNA typene undersøkt. Pizzamiglio et al. [85] observerte også at miR-451a i høy grad påvirkes av hemolyse. Det bør derfor vurderes om denne typen miRNA ikke er like godt egnet som biomarkør, da en eventuell nedregulering som følge av karsinogenese vil kunne maskeres grunnet påvirkning av hemolysegrad. I vår studie ble miR-451a funnet signifikant nedregulert hos kvinner med alvorlig cervikale lesjoner, noe som tyder på at hemolyse hos disse ikke har påvirket kvantifiseringen. Dersom miR-451a skulle blitt brukt som en eventuell biomarkør fra serum/plasma prøver vil det likevel kreves gode prosedyrer for prøvebehandling. I vår studie gikk alle prøver gjennom en hemolysekontroll, slik at hemolyserte prøver kunne ekskluderes før validering. Samtidig benyttes miR-451a etter produsentens anbefalinger også i selve hemolysekontrollen, slik at dersom nivået påvirkes av karsinogenese, vil dette igjen kunne påvirke resultatene generert i hemolysekontrollen. Ved fremtidige studier bør det derfor vurderes om en annen type miRNA, som ikke påvirkes av karsinogenese i like stor grad, kan benyttes som hemolysekontroll.

Blant studier som har undersøkt sammenheng mellom miRNA nivå i vev og serum eller plasma fra samme pasienter er eksempelvis Wang et al. [86] som viste at ulike typer miRNA var like mye opp- eller nedregulert i både serum og vev fra brystkreftpasienter. I pasienter med livmorhalskreft og forstadier til livmorhalskreft demonstrerte henholdsvis Chen et al. [50] og Zheng et al. [52] at nivå av ulike typer miRNA i serum og plasma også korrelerte med nivå i vev. Den eneste gruppen som har sett på uttrykket av en av de undersøkte miRNA typene i denne studien, miR-423-5p, i både vev og plasma er Tang et al. [66]. Gruppen viste at miR-423-5p var nedregulert i pasienter med eggstokkreft i forhold til friske individer, uavhengig av prøvemateriale. For å ytterligere knytte resultatene i vår studie opp mot tidligere studier må det undersøkes om nivå av miR-423-5p, miR-29c-3p, miR-142-5p og miR-451a i pasienter med livmorhalskreft og forstadier til livmorhalskreft er konsistent i livmorhalsprøver og serum/plasma, i tillegg til hvilke mål-mRNA sekvenser disse har i livmorhalsprøvene.

En annen faktor som kan påvirke analyseresultatet er valg av kvantifiseringsmetode. For utenom Zheng et al. [52] har alle omtalte studier utført kvantifisering av miRNA, både sirkulerende og ikke, med qRT-PCR. Selv om metoden er vist tilstrekkelig for dette formålet,

er det rapportert at kvantifisering med ddPCR gir en mer nøyaktig og reproducerbar kvantifisering, og dermed et bedre diagnostisk potensial sammenlignet med qRT-PCR [31, 87].

ROC kurver med en AUC verdi under 0.7 er ansett som svake til å diskriminere mellom testede grupper [88]. AUC verdiene generert i ROC analyser i denne studien er dermed for lave til å sikkert kunne diskriminere kvinner med CIN2+ fra kvinner med CIN1 og normalhistologi, og til å diskriminere kvinner med CIN3+ fra kvinner med CIN2, CIN1 og normalhistologi. Dette kan begrunnes med et visst antall prøver med uteliggende verdier som trekker sensitiviteten og spesifisiteten ned, spesielt i CIN2 gruppen hvor det forelå en prøve med unormalt høye verdier av alle de undersøkte typene sirkulerende miRNA. Våre resultater indikerer helt klart en trend, men det trengs ytterligere studier med nye kohorter for å undersøke de fire ulike typene miRNA sin diskrimineringssevne i større grad. I flere av de omtalte studiene har det blitt generert ROC kurver med betraktelig høyere AUC verdier, men disse er i hovedsak basert på ulike typer miRNA som kan diskriminere mellom kvinner med livmorhalskreft og friske kvinner [38, 50, 51], fremfor mellom kvinner med ulike forstadier til livmorhalskreft. Gruppen kvinner med forstadier til livmorhalskreft er uensartet. Eksempelvis vil de fleste kvinner med CIN1 lesjoner aldri videreutvikle kreft. Zheng et al. [52], som i sin studie så på eksosomalt plasma miRNA hos kvinner med forstadier til livmorhalskreft, genererte ROC kurver med svært høye AUC verdier. Det ble dermed foreslått at miR-30d-5p og let-7d-3p i høy grad kunne diskriminere kvinner med CIN2+ fra kvinner med CIN1 og normalhistologi, både enkeltvis og i kombinasjon. Denne studien ble publisert etter at vår studie ble startet, og det kvantifiseres miRNA i eksosomer fremfor i plasma eller serum. I vår pre-screening ble ikke miR-30d-5p og let-7d-3p funnet signifikant forskjellig hos kvinner med CIN3+ i forhold til kvinner med lavere histologigrad. Likevel kunne det vært aktuelt å undersøke disse to typene miRNA i vår kohort, siden pre-screeningen var utført på et begrenset antall kvinner. Da kunne det blitt vurdert om disse også kan brukes som serum biomarkører i tillegg til eksosmale biomarkører, da eksosom ekstraksjon krever laboratorieekspertise.

Forsøksoppsettet i studien hadde noen svakheter. Antall tilfeller av ACIS og kreft i kohorten var såpass lavt at det er vanskelig å knytte nedreguleringen av miRNA typene i forstadiene (CIN1-3) opp mot kvinner med disse diagnosene, selv om resultatene indikerer at konsentrasjonen fortsetter å synke for alle fire typene miRNA undersøkt. Ytterligere studier av en kohort som inneholder flere kvinner med kreft og ACIS hadde vært interessant for å undersøke om konsentrasjonen av de ulike miRNA typene faktisk fortsetter å synke i disse

diagnosene, og om nedreguleringen er signifikant. I tillegg kunne det blitt undersøkt om de ulike typene miRNA kan fungere som biomarkører for tidlig oppdagelse av kvinner med ACIS, da denne typen lesjon er vanskelig å oppdage ved cytologi screening [84]. En annen svakhet er pre-analytiske forhold vi ikke hadde kontroll over.

Resultatene i vår studie viser at miR-423-5p, miR-29c-3p, miR-142-5p og til en viss grad miR-451a, har en negativ assosiasjon med histologigrad i livmorhalsen, og dermed et potensial til å fungere som biomarkører for identifisering og prognose av kvinner med ulike grader av lesjoner i livmorhalsen. Det trengs mer forskning for å avdekke de fire typene sirkulerende miRNA sine mål-mRNA sekvenser hos HPV smittede kvinner, og deres rolle i utviklingen av forstadiene til livmorhalskreft og livmorhalskreft. Blant kvinner med CIN1 eller normalhistologi ble det ikke funnet en signifikant nivåforskjell av de fire sirkulerende miRNA typene mellom kvinner som var infisert av en av de mest karsinogene HPV typene, og de som ikke var det. Dette tyder på at genuttrykket av miRNA i disse kvinnene ikke påvirkes noe mer av HPV-infeksjoner forårsaket av en av de mest karsinogene HPV typene, enn andre HPV-infeksjoner eller HPV-negative. Signifikant nivåforskjell av de fire sirkulerende miRNA typene ble først observert hos kvinner med CIN2+, hvor infeksjonen har gått over fra å være produktiv til å bli en transformerende infeksjon.

For å undersøke om det finnes en verdi av miRNA innenfor en histologisk gruppe som kan skille virusinfeksjoner som videreutvikles fra de som går i regress trengs longitudinelle studier som følger kvinnene over lengre perioder. En slik verdi er av spesiell interesse for kvinner diagnostisert med CIN1, i forhold til hvor tett oppfølgingsløp de trenger, samt kvinner med CIN2 eller CIN3. Disse skal etter dagens retningslinjer gjennomgå konisering, som i mange tilfeller er unødvendig da virusinfeksjonen går i regress. På grunn av bivirkningene koniseringen kan medføre hos kvinner i fertil alder, blir ikke alltid yngre kvinner diagnostisert med CIN2 konisert. Noen yngre kvinner med CIN2 lesjon følges heller tett opp, og en oppfølgingskohort med disse kvinnene ville vært verdifull for å vurdere de identifiserte serum miRNA typene i denne studien sin evne til å predikere progresjon. For å undersøke om det finnes nivåer av de ulike miRNA typene allerede hos kvinner med CIN1 som kan predikere fremtidig utfall, kreves en oppfølgingskohort med prøver fra mange flere kvinner med CIN1 lesjon, da de aller fleste av disse ikke vil videreutvikles til høygradige lesjoner og kreft. Det hadde også vært interessant å undersøke om det fantes en verdi av miRNA som kunne skille

kvinner som får tilbakefall fra de som forblir friske etter første konisering. Dette krever også longitudinelle studier av kvinner og ytterligere forskning.

## 6 Konklusjon

Resultatene i vår studie viser at sirkulerende miR-423-5p, miR-29c-3p, miR-142-5p og til en viss grad miR-451a i serum, har en negativ assosiasjon med histologigrad i livmorhalsen. Funnene var mest signifikant for miR-423-5p, og minst signifikant for miR-451a som kun var signifikant nedregulert hos gruppen av kvinner med CIN2+ eller CIN3+. AUC verdiene generert i ROC analysene kunne ikke sikkert skille kvinner med CIN2+ eller CIN3+, fra kvinner med lavgradige eller ingen lesjoner. De ulike typene sirkulerende miRNA sitt potensiale som biomarkører for å identifisere kvinner med CIN2+ og CIN3+ er derfor begrenset. Blant kvinner med CIN2/CIN3/ACIS finnes det likevel noen kvinner med HPV infeksjoner som vil videreutvikles til kreft, og noen med HPV infeksjoner som vil gå i regress. Det kan derfor ikke utelukkes at kvinnene med de høyeste nivåene av de fire miRNA typene gjenspeilte kvinner med CIN2 og CIN3 lesjoner som ikke ville videreutvikles. For å videre undersøke potensialet de fire typene sirkulerende miRNA har som biomarkører for prognose av kvinner med CIN2+, trengs derfor ytterligere data fra longitudinelle pasientkohorter, samt flere livmorhalskreftpasienter.

## 7 Referanser

1. Schiffman, M., et al., *Carcinogenic human papillomavirus infection*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16086.
2. de Villiers, E.-M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
3. Doorbar, J., et al., *Human papillomavirus molecular biology and disease association*. Rev Med Virol, 2015. **25 Suppl 1**: p. 2-23.
4. Lee, S.M., et al., *Risk of vertical transmission of human papillomavirus throughout pregnancy: a prospective study*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66368.
5. Egawa, N., et al., *Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia*. Viruses, 2015. **7**(7): p. 3863-3890.
6. Polterauer, S., et al., *Cervical Adenocarcinoma in Situ: Update and Management*. Current Obstetrics and Gynecology Reports, 2013. **2**(2): p. 86-93.
7. Ault, K.A., *Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections in the female genital tract*. Infectious diseases in obstetrics and gynecology, 2006. **2006 Suppl**: p. 40470-40470.
8. Seoud, M., W.A. Tjalma, and V. Ronsse, *Cervical adenocarcinoma: moving towards better prevention*. Vaccine, 2011. **29**(49): p. 9148-9158.
9. Gonzalez-Quintana, V., et al., *MicroRNAs are involved in cervical cancer development, progression, clinical outcome and improvement treatment response (Review)*. Oncol Rep, 2016. **35**(1): p. 3-12.
10. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus testing in the prevention of cervical cancer*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(5): p. 368-83.
11. Folkehelseinstituttet. *HPV - Humant papillomavirus*. 2016. [lest 05.02.19]; Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/sv/vaksine/hpv/hpv-og-hpv-vaksine/hpv/>
12. Krefregisteret. *Livmorhalskreft*. 2018. [lest 09.04.19]; Tilgjengelig fra: <https://www.krefregisteret.no/Generelt/Fakta-om-kreft/Livmorhalskreft/>.
13. Krefregisteret. *Fordeler og ulemper ved screening*. 2018. [lest 16.04.19]; Tilgjengelig fra: <https://www.krefregisteret.no/screening/livmorhalsprogrammet/ofte-stilte-sporsmal1/Fordeler-og-ulemper-ved-screening1/>.
14. Krefregisteret. *God effekt av HPV-vaksinen*. 2016. [lest 16.04.19]; Tilgjengelig fra: <https://www.krefregisteret.no/Generelt/Nyheter/hpv-oppsummert/>.
15. Krefregisteret. *Livmorhalskreft, behandling og oppfølging*. [lest 04.04.19]; Tilgjengelig fra: <https://www.krefregisteret.no/screening/livmorhalsprogrammet/Vaksine/Livmorhalskreft/>.
16. Krefregisteret. *Cytologi*. 2017. [lest 04.04.19]; Tilgjengelig fra: <https://www.krefregisteret.no/screening/livmorhalsprogrammet/Helsepersonell/Faglig-Radgivningsgruppe/kvalitetsmanual2/8.-klassifikasjon-cytologi-histologi-og-hpv-tester/cytologi/>.
17. Krefregisteret. *Masseundersøkelse mot livmorhalskreft*. [lest 04.04.19]; Tilgjengelig fra: <https://www.krefregisteret.no/globalassets/masseundersokelsen-mot-livmorhalskreft/flytdiagram/flytskjema.pdf>.
18. Pedersen, K., Lönnberg, S., Skare, G. B., Sørbye, S. W., Burger, E. & Kristiansen, I. S., *Kostnader ved Masseundersøkelsen mot livmorhalskreft*. Sykepleien Forskning, 2015. **62-71**.
19. Krefregisteret. *Livmorhalsprogrammet*. 2017. [lest 09.04.19]; Tilgjengelig fra: <https://www.krefregisteret.no/screening/livmorhalsprogrammet/Helsepersonell/Faglig-Radgivningsgruppe/kvalitetsmanual2/1.-livmorhalsprogrammet/#1.1Historikk>.

20. Helsedirektoratet. *HPV-test i primærscreening mot livmorhalskreft*. 2013. [lest 09.04.19]; Tilgjengelig fra: [https://helsedirektoratet.no/Documents/Kreft/09-1591-83%20Rapport%20om%20HPV-test%20i%20primærscreening.docx%2010642385\\_3\\_1.pdf](https://helsedirektoratet.no/Documents/Kreft/09-1591-83%20Rapport%20om%20HPV-test%20i%20primærscreening.docx%2010642385_3_1.pdf).
21. Krefregisteret. *HPV i primærscreening*. 2018. [lest 04.04.19]; Tilgjengelig fra: <https://www.krefregisteret.no/screening/livmorhalsprogrammet/Helsepersonell/HPV-i-primærscreening/>.
22. Dillner, J., et al., *Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study*. *BMJ*, 2008. **337**: p. a1754.
23. Albrechtsen, S., *Konisering gir økt svangerskapsrisiko*. *Tidsskriftet - Den norske legeforening*, 2009. **129:89**(2.utgave).
24. Krefregisteret. *Fakta om masseundersøkelsen mot livmorhalskreft (cervixscreeningprogrammet)*. [lest 04.04.19]; Tilgjengelig fra: <https://www.krefregisteret.no/Generelt/Nyheter/Fakta-om-Masseundersokelsen-mot-livmorhalskreft-eller-Cervixscreeningprogrammet/>
25. Folkehelseinstituttet. *Vaksine mot HPV (humant papillomavirus)*. 2018. [lest 05.02.19]; Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/sv/vaksine/barnevaksinasjonsprogrammet/vaksinene-i-barnevaksinasjonsprogrammet/vaksine-mot-hpv-humant-papillomavirus/>.
26. Macfarlane, L.-A. and P.R. Murphy, *MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer*. *Current genomics*, 2010. **11**(7): p. 537-561.
27. O'Brien, J., et al., *Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation*. *Frontiers in Endocrinology*, 2018. **9**(402).
28. Magri, F., F. Vanoli, and S. Corti, *miRNA in spinal muscular atrophy pathogenesis and therapy*. *J Cell Mol Med*, 2018. **22**(2): p. 755-767.
29. Kawaguchi, T., et al., *Circulating MicroRNAs: A Next-Generation Clinical Biomarker for Digestive System Cancers*. *International journal of molecular sciences*, 2016. **17**(9): p. 1459.
30. Liang, B., Y. Li, and T. Wang, *A three miRNAs signature predicts survival in cervical cancer using bioinformatics analysis*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 5624.
31. Campomenosi, P., et al., *A comparison between quantitative PCR and droplet digital PCR technologies for circulating microRNA quantification in human lung cancer*. *BMC Biotechnol*, 2016. **16**(1): p. 60.
32. Wang, H., et al., *Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage*. *Clinical Epigenetics*, 2018. **10**(1): p. 59.
33. Bio-Rad. *QX100™ Droplet Digital™ PCR System*. [lest 09.04.19]; Tilgjengelig fra: <http://www.bio-rad.com/en-no/product/qx100-droplet-digital-pcr-system?ID=M9HE3XE8Z>.
34. Di Leva, G., M. Garofalo, and C.M. Croce, *MicroRNAs in cancer*. *Annu Rev Pathol*, 2014. **9**: p. 287-314.
35. Pardini, B., et al., *MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: a systematic review*. *BMC Cancer*, 2018. **18**(1): p. 696.
36. Liu, B., et al., *Seven protective miRNA signatures for prognosis of cervical cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(35): p. 56690-56698.
37. Wang, W., Zhao, Y., Yan, J., Weng, M., Wang, Y., Chen, Y., Hong, S., *Differentially expressed microRNAs in the serum of cervical squamous cell carcinoma patients before and after surgery*. *Journal of Hematology & Oncology*, 2014. **7**: p. 6.



38. NAGAMITSU, Y., NISHI, H., SASAKI, T., TAKAESU, Y., TERAUCHI, F., ISAKA, K., *Profiling analysis of circulating microRNA expression in cervical cancer*. *Molecular and Clinical Oncology*, 2016. **5** (1): p. 189-194.
39. Jiménez-Wences, H., O. Peralta-Zaragoza, and G. Fernández-Tilapa, *Human papilloma virus, DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review)*. *Oncology reports*, 2014. **31**(6): p. 2467-2476.
40. Jimenez-Wences, H., et al., *Methylation and expression of miRNAs in precancerous lesions and cervical cancer with HPV16 infection*. *Oncol Rep*, 2016. **35**(4): p. 2297-305.
41. Ribeiro, J. and H. Sousa, *MicroRNAs as biomarkers of cervical cancer development: a literature review on miR-125b and miR-34a*. *Mol Biol Rep*, 2014. **41**(3): p. 1525-31.
42. Wang, X., et al., *microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014. **111**(11): p. 4262-4267.
43. Wilting, S.M., et al., *Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis*. *Oncogene*, 2013. **32**(1): p. 106-16.
44. Deftereos, G., et al., *Expression of mir-21 and mir-143 in cervical specimens ranging from histologically normal through to invasive cervical cancer*. *PloS one*, 2011. **6**(12): p. e28423-e28423.
45. Shishodia, G., et al., *Alterations in microRNAs miR-21 and let-7a correlate with aberrant STAT3 signaling and downstream effects during cervical carcinogenesis*. *Molecular cancer*, 2015. **14**: p. 116-116.
46. Zeng, K., et al., *Dysregulated microRNAs involved in the progression of cervical neoplasm*. *Arch Gynecol Obstet*, 2015. **292**(4): p. 905-13.
47. Wang, J.M., et al., *MiR-214 inhibits cell migration, invasion and promotes the drug sensitivity in human cervical cancer by targeting FOXM1*. *Am J Transl Res*, 2017. **9**(8): p. 3541-3557.
48. Li, Y., et al., *High-risk human papillomavirus reduces the expression of microRNA-218 in women with cervical intraepithelial neoplasia*. *J Int Med Res*, 2010. **38**(5): p. 1730-6.
49. Li, B.H., et al., *Reduced miR-100 expression in cervical cancer and precursors and its carcinogenic effect through targeting PLK1 protein*. *Eur J Cancer*, 2011. **47**(14): p. 2166-74.
50. Chen, J., et al., *Serum microRNA expression levels can predict lymph node metastasis in patients with early-stage cervical squamous cell carcinoma*. *International journal of molecular medicine*, 2013. **32**(3): p. 557-567.
51. Jia, W., et al., *Expression profile of circulating microRNAs as a promising fingerprint for cervical cancer diagnosis and monitoring*. *Molecular and clinical oncology*, 2015. **3**(4): p. 851-858.
52. Zheng, M., et al., *Exosomal let-7d-3p and miR-30d-5p as diagnostic biomarkers for non-invasive screening of cervical cancer and its precursors*. *Molecular Cancer*, 2019. **18**(1): p. 76.
53. Baasland, I., et al., *Clinical performance of Anyplex II HPV28 by human papillomavirus type and viral load in a referral population*. *PLoS One*, 2019. **14**(1): p. e0210997.
54. Baasland, I., et al., *Colposcopy and additive diagnostic value of biopsies from colposcopy-negative areas to detect cervical dysplasia*. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2016. **95**(11): p. 1258-1263.
55. Kirschner, M.B., et al., *The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers*. *Frontiers in genetics*, 2013. **4**: p. 94-94.

56. Biotype. *Sensitive and accurate absolute quantification of chimerism (manual)*. 2016. [lest 14.04.19]; Tilgjengelig fra: [http://www.biotype.de/fileadmin/user/MANUALS/Manual\\_Mentype\\_ddPCR.pdf](http://www.biotype.de/fileadmin/user/MANUALS/Manual_Mentype_ddPCR.pdf).
57. Bio-Rad. *QuantaSoft™ Software, Regulatory Edition #1864011*. [lest 19.04.19]; Tilgjengelig fra: <http://www.bio-rad.com/en-no/sku/1864011-quantasoft-software-regulatory-edition?ID=1864011>.
58. Hamam, R., et al., *Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers*. *Cell death & disease*, 2017. **8**(9): p. e3045-e3045.
59. Fang, Z., et al., *Plasma levels of microRNA-24, microRNA-320a, and microRNA-423-5p are potential biomarkers for colorectal carcinoma*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2015. **34**(1): p. 86.
60. Max, K.E.A., et al., *Human plasma and serum extracellular small RNA reference profiles and their clinical utility*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018. **115**(23): p. E5334.
61. Tian, F., et al., *No Significant Difference between Plasma miRNAs and Plasma-Derived Exosomal miRNAs from Healthy People*. *BioMed Research International*, 2017. **2017**: p. 5.
62. Sun, G., et al., *A bias-reducing strategy in profiling small RNAs using Solexa*. *RNA* (New York, N.Y.), 2011. **17**(12): p. 2256-2262.
63. Chugh, P. and D.P. Dittmer, *Potential pitfalls in microRNA profiling*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2012. **3**(5): p. 601-16.
64. Weng, S.L., et al., *Genome-wide discovery of viral microRNAs based on phylogenetic analysis and structural evolution of various human papillomavirus subtypes*. *Brief Bioinform*, 2018. **19**(6): p. 1102-1114.
65. Chirayil, R., et al., *Identification of virus-encoded microRNAs in divergent Papillomaviruses*. *PLoS pathogens*, 2018. **14**(7): p. e1007156.
66. Tang, X., et al., *miR-423-5p serves as a diagnostic indicator and inhibits the proliferation and invasion of ovarian cancer*. *Experimental and therapeutic medicine*, 2018. **15**(6): p. 4723-4730.
67. Li, S., et al., *miR-423-5p contributes to a malignant phenotype and temozolomide chemoresistance in glioblastomas*. *Neuro-oncology*, 2017. **19**(1): p. 55-65.
68. Liu, J., et al., *miRNA423-5p regulates cell proliferation and invasion by targeting trefoil factor 1 in gastric cancer cells*. *Cancer Lett*, 2014. **347**(1): p. 98-104.
69. Sharma, S., et al., *Novel MicroRNA signatures in HPV-mediated cervical carcinogenesis in Indian women*. *Tumor Biology*, 2016. **37**(4): p. 4585-4595.
70. Wang, H., et al., *miRNA-29c suppresses lung cancer cell adhesion to extracellular matrix and metastasis by targeting integrin  $\beta$ 1 and matrix metalloproteinase2 (MMP2)*. *PloS one*, 2013. **8**(8): p. e70192.
71. Fan, Y., et al., *Down-regulation of miR-29c in human bladder cancer and the inhibition of proliferation in T24 cell via PI3K-AKT pathway*. *Medical oncology*, 2014. **31**(7): p. 65.
72. Zhang, S., et al., *hsa-miR-29c-3p regulates biological function of colorectal cancer by targeting SPARC*. *Oncotarget*, 2017. **8**(61): p. 104508-104524.
73. Wu, H., et al., *miR-29c-3p regulates DNMT3B and LATS1 methylation to inhibit tumor progression in hepatocellular carcinoma*. *Cell Death & Disease*, 2019. **10**(2): p. 48.
74. Hudcova, K., et al., *Expression profiles of miR-29c, miR-200b and miR-375 in tumour and tumour-adjacent tissues of head and neck cancers*. *Tumor Biology*, 2016. **37**(9): p. 12627-12633.

75. Wang, Z.L., Z.; Fang, X.; Yang, H.; *MiR-142-5p suppresses tumorigenesis by targeting PIK3CA in non-small cell lung cancer*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2017. **43**(6): p. 2505-2515.
76. Xu, W. and W. Wang, *MicroRNA-142-5p modulates breast cancer cell proliferation and apoptosis by targeting phosphatase and tensin homolog*. Molecular medicine reports, 2018. **17**(6): p. 7529-7536.
77. Tang, T., et al., *MicroRNA-182 plays an onco-miRNA role in cervical cancer*. Gynecologic Oncology, 2013. **129**(1): p. 199-208.
78. Pereira, P.M., et al., *MicroRNA expression variability in human cervical tissues*. PloS one, 2010. **5**(7): p. e11780-e11780.
79. Fukumoto, I., et al., *Identification of tumour suppressive microRNA-451a in hypopharyngeal squamous cell carcinoma based on microRNA expression signature*. British Journal Of Cancer, 2014. **111**: p. 386.
80. Yamada, Y., et al., *Impact of novel oncogenic pathways regulated by antitumor miR-451a in renal cell carcinoma*. Cancer science, 2018. **109**(4): p. 1239-1253.
81. Ibad-Raja, A., *Genetics and Epigenetics of HPV-Infected Anal Carcinomas*. 2017, Howard University.
82. Shan Zong, X.L., Na Zhou, Ying Yue., *E2F7, EREG, miR-451a and miR-106b-5p are associated with the cervical cancer development*. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2019. **299**(4): p. 1089-1098.
83. Li, L., et al., *MicroRNA-451a promotes cell proliferation, migration and invasion in cervical cancer cell lines*. Int J Clin Exp Med, 2016. **9**(2): p. 2458-2464.
84. Kawai, S., et al., *Identification of miRNAs in cervical mucus as a novel diagnostic marker for cervical neoplasia*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 7070.
85. Pizzamiglio, S., et al., *A methodological procedure for evaluating the impact of hemolysis on circulating microRNAs*. Oncology letters, 2017. **13**(1): p. 315-320.
86. Wang, F., et al., *Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor*. Gynecologic Oncology, 2010. **119**(3): p. 586-593.
87. Robinson, S., et al., *Droplet digital PCR as a novel detection method for quantifying microRNAs in acute myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2018. **257**: p. 247-254.
88. Thomas G. Tape. *The Area Under an ROC Curve*. [lest 02.05.19]; Tilgjengelig fra: <http://gim.unmc.edu/dxtests/roc3.htm>.







**Norges miljø- og biovitenskapelige universitet**  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway