

HLK Noora Männistö
505107

Opinnäytetyö, syventävät opinnot

Hammaslääketieteen tiedekunta

TURUN YLIOPISTO

Ohjaaja: yliopisto-opettaja Jaana Rautava

Asiantuntijatarkastaja: professori Stina Syrjänen

Kevät 2014

**Ihmisen papilloomavirustyyppin (HPV) 16 pitkän säätelyalueen
HPV16 E2-proteiinien sitoutumiskohtien (E2BS)
metylaatioiden tutkimusmenetelmän pystytys**

Sisällysluettelo

1. Johdanto	3
1.1 Ihmisen papilloomavirus (HPV)	3
1.2 HPV-infektion aiheuttamat kliiniset muutokset sekä pään ja kaulan alueen syövät	5
1.3 HPV16:n aiheuttamien malignien muutosten genominen tausta.....	6
1.3.1 Onkogeenien aktivaatio ja säätely.....	6
1.3.2 E2 binding sites (E2BSs)	6
1.4 DNA-metylaatio	8
1.4.1 HPV-metylaation merkitys.....	8
1.5 Metylaation tutkimusmenetelmiä.....	9
1.5.1 DNA:n metylaatiোসensitiivinen restriktio	10
1.5.2 Geenisiru-sekvenointitutkimus	10
1.5.3 Bisulfiittisekvenointi	10
1.6 Syventävän työn tavoite	12
2. Materiaalit ja menetelmät.....	13
2.1 Solulinjat	13
2.1.1 Solujen herättäminen ja kasvatus	13
2.2 Solujen kasvatus ja DNA-eristys	13
2.3 DNA-metylaatio ja pyrosekvenointi	14
2.3.1 Bisulfinaatiokäsittely	14
2.3.2 Metylaatio-PCR.....	14
2.3.4 E2BS-alueiden pyrosekvenointi	15
3. Tulokset	17
3.1 Metylaatio-PCR bisulfinoidulle DNA:lle kohdistetuilla alukkeilla	17
3.2 Pyrosekvenointi ja E2BS-alueiden metylaatiokuviot	17
4. Pohdinta ja johtopäätökset	22
Työssä kohdatut ongelmat	22
Johtopäätökset	23
Kiitokset	24
Lähteet.....	25
LIITE 1. Liuosohjeet.....	28
LIITE 2. Valmiit metylaatiotyöohjeet	29
LIITE 3. HPV16 16W12E-variantin DNA-sekvenssi	33

1. Johdanto

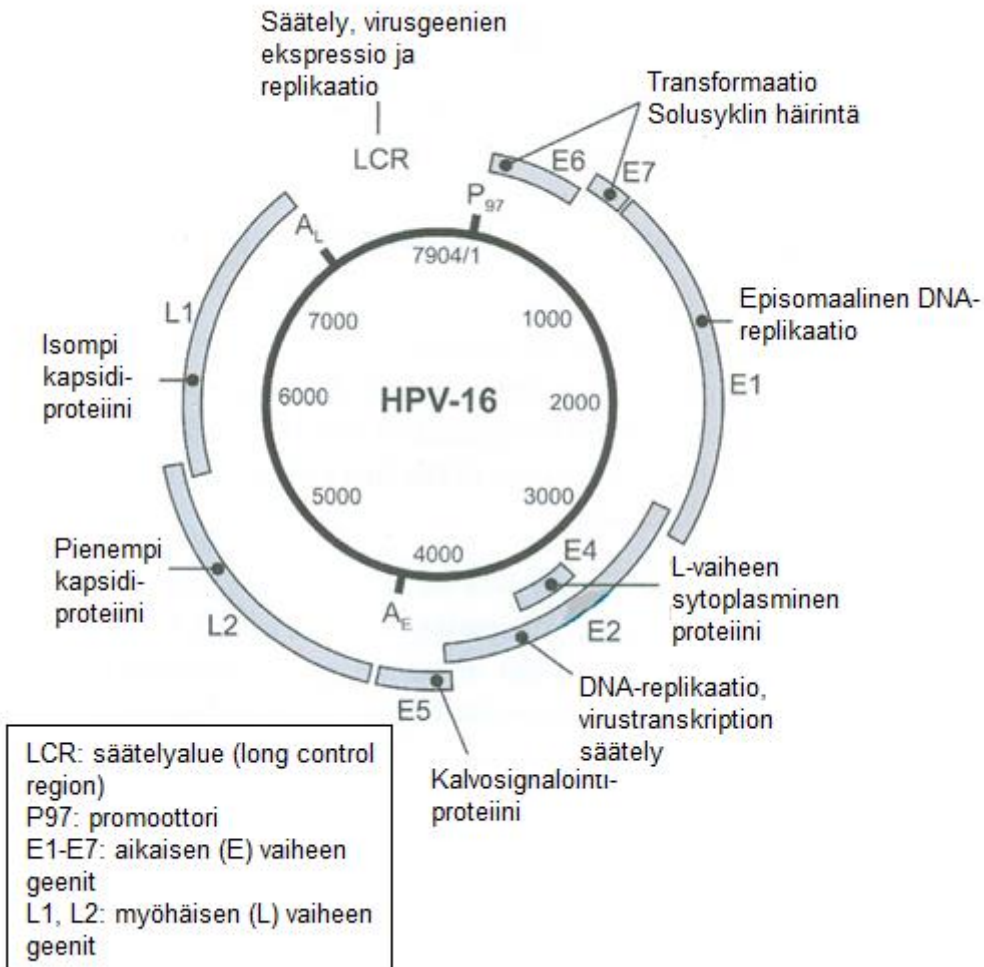
1.1 Ihmisen papilloomavirus (HPV)

Papilloomavirukset ovat pieniä, hyvän- ja pahanlaatuisiin iho- ja limakalvoinfektioihin yhdistettyjä viruksia, jotka luokitellaan useisiin alaryhmiin mm. isännän, nukleiinihappo- ja kapsidirakenteen mukaan. Ne ovat isäntäspesifisiä (mm. kaneilla, lampailla, koirilla on omansa), eli ihmisillä esiintyy vain ihmisen papilloomaviruksien (HPV) aiheuttamia infektoita. [1-4] Ihmisen papilloomavirukset kuuluvat useista suvuista (mm. alfa-, beeta- ja gammasuvut) koostuvaan *Papillomaviridae*-perheeseen [2,3,5].

HPV:t (~150 tyyppiä) muodostavat vaipattomien DNA (deoksiribonukleiinihappo) -virusten perheen, joka infektoi ihmisten epiteelin basaalisolukerroksen soluja [1, 6-9]. HPV-virukset luokitellaan ihoa tai limakalvoa infektoiviin muotoihin sen perusteella, mitä epiteelisolutyyppiä virus suosii [7]. Limakalvoja infektoivat luokitellaan vielä edelleen syöpää aiheuttavan, onkogeenisen potentiaalinsa perusteella korkean (HR-HPV) ja matalan riskin viruksiin (LR-HPV). Luokittelu pohjaa siihen, miten infektiosta aiheutuneet muutokset käyttäytyvät (korkean riskin virukset voivat tyypillisemmin aiheuttaa pahanlaatuisia muutoksia). Korkean riskin viruksiin (~20 kpl) luetaan mm. tyypit 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 ja 70, kun taas matalan riskin viruksia (~12 kpl) ovat mm. tyypit 6, 11, 42, 43 ja 44. [3,7,9-12] Useimmat HR-HPV-viruksista kuuluvat alfasukuun (Alfapapilloomavirus)[13,14].

HPV-virusten proteiinikapseli on ikosahedrin muotoinen ja halkaisijaltaan noin 55 nm [2,8,10]. Sisällä oleva genomi on rakenteeltaan noin 8000 bp:n kokoinen, ympyränmuotoinen, kaksijuosteinen DNA (kuva 1) [4,8,10]. Pienikokoisen genomien ilmentyminen on kuitenkin tehokasta ja sidoksissa viruksen infektoimien levyepiteelisolujen erilaistumisasteeseen. Genomi muodostuu vain muutamasta geenistä, jotka koostuvat avoimista lukualueista (open reading frames eli ORFs). Nämä alueet ovat potentiaalisesti proteiineja koodaavia sekvenssejä, jotka alkavat aloituskodonista ja päättyvät stop-kodoniin ilman väliin jääviä intronialueita [7]. HPV-genomissa ORF-alueet jaotellaan viruksen elinkaareissa ilmentymisajankohtansa mukaisesti ns. aikaisiin (early eli E) ja myöhäisiin (late eli L). E-geenien ilmentyminen alkaa yleensä pian infektoitumisen jälkeen sekä ennen DNA-replikaatiota. Näiden geenien proteiinituotteet ovat osallisena virus-DNA:n replikaation ja ekspression säätelyssä. Joissain E-geeneissä esiintyy pientä vaihtelua sekvenssirakenteiden suhteen virustyyppien välillä [2,10,14]. L-geenit puolestaan koodaavat viruspartikkelin rakenteellisia proteiineja ja niiden ilmentyminen ajoittuu viruksen replikaatiokaaren loppupuolelle. [2,7]

Virus pääsee terveeseen epiteelikudokseen pienten kudorepeytymien (mikroabraasiot) kautta [7,15]. Virukset tunkeutuvat soluihin muun muassa klatriiniriippuvaisen ja -riippumattoman endosytoosin avulla [7]. Päästyään soluun sisään virus-DNA vapautuu tumaan, jossa se jakaantuu pienellä kopioluvulla [3]. Jos näitä episomeja on paljon eli kopioluku on suuri, ne voivat integroitua isännän genomiin, mikä voi sopivissa olosuhteissa johtaa genomisen epästabiilisuuden, mutaatioiden ja malignien muutosten kertymiseen isäntäsoluun. Pahanlaatuiset muutokset voivat vaatia muidenkin tekijöiden (mm. karsinogeenien) läsnäoloa, ja siten jokainen HPV-infektio ei suoraan johda syöpään. [3]



Kuva 1. HPV-viruksen genomikartta, esimerkkinä HPV16:n genomi (muokattu lähteestä Rautava ja Syrjänen [3]).

HPV replikoituu epiteelin basaalisolukerrossa, ja sen elinkaari määräytyy pitkälti epiteelisolujen erilaistumisen mukaan [1,2,15]. Basaalikerrossa solut ovat vielä erikoistumisensa alkutaipaleella, mikä edesauttaa HPV-infektion etenemistä. HPV-virukset eivät välttämättä aiheuta välittömästi infektiota, vaan voivat pysyä lepotilassa pitkäänkin, kunnes jokin ärsyke laukaisee virusreplikaation [7]. HPV-infektoituneet epiteelisolut eivät erilaistu, vaan niiden toimintaa leimaa virusreplikaatio. Jakauduttuaan infektoituneet tytärsolut kulkeutuvat pois solukierrosta, eivätkä enää ole mukana solusykliissä tai läpikäy terminaalierilaistumista [12,15]. Epiteelisolujen ollessa basaalivaiheessaan HPV-viruksen DNA-replikaatio ja proteiinitranskriptio ovat erittäin alhaisella tasolla, mutta solujen vanhetessa myös virusreplikaatio ja -transkriptio kiihtyvät. Todennäköisesti tämän saa aikaan solujen erilaistumisen myötä muuttuva ympäristö. Virionien kokoaminen tapahtuu epiteelin pintasolujen tumissa ja infektoivat HPV-virukset vapautuvat epiteelin hilseilyssä [2,14]. Infektio voi näkyä solukerroksissa mm. monitumaisuutena, suurentuneina tumina ja koilosytoosina. [2,15] Usein infektiot ovat subkliinisiä eli eivät aiheuta kliinistä muutosta, mutta näkyvät histologisina muutoksina erotuksena latentista infektiosta, jossa histologinen kuva on normaali. [1]

1.2 HPV-infektion aiheuttamat kliiniset muutokset sekä pään ja kaulan alueen syövät

Virukset aiheuttavat n. 15 % ihmisten syöivistä [16,17]. Näistä arviolta 28 % on HPV:n aiheuttamia [17]. Luvut vaihtelevat miesten ja naisten kesken suuresti, ja vuonna 2009 arvioitiin naisten kaikista syöivistä 50 %:n olevan HPV:n aiheuttamia, kun miehillä vastaava luku jäi reiluun neljään prosenttiin [17].

Ymmärrys HPV:n osuudesta pään ja kaulan alueen syöivissä on kasvanut kuluneiden vuosikymmenten aikana. Pään ja kaulan alueen syövät käsittävät joukon suun, nielun, kurkunpään ja nenäonteloiden syöpiä, jotka ovat anatomiselta ilmentymältään hyvin heterogeenisiä [11,19]. Koska HPV infektoi erityisesti epiteelisoluja, ovat niihin liittyvät syövät karsinomia. Ihmisten suunielun syöivistä arviolta 46 %, kurkunpään syöivistä 22 % ja suuontelon syöivistä 24 % ovat meta-analysitutkimuksissa osoittautuneet HPV-positiivisiksi [18]. Vaikka taustalla on aina useita riskitekijöitä, HPV-tartuntaan liittyy usein alkoholi, tupakka, marihuana tai seksuaalinen riskikäyttäytyminen [3,7,12,19]. Tutkimuksissa on huomattu, että HPV-virusten esiintyminen syöivissä riippuu myös yllättävän paljon sekä anatomisesta paikallistumisesta mm. nielurisoihin (53,9 %), kielen tyveen (47,8 %) tai kovaan suulakeen (6,2 %), että tartunnan saajan maantieteellisestä asuinalueesta (esimerkiksi Euroopassa HPV-infektioiden osuus kasvaa pohjoisemmaksi mentäessä) [18]. Maailmanlaajuisesti tupakan ja alkoholin aiheuttamien pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomien (HNSCC) määrä on laskussa, mutta suunielun alueen syöpien määrä on lievässä nousussa kenties juuri HPV-infektioiden lisääntymisen vuoksi [6,19]. Vakavasti alentunut vastustuskyky (mm. perussairaudesta, elinsiirrosta johtuva) on eräs tärkeä syy HPV:een liittyvien syöpien määrän kasvuun [17]. Tavallisimpia ihmisillä tavattavia HR-HPV-tyyppejä ovat HPV16 ja -18 [20,21], joilla on yhteys erityisesti suunielun alueen syöpiin (tonsilla ja kielen tyvi). HPV-infektioilta saattaa kestää enemmän kuin kymmenen vuotta kehittyä pahanlaatuisiksi, ja kliinisesti terveilläkin ihmisillä voi olla HPV-tartunta. [6,19] Vain pieni osa infektioista kehittyy syöviksi, todennäköisimmin silloin, kun HPV-infektio on henkilöllä persistoiva eli jää pysyväksi. Tämä riippuu ympäristötekijöiden, tupakoinnin ja perimän lisäksi viruksen onkogeenoiminnasta [15,21].

LR-HPV-virusten aiheuttamat infektiot menevät yleensä nopeammin ja helpommin ohi kuin HR-HPV-infektiot [6,12]. LR-HPV:t, kuten HPV6 ja -11, aiheuttavat yleensä vain lieviä muutoksia suussa, kuten tavallisia syyliä, visvasyyliä tai papilloomia. Ne sijoittuvat usein suulakeen, alahuuleen, kielen sivuille sekä kielen selkään, ja ovat usein pieniä (>2 mm) sekä sormimaisten, papillaaristen ulokkeiden peitossa muistuttaen kukkakaalia. Fokaalinen epiteelihyperplasia (FEH) on LR-tyyppien aiheuttama hyvänlaatuinen leesio, jota esiintyy erityisesti tietyissä väestöryhmissä [3]. HPV:ia on löydetty mm. verrukoottisista karsinoomista, suun leukoplakioista, erytroplakioista ja *lichen planus* -muutoksista [4]. Suurimmassa osassa tapauksista (82,2 % [18]) aiheuttaja on HPV 16 [3,4,11,19,22], ja seuraavaksi yleisimpiä ovat HPV 18, 31, 33 ja 35 [1,5,23]. Papilloomavirusinfektioista 80–90 % paranee ajan kanssa itsestään immuunivasteen kehittyessä [2].

Tutkimusten mukaan HPV-peräistä pään ja kaulan alueen levyepiteelisyöpää sairastavat ovat nuorempia ja vastaavat hoitoihin paremmin kuin ns. perinteiset tupakka- ja alkoholitaustaisia levyepiteelisyöpiä sairastavat [7,11,19,22]. Tämä johtuu siitä, ettei HPV-positiivisten epiteelisyöpien p53 ole mutatoitunut ja usein tuumorisuppressori p16 ilmentyy runsaammin, jolloin solut ovat perimältään normaalimmat ja menevät esimerkiksi sädetyksen johdosta helpommin apoptoosiin [6].

1.3 HPV16:n aiheuttamien malignien muutosten genominen tausta

1.3.1 Onkogeenien aktivaatio ja säätely

Geenejä, jotka ovat normaalisti inaktiivisia tai joiden aktiivisuuden äkillinen lisääntyminen mutaation seurauksena voi ajaa solun kohti dysplastisia muutoksia, kutsutaan proto-onkogeeneiksi [24]. Näiden geenien aktivoituneita muotoja puolestaan kutsutaan onkogeeneiksi. Kahden HPV-geenin (E6 ja E7) on tiedetty toimivan onkogeenien tapaan sopivissa olosuhteissa. Onkogeenisten HPV:ten aiheuttamat neoplastiset muutokset johtuvat pääasiassa näiden kahden virusonkogeenin lisääntyneestä ekspressiosta basaali- ja parabasaalisoluissa. Onkogeenit häiritsevät varsinkin solujen apoptoosimekanismeja kykenemällä inaktivoimaan p53- ja pRB-tuumorisuppressorit, joilla on keskeinen asema solusyklin säätelyssä ja apoptoosikaskadin laukaisussa. [1,11] Tästä syystä ne aiheuttavat genomista epävakausta ja vaikeuttavat soluissa mm. kromosomien erkanemista sekä lukumäärien poikkeamaa (aneuploidia) [11].

Alkuun viruksen geneeistä ekspressoituvat E1, E2, E6 ja E7, joista kahdella viimeisellä on kyky häiritä solun terminaalista erilaistumista sekä DNA-synteesiä [1,5,23]. HPV16 ja -18 integroituvat yleensä isäntänsä DNA:han, mutta virusgenomi voi jäädä myös ekstrakromosomaaliseksi DNA:ksi. Integraatio isännän genomiin osuu yleensä viruksen omien E1- ja E2-alueiden keskelle, jolloin jokin näiden alueiden toiminnan kannalta oleellinen geenialue deletoituu ja negatiivinen feed-back-kontrolli menetetään. E6- ja E7-alueet säilyvät tavallisesti ehjinä. [1,7,25] E1- ja E2-alueiden deletiot voivat aiheuttaa muutokset E6- ja E7-geenien luennassa sekä ilmentymisessä, mikä voi johtaa geenien kontrollin menetykseen. Kontrollioimaton geeniekspressio on karsinogeneesin kulmakiviä [4,16]. Varsinkin jos HR-HPV-E6- ja -E7-geenien kontrolli katoaa, näiten geenien ekspressio lisääntyy rajusti, jolloin alkaa ilmaantua pahanlaatuisia muutoksia. [3,4,26] Infektion aiheuttamat solumuutokset aiheutuvat viruksen ja isäntäsolun omien proteiinien aktiivisesta vuorovaikutuksesta virusreplikaation aikana, [7] jolloin keskeisimpiä vuorovaikutusmekanismeja on viruksen perimän käsittely isännän omilla proteiineilla (mm. RNA splicing).

Tuumorisuppressorigeenit ovat geenejä, joiden aktiivisuus suojaa solua menettämästä kontrollia eli aktivoimasta onkogeenejä. Niiden aktiivisuuden menetys voi myös johtaa syöpään. E6 sitoutuu p53-tuumorisuppressoriin joko suoraan tai vaikuttamalla toisten proteiinien (mm. p73, p300) välityksellä, ja tuhoaa sen ubikitiinireitin kautta [8,15]. Tämä johtaa mm. apoptoosin estoon ja solusyklin häiriintymiseen. E6 aktivoi myös telomeraasin käänteiskopioijaentsyymien (hTERT) transkription sitoutumalla sen promoottorialueen transkriptiofaktoreihin (mm. c-Myc, Sp1). hTERT kontrolloi mm. telomeraasiaktiivisuutta, ja vaikuttaa siten solujen kuolemattomuuteen. E7 puolestaan vaikeuttaa tuumorisuppressorigeeni pRB:n toimintaa [8,15], joka on keskeinen mm. DNA-korjauksessa, apoptoosissa ja solujen erilaistumisessa. E7 häiritsee E2F-proteiinin sitoutumista pRB:hen, mistä aiheutuvat solusyklin G1/S-tarkastuspisteen häiriöt ja siitä kontrollioimaton soluproliferaatio. E6- ja E7-proteiinien on esitetty vaikuttavan myös mm. angiogeneesiin VEGF- ja HIF-1 α -proteiinien kautta. [8]

1.3.2 E2 binding sites (E2BSs)

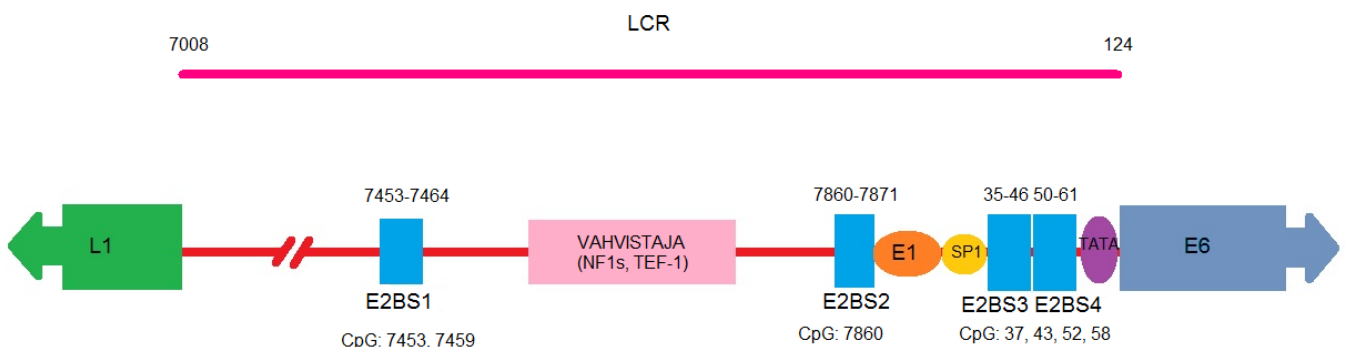
E6- ja E7-geenien ekspressiota säätelee virusgenomin ylävirran URR (upstream regulatory region)-alueeseen kuuluva koodaamaton LCR (long control region) -kontrollialue (650–900 bp), jota puolestaan säätelevät sille sitoutuvat transkriptiotekijät, kuten Sp1 ja HPV:n E2-proteiini [1,27]. LCR sijaitsee geenien E6 ja L1 välissä (kuva 1) [1,7] ja pitää sisällään koko genomien ilmentymistä säätelevät promoottori- ja

vahvistaja-alueet, joista E6- ja E7-geenien ekspresion säätelyn kannalta tärkeimpiä ovat E2-proteiinin neljä sitoutumisaluetta (E2BSs) (kuva 2). Näille alueille sitoutuessaan E2 hillitsee geeniekspressiota häiritsemällä transkriptiofaktoreiden sitoutumista sekä helpottaa E1-proteiinin sitoutumista. Sen sijaan sitoutumisen estyminen lisää geeniekspressiota. [5,7,27-29].

E2-sitoutumisalueet (E2BSs) sisältävät hyvin konservoituneita palindromisia jaksoja (ACCN₆GGT-toistojaksot), joita esiintyy myös muualla LCR-alueella [1,7,30]. Nämä toistojaksot sisältävät CpG-motiiveja, ja ovat siksi potentiaalisia metylaatioalueita [30]. Yksi palindromeja sisältävä alue on P97-promoottori, joka säätelee E6- ja E7-geenejä [5,28]. Näiden geenien on arveltu mm. voivan lisätä solun metyyli transferaasiaktiivisuutta [13].

E2-proteiinin sitoutumisessa eri E2-alueisiin on eroja. Sen sitoutuminen E2BS1-alueelle aiheuttaa aikaisen promoottorin aktivaation ja aikaisten viraalituotteiden ekspresion E2-, E6- ja E7-geeneissä [14]. Sitoutuminen E2BS1-alueeseen on voimakkain ja stabiilein, E2BS2-alueeseen heikoin. E6/E7-geeniekspressio ei hiljene, jos E2-konsentraatio on liian alhainen ja vain E2BS1 on täytetty. [27] Jos E2-proteiinin määrä nousee tietyn rajan yli, E2 sitoutuu myös alhaisemman affiniteetin alueille (E2BS2-4), mikä johtaa P97-promoottorin toiminnan estymiseen (Sp1 ja TBP syrjäytetään). Samalla E6- ja E7-proteiinien tuotto pysyy hallinnassa. Alfavirusten E2BS-alueet sijaitsevat hieman eri paikoissa kuin esimerkiksi beetavirusten [5], mikä voi olla yksi syy siihen, että alfasuvun virukset aiheuttavat useammin vakavampia infektoita.

E2-repressiotoiminnan menetys on pääasiallinen syyppää onkogeneenien aktivaatioon ja syöpämuutosten laukeamiseen [1,14]. Metylaatiota on tutkittu yhtenä tärkeimpänä epigeneettisenä mekanismina, joka vaikuttaa E2-proteiinin toimintaa estävästi. Jokainen E2BS sisältää yhden tai kaksi CpG-motiivia, jotka ovat potentiaalisia metylaatiokohteita. E2BS-alueen metyloituminen estää E2-proteiinia sitoutumasta transkriptiosäätelyalueille [13,30], sekä samalla E1-sitoutumisen [27] ja E2-välitteistä P97-promoottorin aktivoitumista [28]. Muun muassa näiden toimintojen ajatellaan aiheuttavan virustoiminnassa muutoksen kohti pahanlaatuistumisen esiastetta, dysplastiseen suuntaan [27], ja esimerkiksi varsinkin E2BS3- ja E2BS4-alueiden metylaatiomuutokset ovat Reuschenbachin ym. [31] mukaan yhteyksissä E2-geenin yhtenäisyyteen sekä viruksen fyysiseen statukseen pään ja kaulan alueen syövässä.



Kuva 2. HPV16 -viruksen genomien LCR-alue. Kuvaan on merkitty E2BS-alueiden sijoittuminen sekvenssillä sekä niiden sisältämien CpG-alueiden sijainti (kuva koostettu käyttämällä lähteitä Chaiwongkot ym. [1] sekä Vinokurova ym. [14]).

1.4 DNA-metylaatio

Metylointi on fundamentaalinen epigeneettinen mekanismi, joka kuvaa genotyypin ja ympäristön välistä vuorovaikutusta, joka kohdistuu geenien ekspression säätelyyn. DNA:n metyloinnin merkitys korostuu erityisesti geenien transkription hiljentämisessä [16,32-34]. Yleensä aktiiviset geenit ovat vähäisesti metyloituja, kun taas inaktiiviset runsaasti. Kaikkia metylaation merkityksiä DNA:n säätelyssä ei varmasti vielä edes tunneta, mutta sillä on merkitystä ainakin geenien ekspression säätelyssä (histonimodifikaatiot, transkriptiofaktoreiden sitoutuminen jne.), DNA imprintingissä (paternaalisen ja maternaalisen geenialueen ilmentymisen säätely), X-kromosomin inaktivaatiossa sekä DNA-puolustuksessa (ns. parasitiittisten alueiden, kuten retrotransposonien hillintä) [24,32,35]. Sitä, kuinka metylaatio aiheuttaa geenien hiljentymisen, ei tarkkaan ymmärretä, mutta todennäköisesti sillä on ainakin vaikutuksia geenien promoottori- ja säätelyalueilla mm. transkriptiotekijöiden sitoutumiseen sekä mahdollisesti kromatidia uudelleenjärjestelevien histonideasetylaasien toimintaan [33]. Promoottorialueen CpG-alueiden metylaation puute sallii geenin ekspression. Osa näistä alueista sijaitsee kuitenkin myös geenien ulkopuolella, eikä niiden tarkkaa merkitystä ymmärretä. [16]

Selkärankaisilla ainoastaan CpG-sekvenssien sytosiinit voivat metyloitua. CpG-motiiveja esiintyy genomeissa melko vähän, mutta niillä on suuret keskittymät nimenomaan geenien promoottori- ja säätelyalueiden lähellä. [1,24,32] DNA-metylaatiossa metyyliryhmiä lisätään kovalenteilla sidoksilla C5-asemaan sytosiiniin tai N6-asemaan adeniniin. Metylaatio on yleisin epigeneettinen tapahtuma. Sytosiinin metyloitunut muoto on 5-metyylisytosiini, jolla on sama sitoutumissuhde guaniiniin kuin adenosiinilla on urasiiliin tymiiniin lisäksi. [36] DNA-metylaatiot ovat osittain periytyviä, mutta niihin vaikuttavat yksilöllisellä tasolla myös mm. ravinto, terveys, ikä ja ympäristö. Geenien metylaation on väitetty olevan tehokas mekanismi, jolla geenien ilmentymismuodot periytyvät samanlaisina jälkikasvulle. Metyyliryhmiä liittävät emäksiin DNA-metyylitransferaasientsyymit (DNMTs, *de novo* ja ylläpitävät). Geenien demetylaatio voi tapahtua spontaanisti entsyymitoiminnan puuttuessa tai jos jokin entsyymi aktiivisesti poistaa metyyliryhmiä. [24,33] On todettu, että juuri promoottorialueen tuumorisuppressorigeenien metylointi vaikuttaa niiden transkription hiljenemiseen HNSCC-syövissä [4,13,29,36].

Koska metylaatio voidaan liittää näin moneen genomiseen säätelyprosessiin, metylaatiokoneiston häiriöt voivat aiheuttaa tai liittyä useisiin tautitiloihin. CpG-saarekkeiden hypermetylaatiokuviot on tunnistettu jo useasta syövästä [37].

1.4.1 HPV-metylaation merkitys

DNA-hypermetylointi on ollut ilmiönä jo kauan tunnettu monissa maligneissa syövissä, ja johon liittyy yliaktivoitunut DNMT-entsyymi [33]. Syy siihen, miksi DNMT-entsyymit ovat syövissä yliaktiivisia, ei tunneta [33]. HNSCC:iä sairastavien potilaiden HPV-positiivisuus tai -negatiivisuus näkyy eri geenien metylaatioeroissa. Worsham ym. [19] ovat tutkineet HPV-positiivisten potilaiden geenien muutoksia, ja löytäneet useiden onkogeneeniaktivaatioiden lisäksi useita hypermetyloituneita geenejä (promoottorialueet). Erityisesti ylimetyloituja ovat olleet mm. Wnt-reitin sekä E-kadheriinireitin geenit. Näiden metylaatioiden selvittäminen voi avata uusia tutkimusuria HPV-peräisten HNSCC:ien hoidossa. Myös Lleras ym. [36] ovat löytäneet 28 ylimetyloitua geeniä, joita ei ole aiemmin hyödynnetty HNSCC-tutkimuksissa. Metylaatiotason ei ole todettu olevan yhteydessä ikään [32].

Virusinfektion aiheuttamassa karsinogeneesissa metylaatioissa tapahtuu muutoksia sekä isännän että HPV:n genomissa. Erityisesti juuri CpG-alueiden metylaatioiden on todettu lisääntyvän, ja nämä muutokset ovat sitä suurempia mitä vakavammasta syövästä on kyse [21,32]. Useissa HPV-metylaatiotutkimuksissa on keskitytty LCR-, L1-, L2-, E5- ja E6-geenialueisiin (taulukko 1), joilla metylointimuutosten on havaittu olevan selkeimmät, mutta E2-proteiinin sitoutumisalueet kuin myös itse E2-geeni ovat viime aikoina avanneet erittäin lupaavia tutkimussuuntia [1,14,31]. Metylaatiokuvioiden muutoksia on ajateltu pystyttävän käyttämään biomarkkereina, joiden avulla voidaan myös luokitella kasvaimia [33].

Taulukko 1. Geenejä, joiden metylaatiomuutoksilla on todettu mahdollinen yhteys HPV:een aiheuttamaan syöpään, on aiemmissa tutkimuksissa keskitytty arvioimaan myös muilla kuin vain E2BS-geenialueilla.

Kohdegeeni, jonka metylaatiota on tutkittu HPV-lähtöisiin syöpiin liittyen	Lähde
L1	Brentnall ym. [20], Sun ym. [21], Bryant ym. [32], Lorincz ym. [34], Mirabello ym. [38], Bradsmä ym. [39]
L2	Brentnall ym. [20], Bryant ym. [32], Lorincz ym. [34], Bradsmä ym. [39]
E6	Brentnall ym. [20], Lorincz ym. [34]
E2	Reuschenbach ym. [31], Bryant ym. [32]
E2BS	Chaiwongkot ym. [1], Jacquin ym. [13], Vinokurova ym. [14], Snellenberg ym. [27], Vösa ym. [29], Reuschenbach ym. [31]
URR/LCR	Bradsmä ym. [16], Brentnall ym. [20], Sun ym. [21], Bryant ym. [32], Lorincz ym. [34], Mirabello ym. [38]
E5	Bradsmä ym. [39]
EGFR, E-kadherini, Wnt-antagonistit	Worsham ym. [19]
ZNF-perhe	Lleras ym. [36]
koko genomi	Worsham ym. [19], Lleras ym. [36]

Koska DNA-metylaatio on luonteeltaan reversiibeliä, se on ollut jo jonkin aikaa ihanteellinen kohde lääkehoidon kannalta. Esimerkiksi sellaiset syöpälääkkeet kuin azasitidiini ja decitabiini inhiboivat DNMT:a. Tämä ei johda aktiiviseen demetylaatioon, mutta sen ansiosta syöpäaktivaatioissa demetyloituneet tuumorisuppressorigeenit saattavat jälleen aktivoitua ja vaikuttaa syöpäsolun toimintaan. [33,40]

1.5 Metylaation tutkimusmenetelmiä

DNA-metylaation tutkimiseen on olemassa useita menetelmiä, joiden tavoite on kyetä osoittamaan sekvenssispesifisesti pienetkin kemialliset emäsmuokkaukset. Koska metylaatio ei monistu PCR-tekniikalla, on muita keinoja metyyliryhmien jäljittämiseksi jouduttu kehittämään. Yleensä menetelmät jaetaan kolmeen kategoriaan, jotka ovat endonukleaasi-, vasta-aine- tai bisulfiittipohjaisia menetelmiä.

1.5.1 DNA:n metylaatio-sensitiivinen restriktio

Tässä menetelmässä metylaatio-sensitiivisiä restriktioentsyymejä (MSRE) käytetään analysoimaan CpG-alueiden sytosiinien metylaatioastetta. MSRE:t pilkkovat DNA:ta spesifien metyloimattomien sytosiinien kohdalta, mutta eivät kykene leikkaamaan metyloituneita sytosiineja. Metyloitunut DNA jää ehjäksi ja on monistettavissa polymeerasiketjureaktiolla (PCR), qPCR:llä tai multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) -menetelmällä. Monistuneita alueita voidaan tarkastella mm. elektroforeesin avulla. Menetelmän etuja ovat nopeus ja useiden alueiden tutkiminen kerralla. Haittapuolena on, että menetelmän resoluutio on riippuvainen DNA:n restriktiokohdista ja menetelmä on herkkä DNA:n laadulle. PCR-analysoinnin ongelmina mainittakoon, että menetelmään sisältyvät lämpötilamuutokset voivat aiheuttaa eroja tuloksiin. [33,40]

1.5.2 Geenisiru-sekvenointitutkimus

Metyloituja sytosiineja vastaan kehitetyt vasta-aineet ovat 1980-luvun peruja, ja niiden avulla metylaatioastetta voidaan tarkastella immunologisin keinoin. Yleisimpiin vasta-ainemenetelmiin kuuluvat mm. mikroarrayt sekä aiemmin myös next-generation sequencing (NGS). Niiden hyviä puolia on, että koko genomin metylomi on kerralla tarkasteltavissa, kun taas metyyli-sensitiivinen restriktio ja bisulfiittimenetelmä sopivat paremmin yksittäisten geenilokaatioiden tarkasteluun. [33,40]

DNA-mikroarray on DNA-hybridisaatiomenetelmä, jossa normaaleista ja häiriintyneistä soluista eristetty mRNA käännetään cDNA:ksi ja leimataan fluoresoivalla värillä. Sekoitettut näytteet ladataan geenisirulle, jonka kuoppien pohjilla oleviin oligonuklotidipätkiin näytteet sitoutuvat vaihtelevasti. Fluoresenssisignaalikuvioista voidaan päätellä, mitkä geenit ovat aktiivisia kummassakin solutyypissä. Menetelmän etuja ovat hyvä suorituskyky ja alhainen hinta, mutta haittoja mm. koettimien epäspesifisyys, eikä menetelmä sovi kaikkien geenimuutosten tarkasteluun. [33,41]

NGS käsittää useita korkean suoritustehon menetelmiä (Illumina, SOLiD, Roche 454 ym.), jotka ovat tehokkaampia perinteiseen Sanger-sekvenointiin verrattuna. NGS-menetelmällä on mahdollista sekvenoida samanaikaisesti useita eri DNA- ja RNA-pätkiä, ja se on menetelmänä suhteellisen edullinen. Menetelmiä on käytetty mm. tutkimaan muutoksia geenien toiminnassa ja luonnehtimaan epigenomia, kuten metylaatiota ja histoniasetylaatiota. Ne soveltuvat kuitenkin huonosti sellaisten alueiden tarkasteluun, jotka sekvenoituvat huonosti mm. runsaan GC-sisällön vuoksi. [33,42,43]

1.5.3 Bisulfiittisekvenointi

Metylaation tärkeyden ymmärtämiseksi on pitkään haluttu vertailla normaaleja ja syöpäsoluja keskenään metylaatioiden suhteen. Geenimetylaatioita tutkimalla on ajateltu olevan mahdollista löytää uusia karsinogeneesin biomarkkereita [35]. Paras menetelmä tähän on bisulfiittisekvenointi, joka on kuitenkin kallis menetelmä ihmisen koko genomin kattaviin karsinogeneesin tutkimuksiin ihmisen genomin koon vuoksi. Virusten pienille genomeille se sen sijaan sopii. [16]

Bisulfiittisekvenointi on menetelmä, jota kutsutaan varsinkin syöpien metylaatiotutkimusten ”kultaiseksi standardiksi” [33]. Sillä voidaan määrittää DNA:n metylaatiostatusta spesifisesti tai ei-spesifisti metyloidulle

DNA:lle suunniteltujen alukkeiden avulla [31,33,40] ja määrittää metylaatioasteita 100–1000 bp:n kokoisilta alueilta [33]. Menetelmässä on kaksi osaa, joista ensimmäinen on DNA:n bisulfinointi. Bisulfiittikäsittely vaikuttaa siten, että kemiallisten reaktioiden kautta DNA:n sytosiinit muuttuvat deaminaatiolla urasiiliksi, mutta 5-metyylisytosiinit säilyvät ennallaan. Jotta metylaatioita voitaisiin tämän jälkeen analysoida, hyödynnetään PCR:ää, jossa tymiinit korvaavat urasiilit ja sytosiinit korvaavat metyloidut sytosiinit. Tämä johtaa siihen, että tavallisen neljäemäksisen DNA:n sijaan tuotoksena saadaan kolme-emäksistä DNA:ta, kun lähes kaikki sytosiinit ovat korvautuneet tymiinillä. Jäljellä olevista sekvensseistä löytyvät tällöin vain A, G ja noin 50 % T. Lisäksi käsitellyn DNA:n sulamispiste laskee, kun GC-määrä laskee. Tällöin näytteiden analysoinnissa voidaan käyttää myös sulamiskäyrää. [33,40] Menetelmä on halpa, toistettava ja sillä on korkea resoluutio [33]. Bisulfiittimenetelmän vaikeudet kohdistuvat ennen kaikkea paljon aikaa vaativaan työhön, sopivien koettimien ja alukkeiden suunnitteluun, mutta yhtä lailla myös epätäydelliseen metyloimattomien sytosiinien kääntämiseen urasiiliksi. Yhdessä nämä haitat ovat vähentäneet menetelmän suosiota, ja esimerkiksi endonukleasipohjaiset menetelmät ovat ajaneet niistä paikoin ohi. Bisulfiittimenetelmä liittyy yksittäisten geenipätkien metylaatiomuutosten tarkkailuun, joten tutkimuksissa olisi syytä myös todistaa tilastotieteellisin keinoin metylaatiomuutosten yhteys HPV-infektioon.

Pyrosekvenointi (PSQ) on bisulfinointi-PCR:ää seuraava sensitiivinen, usein metylaatiotutkimuksissa käytetty menetelmä, joka soveltuu tutkimuksiin, joissa DNA-määrät ovat pieniä, eivätkä ehkä laadultaan parhaita [33,35]. Sillä saadaan erotuksena muihin menetelmiin kvantitatiivista tietoa CG-alueiden emäksistä. Menetelmä perustuu siihen, että emästen lisäyksen yhteydessä vapautuu pyrofosfaattia, joka muutetaan ATP:ksi. ATP ajaa puolestaan lusiferiinin muuttumista lusiferaasiksi, mistä vapautuu valoa mittauslaitteen havaittavaksi. Pyrosekvenoinnin hyviä puolia on, että heterogeenisestä DNA-seoksesta on mahdollista saada hyvät, kvantifioidut tulokset, voidaan käsitellä useita CpG-motiiveja kerralla ja käyttää kerralla useita laatukontrolleja. [32]

1.6 Syventävän työn tavoite

E2BS-alueiden metylaation puute voi edesauttaa E2-proteiinin sitoutumista niihin URR-alueella, mikä puolestaan aktivoi onkogeeneinakin tunnettujen E6- ja E7-proteiinien transkription [1,7,13,14,27,31,32]. Tämän työn tavoitteena oli toistaa Chaiwongkotin ym. [1] menetelmä, jolla voidaan havaita tutkittavana olevasta HPV-infektoidusta solulinjasta viruksen LCR-alueen E2-sitoutumisalueiden (E2BS) mahdolliset metylaatiomuutokset. Näiden syventävien ulkopuolisena jatkotavoitteena on, että tällä metylaatiomenetelmällä tullaan osoittamaan mahdollinen metylaatio tai sen puute ns. HUPA (suomalaisten perheiden HPV-tutkimus) -projektin potilasnäytteistä.

Koska HUPA-tutkimuksessa on käytetty harjausnäytteitä suu- ja sukuelinalueelta, on valitun metylaatiomenetelmän yksi pääkriteereistä ollut se, että metylaatioita voidaan tutkia pienestä näytelmäärästä. Menetelmän pystytyksen mallina on käytetty Chaiwongkotin ym. [1] kuvaamaa menetelmää. Kyseessä on bisulfinointiin ja pyrosekvenointiin perustuva menetelmä. Nämä menetelmät soveltuvat analysoimaan myös parafiiniin säilöttyjä pieniä potilasnäytteitä, joissa DNA voi olla frakmentoitunutta [33,35]. Menetelmän (Chaiwongkotin ym. [1]) käytettiin kahta HPV16-positiivista solulinjaa, ja tarkoituksena oli osoittaa niissä samankaltainen metylaatioaste kuin alkuperäistyössä oli kuvattu.

2. Materiaalit ja menetelmät

2.1 Solulinjat

Työssä käytettiin kahta kohdunkaulan syövästä eristettyä HPV16-positiivista solulinjaa. CaSki-solut ovat kromosomistoltaan aneuploidisia ja sisältävät kukin yli 600 HPV16-DNA-kopiota [26]. SiHa-soluissa HPV16-kopioita on vain noin 1-2 kopiota per solu. [26] Molemmista solulinjoissa HPV16 on integroituneena, mutta CaSki-soluissa E2-alue on säilynyt ehjänä, kun taas SiHa-soluissa E2 on osittain pikkoutunut. Solut olivat kaupallisesti hankittuja ATCC-linjoja (American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, USA).

2.1.1 Solujen herättäminen ja kasvatus

Kaikki solulinjat oli varastoitu dimetyylisulfoksidissa (DMSO) nestetyypeen. Soluampullit herätettiin sulattamalla ampullit vesitilkassa, minkä jälkeen ampullin sisältö siirrettiin 9 ml:iin DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 15 ml:n fuugiputkessa. Putki fuugattiin 5 min 1000 rfc, minkä jälkeen solupelletti suspensoitiin 1 ml:iin DMEM:iä, joka siirrettiin kokonaisuudessaan 75 cm³:n kasvatuspulloon (10 ml DMEM).

Soluja kasvatettiin 75 cm²:n pulloissa, joissa oli 10 ml DMEM-mediumia (10 % FBS, 1 % NEAA). Pulloja kasvatettiin lämpökaapissa (37 °C, 5 % CO₂). Medium vaihdettiin kahden päivän välein ja soluja siirrostettiin uusiin pulloihin, kun konfluenssi läheni 80 %:a.

2.2 Solujen kasvatus ja DNA-eristys

DNA-eristystä varten soluja kasvatettiin 2x75 cm² pulloa. Kun pullot olivat noin 80 %:sti konfluentteja, solut kerättiin. Vanha medium poistettiin, soluja huuhdottiin 2x 5 ml 1x PBS-liuoksella, lisättiin 2 ml 1x trypsiiniä ja pullojen annettiin inkuboitua 37 °C 15 min. Tämän jälkeen solut suspensoitiin varoen 8 ml:iin tuoretta DMEM-mediumia. Solut fuugattiin alas 15 ml:n fuugiputkessa (1000 rfc 5 min). Tämän jälkeen solupelletti säilöttiin jälle odottamaan eristystä.

DNA-eristys tehtiin käyttäen korkeasuolapitoista eristysmenetelmää [45]. Kaikki medium poistettiin niin hyvin kuin mahdollista pipetillä. Solupelletti suspensoitiin 2x 500 µl Lysis-puskuriin, ja suspensio siirrettiin 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen. Suspensioon lisättiin 30 µl proteinaasi K:ta (10 mg/ml, Roche), ja Eppendorf-putken annettiin inkuboida yön yli vesihauteella (37 °C). Seuraavana päivänä suspensioon lisättiin 300 µl kyllästettyä NaCl-liuosta (n. 6 M) ja vorteksoitiin, kunnes putkeen ilmestyi valkea proteiinisakka. Seuraavaksi fuugattiin täydellä teholla 15 min, minkä jälkeen supernatantti siirrettiin 15 ml:n Falcon-putkeen, jossa oli 2,4 ml absoluuttista etanolia. Sisältöä sekoitettiin kääntelemällä putkea, kunnes DNA saostui rihmaksi, joka poimittiin lasisella pasteur-pipetillä Eppendorf-putkeen, jossa oli 1 ml 70 % EtOH. Putkea vorteksoitiin ja fuugattiin täysillä 5 min. Supernatantti poistettiin ja DNA:n annettiin kuivua avonaisessa putkessa vetokaapissa noin puoli tuntia. Lopuksi DNA liuotettiin 50 µl:aan vettä ja annettiin putken inkuboitua huoneenlämmössä kevyessä ravistelussa noin puoli tuntia.

DNA:n pitoisuus mitattiin spektrofotometrillä (Ultrospec 2100 pro, GE Healthcare) 1:50-laimennoksesta (2 µl DNA + 98 µl vettä). Puhtausasteen (260/280) oli osuttava välille 1.6–1.9, jotta käytettävä DNA olisi mahdollisimman vapaa reaktioita häiritsevästä epäpuhtauksista ja metylaatio voitaisiin suorittaa.

2.3 DNA-metylaatio ja pyrosekvenointi

2.3.1 Bisulfinaatiokäsittely

DNA-metylaatioiden tutkiminen aloitettiin suorittamalla bisulfinaatio, joka deaminoi yksijuosteisen DNA:n metyloimattomat sytosiinit urasiiliksi. Reaktio suoritettiin Methylamp™ DNA Modification Kitin (cat.no. P-1001-1, Epigentek) ohjeiden mukaisesti. Lyhyesti, CaSki- tai SiHa-soluista eristettyä DNA:ta määritettiin jokaiseen reaktioputkeen 200 ng:aa 24 µl:aan vettä (valmistettiin DNA-laimennos konsentraatiolla 40 ng/µl, josta otettiin 5 µl eli 200 ng, joka sekoitettiin 19 µl:aan vettä), johon lisättiin 1 µl kitin R1-reagenssia. Seosta inkuboitettiin vesihauteella 37 °C:ssa 10 min. Tämän jälkeen lisättiin 125 µl R1/R2/R3-liuosta per reaktioputki, vorteksoitiin ja inkuboitettiin kuumablokissa 65 °C:ssa 90–110 min. Inkubaation jälkeen lisättiin 300 µl R4 ja fuugattiin seos spinnauskolumnissa 30 s 12000 rpm. Sen jälkeen lisättiin 200 µl R5 ja fuugattiin uudelleen. Seuraavaksi lisättiin 50 µl R1/90 % EtOH -liuosta ja annettiin inkuboida RT 8 min. Fuugaus suoritettiin kuten edellä, minkä jälkeen suoritettiin pesut kahdesti lisäämällä 200 µl 90 %-sta EtOH:ia ja fuugaamalla ensimmäisen kerran 30 s ja toisella 1 min. Viimeiseksi DNA eluoiitiin lisäämällä 10–15 µl R6 ja fuugaamalla 30 s. Tämä 10–15 µl DNA:ta säilöttiin pakkasessa (-20 °C) PCR-ajoa varten, jos ajoa ei suoritettu heti.

Ylijäänyt R1/R2/R3-liuos säilöttiin pakkaseen (-20 °C) ja käytettiin aina kahden viikon sisällä valmistamisesta. Ennen käyttöä liuos sulatettiin huoneenlämmössä ja sitä vorteksoitiin 2 min. Ohjeissa ei ollut mainintaa sulattamiskertojen määrän rajoittamisesta, vain parasta ennen pvm.

2.3.2 Metylaatio-PCR

PCR-reaktioissa käytetyt alukkeet määräytyivät sen mukaan, oliko tuotetta tarkoitus käyttää kloonaukseen bisulfiittigenomisekvenointia varten vai pyrosekvenointiin. PCR-alukkeina käytettiin Chaiwongkotin ym. [1] kuvaamia alukkeita (taulukko 2). Alukkeiden kohdegeenit on esitetty taulukossa 3. Alukkeet ja koettimet tilattiin Thermo Fisher Scientificiltä (Waltham, MA, Yhdysvallat).

Reaktioseokset valmistettiin 50 µl:n tilavuuteen (x näytteiden määrä + pipetointivara) pipetoimalla yhteen:

- 5 µl 10x PCR-puskuria
- 8 µl 1.25 mM dNTP
- 0.4 µl HotStarTaq-polymeraasia (Qiagen)
- 0.5 µl 25 µM forward- sekä reverse-alukkeita (taulukko 2)
- 31,1 µl vettä

Lopputilavuus saavutettiin lisäämällä reaktioseoksen valmistuksen jälkeen 5 µl bisulfinoitua DNA:ta. Putket spinnattiin nopeasti ennen ajoa. PCR-ajo suoritettiin kuten aiemmin kuvattu Chaiwongkotin ym. [1] mukaan (PCR-koneessa ohjelmalla "methylation"):

- denaturaatio 95 °C 5 min

- 50 sykliä: denaturaatio 94 °C 40 s, annealing 50 °C 30 s, ekstensio 72 °C 40 s
- loppuekstensio 72 °C 6 min
- 4 °C ∞.

Ajon jälkeen näytteet siirrettiin jääkaappiin odottamaan seuraavaa päivää, jolloin jatkettiin joko geelieristykseen ja kloonaukseen tai pyrosekvenointiin.

Taulukko 2. Bisulfinoidun DNA:n PCR- ja pyrosekvenointireaktioissa käytettävät alukkeet.

Aluke	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Koko (bp)
E2BS2-4	AAATTGTATATGGGTGTGTGTAAT	AACATTACAATTCTCTTTAATAAA	165
E2BS1	GTAATTGTGTTATGTAATAAAA	AATCAAAAAACAAAAATTTAACAC	178
E2BS1 (ampl.)	Bio-ATTGGTTGTGGTTATTTATTGTA	AAAAAACACATTTTATACCAAAAAAC	160
E2BS2-4 (ampl.)	TTGTAAAATTGTATATGGGTGTG	Bio-AAATCCTAAAACATTACAATTCTC	180

Taulukko 3. PCR-kohdesekvenssit, joille alukkeet on suunniteltu. Kohdesekvenssit katsottu HPV-genomisekvenssiä apuna käyttäen (liite 3).

E2BS	Sekvenssi	Sijainti (bp)
1	CGAATTCGGTTG	7453-7464
2	CGTTTTGGGTTA	7860-7871
3,4	ACCGAAATCGGTTGAACCGAAACCGGT	35-61

2.3.4 E2BS-alueiden pyrosekvenointi

Pyrosekvenointia varten bisulfinoidulle DNA:lle suoritettiin edellä kuvattu amplifikaatioreaktio (ks. 2.3.2 Metylaatio-PCR), mutta alukkeina käytettiin pyrosekvenointiin kohdistettuja, biotinyloituja amplifikaatioalukkeita (taulukko 2). Valmiit PCR-tuotteet testattiin ajamalla 5 µl:n suuruinen näyte agarosigeelillä (liite 1). Näytteisiin pipetoitiin 1/10-PCR-tilavuuden verran 6x Loading Dyeta (New England BioLabs, UK). Markkerina käytettiin Quick-Load® PCR Marker NO475S (New England BioLabs, UK). Geeliä ajettiin 94–100 V noin puolitoista tuntia. Bändien koko ja ajon onnistuminen tarkistettiin UV-pöydällä. Onnistuneet näytteet vietiin pyrosekvenointiin.

Näytteet puhdistettiin PyroMark Q24 Advanced -protokollan mukaan ennen kuin ne ajettiin PyroMark Q24 -laitteella (Qiagen) ohjemanuaalin mukaisesti tehdyllä ajo-ohjelmalla. Lyhyesti, puhdistus ja ajo suoritettiin seuraavasti:

- PCR-tuotteet immobilisoitiin sefaroosipartikkeleihin (biotinyloidut rakenteet tarttuvat partikkelien pintaan)
 - Valmistettiin Binding-mix (tämä perustilavuus kerrottiin näytteiden määrällä + pipetointivara): 40 µl Binding buffer (Qiagen), 2 µl Streptavidin Sepharose™-partikkeleita (lot 10008026, GE Healthcare), 18 µl MQ-vettä.
 - Binding-mixiä pipetoitiin syvälevykuoppaan 60 µl per näytekuppa ja niihin lisättiin 20 µl PCR-tuotetta spesifioituihin kuoppiinsa.
 - Levy suljettiin teippaamalla päältä, minkä jälkeen levyä ravisteltiin 1400 rpm 10 min.

- PyroMark Q24 -kasettiin ladattiin koneen kutakin ajoa varten määrittelemä määrä huoneenlämpöistä entsyymiä, substraattia sekä nukleotideja (PyroMark Q24 Advanced Reagents 4x24, Qiagen).
- Annealing-reaktiota varten valmistettiin sekvenointialukkeista laimennokset
 - alukkeet laimennettiin aluksi MQ-vedellä pitoisuuteen 10 µM. Tätä laimennosta käytettiin varsinaisten ajolaimennosten valmistukseen, jossa pipetoitiin yhteen 24,25 µl Annealing Bufferia (Qiagen) sekä 0,75 µl 10 µM alukelaimennosta (tällöin loppukonsetraatio 0,375 µM). Joka alukkeelle tehtiin oma laimennosseoksensa. Jälleen kunkin reagenssin määrä kerrottiin ajettavien näytteiden määrällä plus yksi pipetointivara.
 - PyroMark Plate PCR-levylle (Qiagen) pipetoitiin näitä laimennoksia 25 µl per ajettava näyte.
- Kumpikin levy vietiin PyroMark Q24 Vacuum Workstationille (Qiagen), missä DNA-näytteiden siirto ja puhdistus suoritettiin
 - Sepharose-kuopat imettiin tyhjiin ”siilillä” ja kuoppiin lisättiin vielä 100 µl MQ-vettä, joka imettiin (taulukossa 9 on esitetty aiheeseen liittynyt ongelma). Tällä varmistettiin, että kaikki partikkelit sitoutuneen DNA:n kera saatiin irti kuopista.
 - ”Siili” siirrettiin altaaseen, jossa oli 70 % EtOH, ja imettiin 5 s
 - Siirto Denaturation-altaaseen, jossa pidettiin 5 s
 - Siirto 1x Washing buffer -altaaseen, jossa pidettiin 10 s
 - Nosto yläasentoon, jotta viimeisetkin nestetipat valuisivat letkusta pois
 - Siirto PCR-levyn ylle (aina oli muistettava tarkistaa, että näytepiikit tulivat oikeiden alukekuoppien ylle) ja sammutettiin imu ennen levykosketusta, huljuteltiin 10 s
 - ”Siili” nostettiin pois ja huuhdeltiin ohjeen mukaisesti vesialtaissa 4, 5 ja 6
- PCR-levy vietiin lämpölevylle inkuboitumaan 5 min 80 °C, josta se siirrettiin välittömästi ajolaitteeseen ja ajo käynnistettiin valitsemalla USB-tikulle tallennettu ajo-ohjelma. Ajo-ohjelmassa pohjaksi valittiin CpG-assay ja käytettiin PyroMark Q24 Advanced Instrument metodia numero 006. Ajojen suunnitteluun ja analysointiin käytettiin PyroMark Q24 Advanced 3.0.0 -ohjelmaa.

Ohjelma vertasi tuloksia automaattisesti GenBankin HPV16 16W12E-variantin DNA-sekvenssistä (Chaiwongkot ym. [1]; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF125673.1>) sekvesointialukkeiden avulla manuaalisesti selvitettyihin sekvensseihin (taulukko 4).

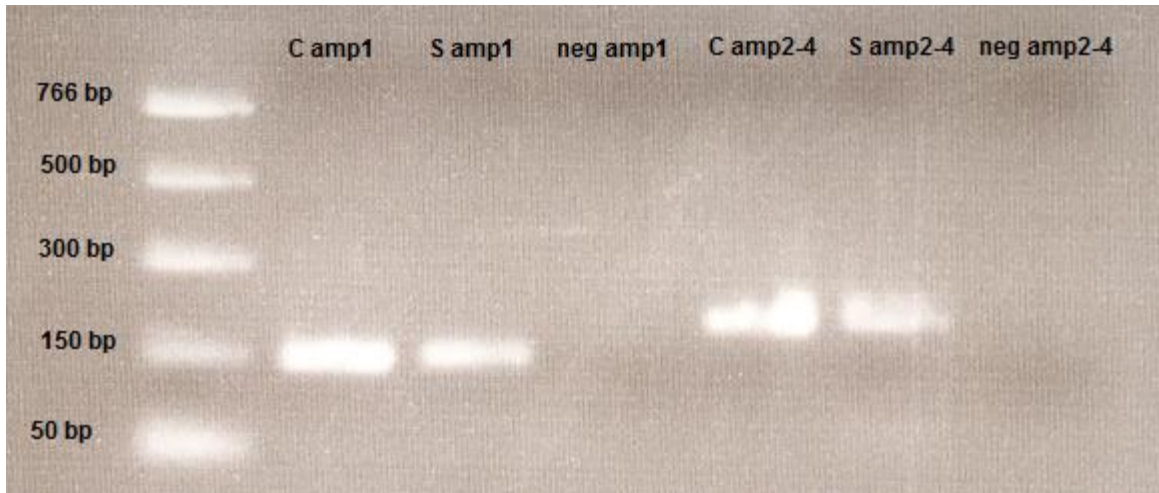
Taulukko 4. Pyrosekvenoinnin verrokkisekvenssit E2BS-alueille. Y=pyrimidiiniemäs (sytosiini, tyymiini, urasiili), R= puriiniemäs (guaniini, adnosiini)

E2 binding site	Sekvenssi ennen bisulfinointia (5'→3')	Analysoitava sekvenssi (5'→3')
E2BS1	AACCGAATTCGGTTGAAGCTACAAAATGGCCGCT GGCGCTACAAAATTTAGTATATATAAAACAAAAC AGGATGTAGCAAATATAGTTTATATACAATGA	AACCRAATTCRATTAATAACTACAAAATAACCRCT AACRCTACAAAATTTAATATATATAAAACAAAAC AAAATATAACAAATATAATTTATATACAATAA
E2BS2	CGTTTTGGGTTACACATTTACAAGCAACTTATATAA TAATACTA	YGT TTTGGGTTATATATTTATAAGTAATTTATATA ATAATATTA
E2BS3-4	CGTAACCGAAATCGGTTGAACCGAAACCGGTTAG TATAAAAGCAGACATTTTATGCACCAAAGAGAAC T	YGTAATYGAAATYGGTTGAATYGAAATYGGTTA GTATAAAAGTAGATATTTTATGTATTAAGAG AATT

3. Tulokset

3.1 Metylaatio-PCR bisulfinoidulle DNA:lle kohdistetuilla alukkeilla

Kuvasta 4 nähdään E2BS1- ja -2-4-amplifikaatioalukkeiden tuotteiden muodostus. Sekä CaSki- että SiHa-solujen kohdalle muodostuu E2BS1-näytteiden kohdalle kirkastumat noin 150–160 bp:n kohdalla (taulukko 2). E2BS2-4-näytteissä vastaavanlaiset kirkastumat ovat noin 180 bp:n kohdalla.



Kuva 4. Pyrosekvenointiin amplifikoitujen näytteiden geeliajo, jossa nähdään E2BS1- ja -2-4-tuotteiden muodostuminen. C= CaSki, S= SiHa, neg= negatiivinen kontrolli.

3.2 Pyrosekvenointi ja E2BS-alueiden metylaatiokuviot

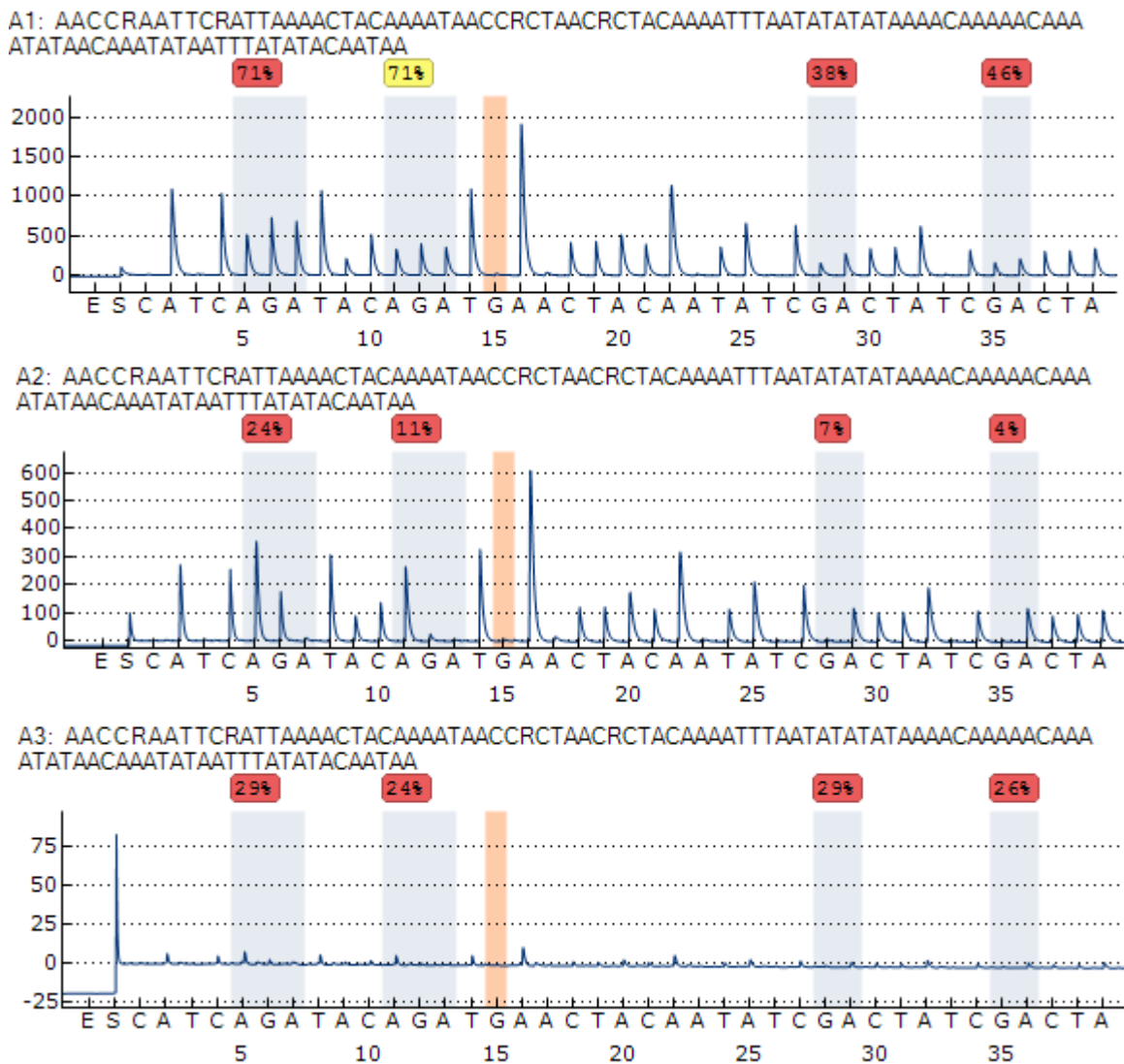
CaSki- ja SiHa-solujen konsentraatio bisulfinaation alussa oli noin 200 ng/ 24 µl, joka on optimimäärä, jonka menetelmä kerrallaan pystyy luotettavasti käsittelemään. Keskimääräiset metylaatioasteet on esitetty taulukossa 5. CaSki-solujen E2BS1-alueen potentiaalien metyloituvien nukleotidien metylaatioaste oli noin neljäkymmentä prosenttia, kun SiHa-soluilla aste jäi alle kymmeneen prosenttiin. CaSki-solulinjassa hajontaa esiintyi enemmän ja varianssi oli korkeampaa, kun taas SiHa-solulinjassa vaihtelu olivat tasaisempia ja hajonta marginaalista. Yleisesti hajonta vaihteli vähän, korkeimmillaankin korkeintaan neljä prosenttiyksikköä.

E2BS2-alueen metyloitumisprosentit olivat kummallakin solulinjalla alhaiset, CaSki-soluilla yli kymmentä prosenttia ja SiHa-soluilla lähes olematonta. Hajonta näytteiden välillä oli kummankin solulinjan kohdalla hyvin vähäistä ja tulokset toistuivat samanlaisina.

Keskimääräiset metylaatioasteet olivat korkeimmat CaSki-solulinjalta eristetyn DNA:n E2BS3-4-alueella, jolla metylaatio oli poikkeuksetta yli yhdeksänkymmenen prosentin ja usein lähellä sataa. SiHa-solulinjan vastaavat tulokset jäivät aina alle kymmeneen prosenttiin. Näiden E2BS-alueiden varianssit olivat kuitenkin suurimmat kaikista tutkituista alueista ja keskihajonta vaihteli 5-9 prosenttiyksikön verran.

Taulukko 5. Pyrosekvenointitulokset E2BS-alueiden metylaatioasteista solulinjoittain kolmena eri aikana eri näytteistä tehdyistä ajoista.

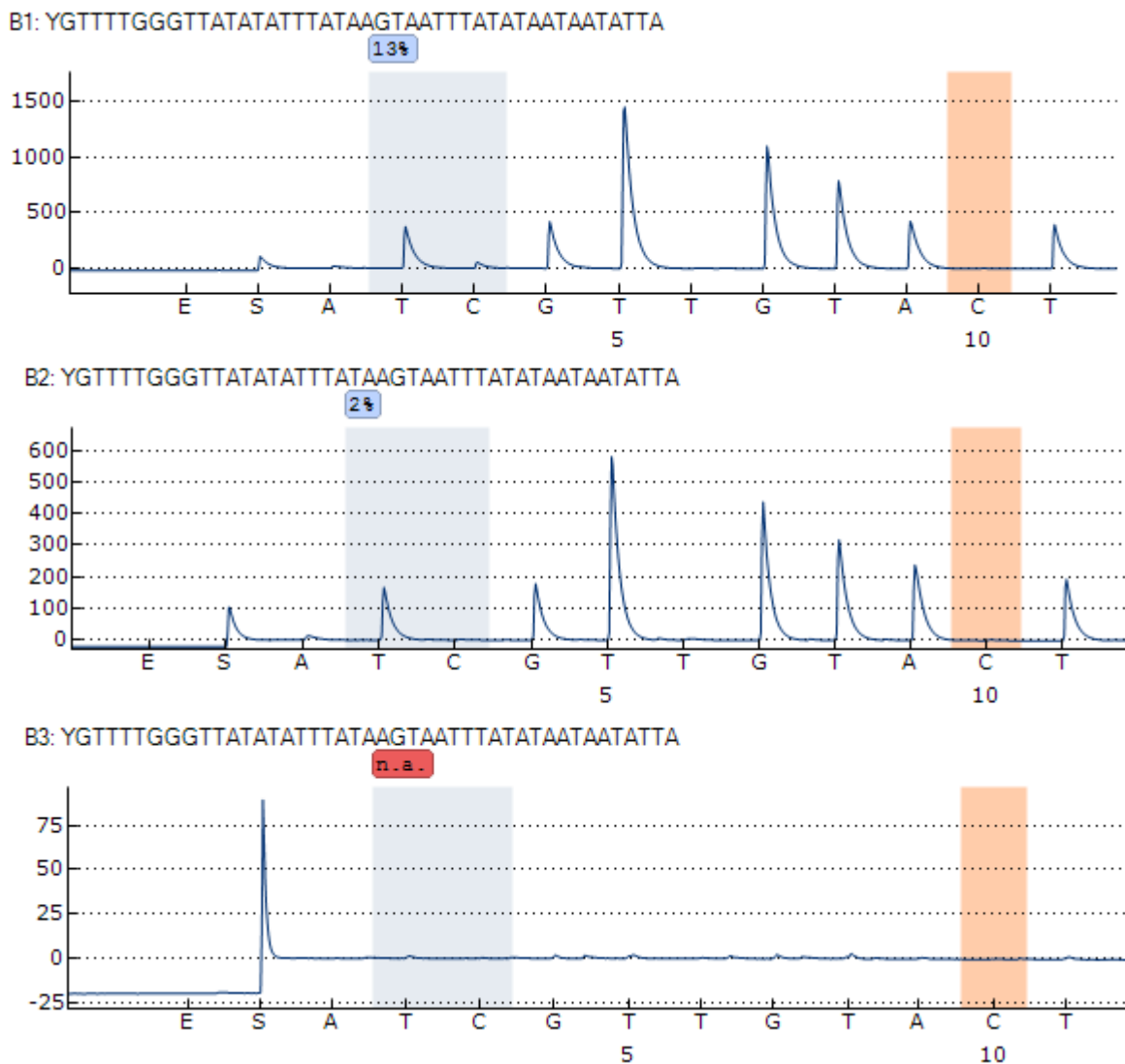
Solulinja, E2BS, nukleotidi	Pyroseqv. ajoja	Keskimääräinen metylaatioprosentti (%)	Varianssi (σ^2)	Keskihajonta (D)	Huomioitavaa
CaSki, E2BS1	3				
7453	3	38	17	$\pm 4,1$	geenialueiden metylaatioaste virhemarginaalien sisällä
7459	3	42	19	$\pm 4,3$	
SiHa, E2BS1	3				
7453	3	7	0,3	$\pm 0,6$	
7459	3	4	2	$\pm 1,4$	
CaSki, E2BS2	3				
7860	3	13	0,3	$\pm 0,6$	
SiHa, E2BS2	3				
7860	3	2	2	$\pm 1,4$	
CaSki, E2BS3-4	3				
37	3	92	41	$\pm 6,4$	
43	3	96	30	$\pm 5,5$	
52	3	94	42	$\pm 6,5$	
58	3	99	11	$\pm 3,3$	
SiHa, E2BS3-4	3				
37	3	8	61	$\pm 7,8$	
43	3	5	67	$\pm 8,2$	
52	3	8	33	$\pm 5,7$	
58	3	8	42	$\pm 6,5$	



Kuva 5. Esimerkkikuvaaja E2BS1 -alueen metylaatioasteista. Ylin grammi: CaSki. Keskimmäinen grammi: SiHa. Alin grammi: negatiivinen kontrolli. Ajogrammien yllä punaisissa, keltaisissa tai sinisissä laatikoissa ovat metylaatio prosentit. Sininen=materiaalin metylaatioaste luotettavasti analysoitu; keltaisella= analyysissa lievää epävarmuutta; punainen=epäluotettava analyysi (vaikeuksia sekvenssin analysoinnissa tai materiaalia ei ollut riittävästi). Huomioitavaa on, että kontrollista saatiin laskennalliset arvot, vaikka käyrä itsessään ei ilmaissut DNA:n läsnäoloa.

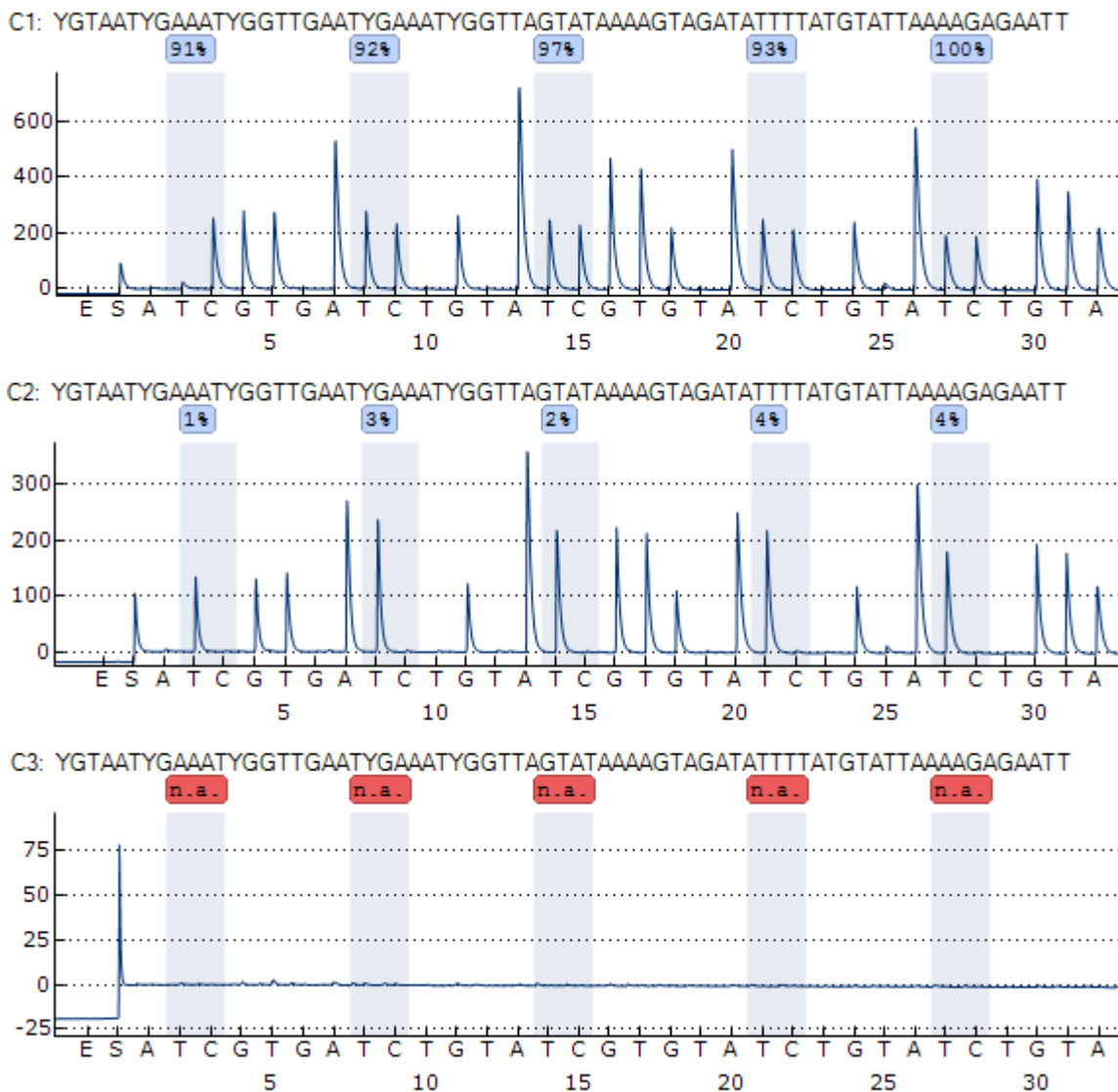
Pyrosekvenointituloksien perusteella E2BS1-alueella todettiin neljä potentiaalista CpG-aluetta, joista kaksi ensimmäistä olivat pääosin vahvasti metyloituneita (kuva 5). Näistä nukleotideja 7453 ja 7459 vastaavat kaksi viimeistä CpG-motiivia.

Tulosten mukaan E2BS2-alue on erittäin heikosti metyloitunut CpG-alueen nukleotidin 7860 kohdalla. Grammien metylaatioasteista (kuva 6) havaitaan CaSki-solujen HPV-sekvensseissä tämä E2BS-alue noin kymmenessä prosentissa metyloituneeksi. On kuitenkin huomioitavaa, ettei E2BS2-alueella alukkeen sitoutuminen kohteeseensa ollut paras mahdollinen. Asiasta konsultoitii Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) asiantuntijaa FT Marjo Haanperää, mutta syytä ilmiölle ei saatu varmuudella selvitettyä. Koska käyrä ei kuitenkaan itsessään osoita merkkejä nukleotidien läsnäolosta kontrollissa, tämän pitäisi mahdollistaa tulosten luotettavan käytön.



Kuva 6. Esimerkkikuvaaja E2BS2 -alueen metylaatioasteista. Ylin grammi: CaSki. Keskimmäinen grammi: SiHa. Alin grammi: negatiivinen kontrolli. Sininen=luotettavasti arvioitu; punainensella näkyvä arvo (n.a.) = kertoo, ettei kontrollinäytteestä ole löytynyt analysoitavaa materiaalia.

E2BS3- ja -4 -alueilla todetaan viisi potentiaalista CpG-metylaatiopaikkaa (E2BS-alueita neljä nukleotidien 37, 43, 52 ja 58 kohdalla). Näiden alueiden metylaatioasteet olivat korkeat (CaSki-soluissa 90–100 %, mutta SiHa-soluissa 1-8 %) (kuva 7).



Kuva 7. Esimerkkikuvaaja E2BS3-4 -alueen metylaatioasteista. Ylin grammi: CaSki. Keskimmäinen grammi: SiHa. Alin grammi: negatiivinen kontrolli. Sininen= näytteistä on löydetty luotettavalla tasolla analysoitavaa näytettä; punainen (n.a.)= kontrollinäytteestä ei ole löytynyt analysoitavaa materiaalia.

4. Pohdinta ja johtopäätökset

Tässä syventävien opintojen työssä oli tarkoituksena toistaa Chaiwongkotin ja työryhmän metylaatiotutkimustulokset [1] käyttäen HPV16-positiivisia CaSki- ja SiHa-solulinjoja ja siten pystyttää tutkimusmenetelmä tuleville tutkimuksille.

Metylaatioasteet

E2SB1: CaSki-soluissa todettiin keskimäärin 38 %:n metylaatio nukleotidin 7453 kohdalla ja 42 % nukleotidille 7459. SiHa-soluissa vastaavat metylaatioasteet olivat 7 % ja 4 %. Metylaatiotulokset vastasivat Chaiwongkotin ym. [1] työssä saavutettuja metylaatioasteita: E2BS1-alueen nukleotidin 7453 kohdalla metylaatioaste oli 35–70 % ja nukleotidilla 7459 60–100 %. Tässä projektissa nukleotidin 7453 kohdalla saavutettiin vastaava alaraja, mutta nukleotidin 7459 kohdalla jäätiin alle (taulukko 5).

E2BS2: E2BS2-alueen metylaatioasteet olivat tässä työssä CaSki-soluissa keskimäärin 13 % ja SiHa soluissa 2 %, ja vastasivat Chaiwongkotin ym. [1] tuloksia, 0-20 %. Tämä alue oli vain vähäisissä määrin metyloitunut huolimatta siitä, oliko kyseessä CaSki- vai SiHa-solulinja. Huomioitavaa on kuitenkin, että E2BS2-alueen pyrosekvenointigrammit poikkesivat ulkonäöllisesti muiden E2BS-alueiden vastaavista. Asiasta konsultoitiiin THL:n asiantuntija Marjo Haanperää, jonka mukaan ne olivat kuitenkin luotettavasti tulkittavissa, koska negatiivinen taso pystyttiin määrittämään ja pyrosekvenointilaitte kykeni määrittämään näytteistä luotettavalla tasolla mitattavaa DNA:ta.

E2BS3-4: CaSki-soluissa E2BS3-4-alueet olivat keskimäärin runsaasti metyloituneina, 90–100 %, ja SiHa-soluissa geenien metyloituminen on erittäin vähäistä, 5-8 %. Hajonta oli muihin E2BS-alueisiin verrattuna hieman runsaampaa. Chaiwongkotin ym. [1] tuloksissa E2BS3-4-alueiden metylaatioaste vaihteli solutyypistä riippuen välillä 30–100 %. Aiempien tutkimusten mukaan CaSki ja SiHa solulinjoissa E2BS3-4-alueen ensimmäinen metyloitunut alue on suurella todennäköisyydellä SP1-alue [1,14,27].

Chaiwongkot ym. [1] totesivat tutkimuksessaan, että E2BS-alueiden metylaatioasteet vaihtelevat sen mukaan, kuinka iso HPV-genomin kopioluku solulinjassa on ja onko virus integroitunut isännän genomiin vai toimiiko se episomaalisesti, selittäen näiden solulinjojen metylaatioasteiden eron. Metylaatiotaso oli alhaisempi, jos virusgenomi oli integroitunut, kun taas episomaalisessa monistumisessa metylaatioiden taso oli korkeampi. Korkein metylaatiotaso todettiin, jos soluissa oli sekä korkea kopioluku että integraatio genomiin. Tässä syventävien opintojen työssä tulokset noudattivat pääosin Chaiwongkotin tuloksia, mutta huomioitavaa on, että E2BS1-alueen primerien pyrosekvenointitulokset jäivät pyrosekvenointilaitteen lukukyvyn virhealueella, eikä tuloksien luotettavuutta näiltä osin voitu siten varmistaa. Lisäksi vaikka työssä käytettiin samoja solulinjoja, ne ovat voineet muuttua geneettisesti useiden jakovaiheiden jälkeen.

Työssä kohdatut ongelmat

E2BS1-alueen virhemarginaalitulokset. Ongelmana oli, että E2BS1-alueen pyrosekvenointitulokset jäivät pyrosekvenointilaitteen lukukyvyn virhealueelle, eli laitteella oli vaikeuksia löytää näytteistä luotettavassa määrin hyväkuntoista, analysoitavaa materiaalia. Ensimmäisessä vaiheessa varmistettiin DNA:n optimimäärän käyttö reaktioissa, joka saatiin toteutumaan käyttämällä sopivaa laimennusmenetelmää. Alukkeiden sekvenssien (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA) yhtenevyys Chaiwongkotin tutkimusryhmän [1] kanssa myös varmistettiin. Koska vastaavaa ei todettu E2BS2- ja -3-4 -alukkeilla,

ongelma alukkeiden yleisessä käsittelyssä oli epätodennäköinen. Mikäli kyse olisi bisulfinaation epäonnistumisesta, olisi ollut todennäköistä, että alukkeet eivät olisi tunnistaneet kohdettaan kloonauksessa vajavaisen bisulfinaation vuoksi, ja tällöin pyrosekvenointiin E2BS2-4-alueelle suunniteltujen alukkeiden ei olisi pitänyt toimia. Mahdollinen selittävä tekijä voi olla Brentnall ym. [20] esittämä hypoteesi, jossa he esittivät koeasetelmissa alukeongelmien mahdollisena selityksenä deleetiota, joka voisi aiheutua esimerkiksi insertin asettuessa genomiin. Bradsma ym. [16] taas esittävät mahdollisena syynä tutkittavien alueiden korkeaa A/T-pitoisuutta, mikä aiheuttaa sekundaarirakenteita.

Koeasetelman toisto. Tämän syventävän opintojen koeasetelmia pyrittiin toistamaan myöhemmin, jolloin pyrosekvenointi osoittautui ongelmalliseksi, eikä metylaatiotasoa kyetty toistamaan. Kontrollit ovat olleet kunnossa, mutta metylaatiotasot eivät ole nousseet enää yhtä korkealle kuin tämän työn aikana. Alukkeista oli saatu tulos ja geelit olivat kunnossa, joten syyn selvitys kohdistui pyrosekvenointiin, ja asiaa yritettiin ratkaista jälleen THL:n asiantuntijan Marjo Haanperän kanssa selvää syytä löytämättä. Mahdollisia syitä voivat olla laiteongelmat. Toisaalta jos DNA:n kunto ja primerien elinvoimaisuus on ollut huono, eli työskentelyssä on käytetty vanhoja, aikaa sitten laimennettuja reagensseja, menetelmän tarkkuus on voinut kärsiä. Lisäksi DNA:n siirto sefaroosipartikkeleihin on kohta, joka herkästi vaikuttaa menetelmän toimivuuteen.

Johtopäätökset

Johtopäätöksen voidaan todeta, että tässä syventävien opintojen työssä saatiin pääosin toistettua Chaiwongkotin [1] CaSki- ja SiHa-soluilla saadut tulokset solujen metylaatiosta: E2BS-alueiden metylaatio oli verrannollinen HPV:n suureen kopiolukuun. Vähäisin merkitys oli E2BS2-alueella, kun taas E2BS1- ja E2BS3-4-alueet olivat vahvemmin metyloituneet. Menetelmällisesti haastavinta oli pyrosekvenointia edeltävässä bisulfinoituvaiheessa sekä pyrosekvenointitulosten analysoinnissa ja vertailusekvenssien tuottamisessa, jossa tulevaisuudessa onkin hyvä tutkimusyhteistyönä konsultoida asiaan perehtynyttä henkilöä.

Kiitokset

Kiitos Turun yliopiston hammaslääketieteen yksikön suupatologian laitokselle, ohjaajana toimineelle Jaana Rautavalle, asiantuntija Stina Syrjäselle mahdollisuudesta suorittaa syventävien opintojen työ palkallisena kesätyönä.

Katja Sampalahdelle (Turun yliopisto, Hammaslääketieteen yksikkö, suupatologian laitos) kiitos soluviljelyavusta sekä Tatjana Peskovalle (Turun yliopisto, Hammaslääketieteen yksikkö, suupatologian laitos) laboratorio-opastuksesta. Kiitokset myös Terveysten- ja hyvinvoinnin laitokselle (THL) mahdollisuudesta käyttää pyrosekvenointilaitetta sekä Marjo Haanperälle laitteen käyttöopastuksesta sekä analysointiavusta.

Lähteet

- [1] Chaiwongkot A, Vinokurova S, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kleebkaow P ym. Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *Int J Cancer* 2013; 132: 2087–94.
- [2] Gama RR, Carvalho AL, Filho AL, Scorsato AP, López RV, Rautava J ym. Detection of human papillomavirus in laryngeal squamous cell cancer: systemic review and meta-analysis. *Laryngoscope* 2015; Nov 6. doi: 10.1002/lary.25738. [Epub ahead of print]
- [3] Rautava J, Syrjänen S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. *JADA* 2011; 142: 8: 905–914.
- [4] Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G ym. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis* 2011; 17: 58–72.
- [5] Mistry N, Simonsson M, Evander M. Transcriptional activation of the human papillomavirus type 5 and 16 long control region in cells from cutaneous and mucosal origin. *Virology J* 2007; 4: 27–30.
- [6] Nelke KH, Lysenko L, Leszczyszyn J, Gerber H. Human papillomavirus and its influence on head and neck cancer predisposition. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2013; 67: 610–6.
- [7] Rautava J, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head and Neck Pathol* 2012; 6: S3–S15.
- [8] Zhang E-Y, Tang X-D. Human Papillomavirus Type 16/18 Oncoproteins: Potential therapeutic targets in non-smoking associated lung cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2012; 11; 13: 5363–69.
- [9] Sand L, Jalouli J. Virus and oral cancer. Is there a link? *Microb Inf* 2014; 1–8.
- [10] Zandberg DP, Bhargava R, Badin S, Cullen KJ. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. *CA Cancer J Clin* 2013; 63: 57–81.
- [11] Boscolo-Rizzo P, Del Mistro A, Bussu F, Lupato V, Baboci L, Almadori G ym. New insights into human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2013; 33: 77–87.
- [12] Blitzer GC, Smith MA, Harris SL, Kimple RJ. Review of the clinical and biologic aspects of human papillomavirus-positive squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiation Oncol Biol Phys*, 2014; 88: 4: 761–770.
- [13] Jacquin E, Baraquin A, Ramanah R, Carcopino X, Morel A, Valmary-Degano S. Methylation of human papillomavirus type 16 CpG sites at E2-binding site 1 (E2BS1), E2BS2, and the Sp1-binding site in cervical cancer samples as determined by high-resolution melting analysis–PCR. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 10: 3207–15.
- [14] Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PloS ONE* 2011; 9; 6: e24451.
- [15] Erickson BK, Alvarez RD, Huh WK. Human papillomavirus: what every provider should know. *Gen Gyn* 2013; 169-175.

- [16] Brandsma JL, Sun Y, Lizardi PM, Tuck DP, Zelterman D, Haines GKI ym. Distinct Human Papillomavirus Type 16 Methyomes in Cervical Cells at Different Stages of Premalignancy. *Virology* 2009; 389: 100–7.
- [17] zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: Where and why. *Virol* 2009; 392: 1–10.
- [18] Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsagué X, Laparte L ym. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 2014; 15: 12: 1319–31.
- [19] Worsham MJ, Chen KM, Ghanem T, Stephen JK, Divine G. Epigenetic modulation of signal transduction pathways in HPV-associated HNSCC. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2013; 3; 149: 409–16.
- [20] Brentnall AR, Vasiljević N, Scibior-Bentkowska D, Cadman L, Austin J, Szarewski A ym. A DNA methylation classifier of cervical precancer based on human papillomavirus and human genes. *Int J Cancer* 2014; 6: 135: 1425–32.
- [21] Sun C, Reimers LL, Burk RD. Methylation of HPV16 genome CpG sites is associated with cervix precancer and cancer. *Gynecol Oncol* 2011; 121: 59-63.
- [22] Tribius S, Hoffmann M. Human papilloma virus infection in head and neck cancer. *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110: 11: 184–90.
- [23] Gillison ML, Alemany L, Snijders PJF, Chaturvedi A, Steinberg BM, Schwartz S ym. Human papillomavirus ja diseases of upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine* 2012; 30S: F34–F54.
- [24] Alberts B, Johnson J, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. Viides painos, 2008, Garland Science, s. 467–476.
- [25] Meissner J. Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *J Gen Virol* 1999; 80: 1725–33.
- [26] Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987; 6; 4: 962–71.
- [27] Snellenberg S, Schütze DM, Claassen-Kramer D, Meijer CJLM, Snijders PJF, Steenberger RDM. Methylation status of the E2 binding sites of HPV16 in cervical lesions determined with the Luminex® xMAP™ system. *Virology* 2012; 442: 357–365.
- [28] Kahla S, Kochbati L, Hammami S, Chanoufi MB, Maalej M, Oueslati R. Sequence variation in the E2-binding domain of HPV16 and biological function evaluation in Tunisian cervical cancers.
- [29] Vösa L, Sudakov A, Remm M, Ustav M, Kurg R. Identification and analysis of papillomavirus E2 protein binding sites in the human genome. *J Virol* 2012; 83: 1: 348–57.
- [30] Bhattacharjee B, Sengupta S. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology* 2006; 354: 280–285.

- [31] Reuschenbach M, Huebbers CU, Prigge ES, Bermejo JL, Kalteis MS, Preuss SF ym. Methylation status of HPV16 E2-binding sites classifies subtypes of HPV-associated oropharyngeal cancers. *Cancer* 2015; Epub ahead of print; doi: 10.1002/cncr.29315
- [32] Bryant D, Tristrama A, Lilogloub T, Hibbitsa S, Fiandera A, Powella N. Quantitative measurement of human papillomavirus type 16 L1/L2 DNA methylation correlates with cervical disease grade. *J Clin Virol* 2014; 59: 24-9.
- [33] Delpu Y, Cordelier P, Cho WC, Torrisani J. DNA methylation and cancer diagnosis. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 15029-58.
- [34] Lorincz AT, Brentnall AR, Vasiljević N, Scibior-Bentkowska D, Castanon A, Fiander A ym. HPV16 L1 and L2 DNA methylation predicts high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with mildly abnormal cervical cytology. *Int J Cancer* 2013; 133: 637-45.
- [35] Vasiljević N, Wu K, Brentnall AR, Kim DC, Thorat MA, Kudahetti SC ym. Absolute quantitation of DNA methylation of 28 candidate genes in prostate cancer using pyrosequencing. *Dis Markers* 2011; 30: 151-61.
- [36] Lleras RA, Smith RV, Adrien LR, Schlecht NF, Burk RD, Harris TM ym. Unique DNA methylation loci distinguish anatomic site and HPV status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 5444-55.
- [37] Berdasco M, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell* 2010; 19: 698-711.
- [38] Mirabello L, Sun C, Ghosh A, Rodriguez AC, Schiffman M, Wentzensen N ym. Methylation of human papillomavirus type 16 genome and risk of cervical precancer in a Costa Rican population. *J National Cancer Inst* 2012; 104: 556-65.
- [39] Brandsma JL, Harigopal M, Kiviat NB, Sun Y, Deng Y, Zelterman D ym. Methylation of twelve CpGs in human papillomavirus type 16 (HPV16) as an informative biomarker for the triage of women positive for HPV16 infection. *Cancer Prev Res* 2014; 7: 5: 526-33.
- [40] von Känel T, Huber AR. DNA methylation analysis. *Swiss Med Wkly* 2013; 143: w13799.
- [41] Glick BR, Pasternak JJ. *Molecular biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA.* Kolmas painos, 2003, ASM Press, Washington, s. 664-6.
- [42] Reis-Filho JS. Short communication. Next-generation sequencing. *Breast Cancer Res* 2009; 11; Suppl 3: S12.
- [43] Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2013; 98: 236-8.
- [44] Pattillo RA, Hussa RO, Story MT, Ruckert AC, Shalaby MR, Mattingly RF. Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science* 1977; 196; 4297: 1456-8.
- [45] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1998; 16; 3: 1215.

LIITE 1. Liuosohjeet

LB-agar-maljat (1 l)

10 g tryptone
5 g yeast extract
10 g NaCl
10 g agar

Ampisilliini 100 mg/ml (ampisilliinijauhe liuotettiin veteen ja suodatettiin 0.2 µm suodattimen läpi 1,5 ml:n eppareihin, jotka säilöttiin pakkaseen -20 °C)

Ainekset (ei antibiootti) punnittiin ja liuotettiin lopputilavuuteen 1 l MQ-vettä. Pullo autoklavoitiin 120 °C 10 min, jonka jälkeen sen annettiin jäähtyä lähes kädenlämpöiseksi hyytymistä tarkkaillen. Jäähtyneeseen LB-agarin lisättiin ampisilliinia (100 mg/ml) siten, että antibiootin loppukonsentraatio oli 50 µg/ml (litraa LB-agaria kohden tämä tarkoitti 2 ml ampisilliinistokkia). Agar valettiin maljoille (n. 20 ml per malja) ja annettiin jäähtyä. Maljat säilöttiin jääkaappiin ylösalaisin pusseihin pakattuina.

2-% EtBr-agarosigeeli

2 g agarosia
100 ml 1x EP-puskuria
10 µl EtBr

Agarosi punnittiin erlenmyeriin vaa'alla. Mittalasilla mitattiin 100 ml puskuria, joka sekoitettiin yhdessä agarosin kanssa. Seosta lämmitettiin mikrossa ja sekoitettiin aina välillä kunnes liuos oli kirkas ja homogeeninen. Liuosta jäähdytettiin hieman kylmän vesihanan alla kädenlämpöiseksi ennen etidiumbromidin lisäämistä. EtBr sekoitettiin joukkoon ja valmis liuos kaadettiin nopeasti ajokelkkaan, jossa oli sopivan kokoinen ajokampa. Geelin annettiin jähmettyä, minkä jälkeen kelkka purettiin ja geeli laitettiin ajolaitteeseen ajopuskuriin (1x EP) odottamaan ajoa.

LIITE 2. Valmiit metylaatiotyöohjeet

HPV methylation on E2 binding sites – Step-by-step procedure

DNA EXTRACTION:

- When using cell samples:
 - Suspend cells into 2x500 µl of Lysis buffer and transfer the suspension into a 1,5 ml Eppendorf tube.
 - Add 30 µl proteinase K (10 mg/ml) and seal the Eppendorf.
 - Let the tube incubate in a warm water bath (37 °C) over night.
 - Next day, add 300 µl of saturated NaCl. Vortex ~15 s until a white sediment appears.
 - Centrifuge the Eppendorf 12 000 rpm for 15 min.
 - Transfer the supernatant carefully into a 15 ml Falcon tube containing 2,4 ml of absolute ethanol. Turn the tube upsidedown until the DNA precipitates and appears "string-like".
 - Carefully pick the DNA up with a Pasteur pipette and transfer it into an Eppendorf containing 1 ml of 70 % ethanol.
 - Centrifuge 12 000 rpm for 5 min. Remove the supernatant and let the eppendorf dry open inside laminar for half an hour.
 - Dissolve DNA by adding 50 µl water (30 µl can be used if there is a suspicion that the concentration is very low). Incubate about half an hour in a gentle shaking.
 - Measure DNA concentration with UV spectrophotometer using a DNA dilution of 1:50 (2 µl DNA + 98 µl water) or 1:100 (1 µl DNA + 99 µl water), depending on if you wish to save your samples.
- When using samples molded in paraffine, see another procedure.

BISULPHITE REACTION (using Methylamp™ DNA Modification Kit by Epigentek):

- Follow the instructions given by the kit (with moderate alterations):
 - Use 50-200 ng on DNA. Prepare a proper dilution based on the DNA concentrations you have measured with UV spectrophotometer in a 1,5 ml Eppendorf into a final volume of 24 µl. There should be at least >50 pg DNA the modification to work. Check that the purity of DNA (260/280) sits between 1.6-1.9.
 - Add 1 µl of R1 from the kit, mix and incubate in 37 °C water bath for 10 min.
 - Prepare R1/R2/R3 mixture as instructed by the kit manual. Store it -20 °C if not used immediately (good up to two weeks).
 - Add 125 µl of R1/R2/R3 to each sample, vortex and incubate in 65 °C for 90 minutes.
 - Add 300 µl of R4 to each sample. Place the samples into 2 ml spin columns in collection tubes. Centrifuge at 12 000 rpm for **30 s** (kit advises 15 s, but table centrifuge cannot do this. Samples endure the increased centrifuge time til 1 min). Discard the flow-through.
 - Add 200 µl of R5 and centrifuge at 12 000 rpm for **30 s**. Discard flow-through.
 - Add 50 µl of R1/90 % ethanol and incubate 8 min at room temperature. Centrifuge at 12 000 rpm for 30 s. Discard flow-through.
 - Add 200 µl of 90 % ethanol and centrifuge at 12 000 rpm for **30 s**. Discard flow-through.

- Add another 200 µl of 90 % ethanol and centrifuge at 12 000 rpm for **1 min**.
- Place the columns in new 1, 5 ml Eppendorf tubes. Add 15 µl of R6 directly in the middle of the column filters and centrifuge at 12 000 rpm for **30s**.
- Store at -20 °C if not used in PCR at once.

BISULPHITE PCR:

- Prepare reaction master mixtures for each primer pairs separately and for negative control sample in 1, 5 ml Eppendorf tubes. Calculate the number of your samples and add one extra as a pipetting margin. Multiply the following PCR components with that number and mix together:
 - 5 µl of 10x PCR buffer
 - 8 µl of 1.25 mM dNTP
 - 0.4 µl of HotStarTaq polymerase (Qiagen) ← **add last!**
 - 0.5 µl of 25 µM forward primer (E2BS1 or E2BS2-4)
 - 0.5 µl of 25 µM reverse primer (E2BS1 or E2BS2-4)
 - water so that after adding DNA the final volume of the samples will be 50 µl
- Share from the master mixes (it should be 50 µl minus DNA now) into PCR Eppendorf tubes. Add:
 - bisulphinated DNA (as much you can get, 200 ng or less)
- Spin the samples quickly if air bubbles are seen.
- Place the samples in to a PCR machine. Run the samples using (User → Hupa →) “methylation” program (runtime approximately 3 h). The program view should be the following:
 - denaturation 95 °C 5 min
 - 50 cycles: denaturation 94 °C 40 s, annealing 50 °C 30 s, extension 72 °C 40 s
 - final extension 72 °C 6 min
 - 4 °C ∞.
- After the run, proceed with pyrosequencing or store your samples in a fridge +4-8 °C (max. one week) or freezer -20 °C (over one week).

PYROSEQUENCING:

- Check that the PCR run has succeeded and run a gel.
 - Prepare a 2 % agarose gel by mixing 2 g of agarose and 100 ml of 1x EP buffer in a 300 ml Erlen-Myer.
 - Warm it up in a microwave. Whenever the solution starts to boil, stop the microwave, stir the solution and place back in to microwave. Repeat until the solution is clear and free of visible particles.
 - Cool the solution under running water until you can almost hold the bottle in your hand.
 - Add 10 µl of ethidiumbromide, stir and pour in to a gel carrier. Let the gel set. After the surface is solid, remove sample ladder and place the gel in to a gel runner.
 - Add 1x EP buffer until the top of the gel is beneath the surface.
 - Separate 5 µl from your samples and mix them with 1 µl of 6x Loading Dye. Pipet them then in the sample holes on the gel. Add also 7 µl of DNA Ladder (Quick-Load® PCR Marker NO475S, New England BioLabs).

- Run the gel with 94–100 V for 1, 5 hours.
- Check the gel under a UV table so that there are clean and clear bands at 160 (E2BS1) and 180 bp (E2BS2-4).
- Carry the PCR samples on ice to pyrosequencing.
- Use PyroMark Q24 Advanced 3.0.0 program to plan your run.
 - Name it, place as a base CpG assay and choose PyroMark Q24 Advanced Instrument method number 006.
 - The sample box below represents the actual sample plate in which the real samples are put. Select into the sample box running programs based on sequencing primers that are used to run the sample that will be placed in to a well at issue. Name your samples there also.
 - Save it, put into a USB stick and print the program to see the volumes of reagents the program has calculated.
- Engage the PyroMark machine and heat incubator!
- Follow the instruction manual of the machine.
 - Prepare a Binding mixture (each reagent times the number of samples plus a pipetting margin):
 - 40 µl of Binding buffer (Qiagen), 2 µl Streptavidin Sepharose™ particles (lot 10008026, GE Healthcare), 18 µl MQ water
 - Add 60 µl of Binding mixture into each well in a deep-well plate that you are going to put a sample in. Add 20 µl of PCR product into their specified wells.
 - Seal the plate with common tape and place it into shaking 1400 rpm for 10 min.
 - Add the proper amounts of room temperature enzyme, substrate and nucleotides (PyroMark Q24 Advanced Reagents 4x24, Qiagen) in to a PyroMark Q24 cassette according to the plan you printed out. Load the cassette into a PyroMark machine to wait.
 - Prepare primer dilutions in to 1,5 ml Eppendor tubes as following:
 - dilute the sequencing primers to 10 µM with MQ water.
 - dilute these dilutions into final concentration of 0,375 µM by adding 24,25 µl of Annealing buffer (Qiagen) and 0,75 µl of 10 µM dilutions (multiply the amounts with the number of your samples plus a pipetting margin)
 - Pipette these dilutions in to a PyroMark PCR Plate 25 µl per each sample.
 - Get both plates to PyroMark Q24 Vacuum Workstation (Qiagen) and engage the suction.
 - Suck the sample wells empty with the "hedgehog". Put 100 µl of MQ water in to the wells and suck it also to make sure you got all of the particles out.
 - Remove the "hedgehog" in to a pool containing 70 % ethanol and suck for 5 s.
 - Remove in to a pool containing Denaturation solution and suck for 5 s.
 - Remove in to a pool containing 1x Washing buffer and suck for 10 s.
 - Lift the "hedgehog" into an up position and hold for 15 s so that all of the extra fluid will come out.
 - Place the "hedgehog" above the PCR plate. Make sure that the spikes are above the right well containing the right primer for the sample hanging on the spike above!
 - Shut the suction down before toughing the PCR palte with the "hedgehog". Rinse for 10 s.
 - Remove the "hedgehog" and rinse it in pool number 4 containing water. Remove to pool number 5 and put on the suction. Let it suck water so that the pool becomes empty. Lift up to remove the extra water and shut down.

- Let the PCR plate incubate at 80 °C 5 min. After this, place immediately to PyroMark machine and engage the run (runtime approximately 2 h).
- Analyse the run by using PyroMark Q24 Advanced 3.0.0 program.

LIITE 3. HPV16 16W12E-variantin DNA-sekvenssi

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF125673.1>)

1 actacaataa ttcattgata aaactaaggg cgtaacCGaa atCGgttgaa cCGaaacCGg
E2B53-4
61 ttagtataaa agcagacatt ttatgcacca aaagagaact gcaatgtttc aggaccaca
121 ggagcgaccc agaaagttac cacagttatg cacagagctg caaacaacta tacatgatat
181 aatattagaa tgtgtgtact gcaagcaaca gttactgcga cgtgaggtat atgactttgc
241 ttttcgggat ttatgtatag tatatagaga tgggaatcca tatgctgtat gtgataaatg
301 tttaaagttt tattctaaaa ttagtgagta tagacattat tttatagtg tttatggaac
361 aacattagaa cagcaatata acaaaccgtt gtgtgattg ttaattaggt gtattaactg
421 tcaaaagcca ctgtgtctg aagaaaagca aagacatctg gacaaaaagc aaagattcca
481 taatataagg ggtcgggtgga ccggtcgtg tatgtcttgt tgcagatcat caagaacag
541 tagagaaacc cagctgtaac catgcatgga gatacaccta cattgcatga atatatgta
601 gatttgcaac cagagacaac tgatctctac tttatgagc aattaaatga cagctcagag
661 gaggagatg aaatagatgg tccagctgga caagcagaac cggacagagc ccattacaat
721 attgtaacct tttgtgcaa gtgtgactct acgcttcggt tgtgctgaca aagcacacac
781 gtagacattc gtactttgga agacctgta atgggcacac taggaattgt gtgccccatc
841 ttttctcaga aaccataatc tacatggct gatcctgcag gtaccaatgg ggaagagggt
901 acgggatgta atggatggtt ttatgtagag gctgtagtgg aaaaaaaaaac aggggatgct
961 ataccagatg acgagaacga aatgacagt gatacaggtg aagatttggg agattttata
1021 gtaaatgata atgattattt aacacaggca gaaacagaga cagcacatgc gttgtttact
1081 gcacaggaag caaaacaaca tagagatgca gtacaggttc taaaacgaaa gtatttgggt
1141 agtccactta gtgatattag tggatgtgta gacaataata ttagtcttag attaaaagct
1201 atattgtatag aaaaacaaag tagagctgca aaaaggagat tattttaaag cgaagacagc
1261 gggatgga atactgaagt ggaaactcag cagatgttac aggtagaagg gcgcatgag
1321 actgaaacac catgtagtca gtatagtggg ggaagtgggg gtggttgagc tcagtacagt
1381 agtggaaagtg ggggagaggg ttttagtgaa agacacacta tatgccaac accattaca
1441 aatattttaa atgtactaaa aactagtaac gcaaaggcag caatgttagc aaaatttaa
1501 gagttatacg gggtagtatt ttcaagaata gtaagacat taaaagtaa taaatcaacg
1561 ttttgcgatt ggtgtattgc tgcatttggg cttacacca gtatagctga cagtataaaa
1621 aactattac acaatattg tttatattt cacattcaaa gtttagcatg tttatgggga
1681 atggttgtgt tactattagt aagatataaa tttggaaaaa atagagaaac aattgaaaa
1741 ttgctgtcta aactattatg tgtgtctcca atgtgtatga tgatagagcc tccaaaattg
1801 cgtagtacag cagcagcatt atattggtat aaaacaggtat tatcaaatat tagtgaagtg
1861 tatggagaca cgccagaatg gatacaaga caaacagtat tacaacatag ttttaatgat
1921 tttacatttg aattatcaca gatggtacaa tgggctcag ataattgacat agtagacgat
1981 agtgaattg catataaata tgcacaattg gcagacacta atagtaatgc aagtccttt
2041 ctaaaaagta atccacagc aaaaattgta aaggatttg caacaatgtg tagacattat
2101 aaacgagcag aaaaaaaca aatgagatg agtcaatgga taaaatag atgtgatagg
2161 gtatagatg gaggtgattg gaagcaaat gttatgttt taaggtatca aggtgtagag
2221 tttatgtcat ttttaactgc attaaaaaga ttttgcaag gcatacctaa aaaaattgc
2281 atattactat atggtgcagc taacacaggt aatcattat ttggtatgag tttaatgaaa
2341 tttctgcaag ggtctgtaac atgttttga aattctaaa gccattttg gttacaacca
2401 ttagcagatg ccaaataggt tatgttagat gatgctacag tgcctgttg gaactacata

2461 gatgacaatt taagaaatgc attggatgga aatttagttt ctatggatgt aaagcataga
2521 ccattggtac aactaaaatg ccctccatta ttaattacat ctaacattaa tgctggtaca
2581 gattctaggt ggccttattt acataataga ttgggtgtgt ttacatttcc taatgagttt
2641 ccatttgacg aaaacggaaa tccagtgtat gagcttaatg ataagaactg gaaatccttt
2701 ttctcaagga cgtggtccag attaagtttg cacgaggacg aggacaagga aaacgatgga
2761 gactctttgc caacgttaa atgtgtgtca ggacaaaata ctaacacatt atgaaaatga
2821 tagtacagac ctactgacc atatagacta ttggaaacac atgcccctag aatgtgctat
2881 ttattacaag gccagagaaa tgggatttaa acatattaac caccaggtgg tgccaacact
2941 ggctgtatca aagaataaag cattacaagc aattgaactg caactaacgt tagaacaat
3001 atataactca caatatagta atgaaaagtg gacattaca gacgttagcc ttgaagtga
3061 ttaactgca ccaacaggat gtataaaaa acatggatat acagtggaag tgcaagttga
3121 tggagacata tgcaataca tgcaataca aaactggaca catatatata tttgtgaaga
3181 agcatcagta actgtgtag agggcaagt tgactattat ggtttatatt atgttcatga
3241 aggaatacga acatatttg tgcaattaa agatgatgca gaaaaatata gtaaaaaata
3301 agtatgggaa gttcatcggg gtggcaggt aatattatgt cctacatctg tgttagcag
3361 caacgaagta tcctctctg aaattattag gcagcactg gccaacact ccgccgcgac
3421 ccatacaaa gccgtcgcct tgggcaccga agaaacacag acgactatcc agcgaacaag
3481 atcagagcca gacaccggaa acccctgcca caccactaag ttgttcaca gagactcagt
3541 ggacagtct ccaatctca ctgcattaa cagctcacac aaaggacgga ttaactgtaa
3601 tagtaacact acacccatag tacatttaa aggtgatgct aatacttaa aatgtttaag
3661 atatagattt aaaaagcatt gtacattgta tactgagtg tcgtctacat ggcaatggac
3721 aggacataat gtaaacata aaagtgaat ttttactt acatagata gtgaatggca
3781 acgtgaccaa tttttgtctc aagttaaaat accaaaaact attacagtgt ctactggatt
3841 tatgtctata tgacaaatct tgactgca tccacaacat tactggcgtg cttttgctt
3901 tgctttgtg tgctttgtg tgtctgccta ttaatcgtc cgctgcttt gtctgtgtct
3961 acatacacat cattaact atggatta ctattgtgga taacagcagc ctctgcgttt
4021 aggtgtttta ttgtatata tgtattggt tatataccat ttttttaac acatacacat
4081 gcacgcttt taattacata atgtatatgt acaaaatgta atgtttacat ataattgtt
4141 tatacataa ctactattt tttcttttt attttcatat attttttt tttgtttgt
4201 tgtttgttt ttaataaact gttatcactt acaatgcga cacaaacgtt ctgcaaaacg
4261 cacaaaacgt gcatcggcta cccaactta taaaacatgc aaacaggcag gtacatgtcc
4321 acctgacatt atacctaagg ttgaaggca aactattgct gatcaaatat tacaatagg
4381 aagtatgggt gtatttttg gtgggttagg aattggaaca gggcgggta caggcggacg
4441 cactgggtat attcattgg gaacaaggcc tcccacagct acagatacac ttgctcctgt
4501 aagaccctt ttaacagtag atcctgtggg ccctccgat ccttctatag tttcttagt
4561 ggaagaaact agttttattg atgctggtgc accaactct gtaccttca tccccaga
4621 tgtatcagga ttagtatta ctactcaac tgatacaca cctgctatat tagatattaa
4681 taatactgtt actactgta ctacacataa taatccact ttactgacc catctgtatt
4741 gcagcctca acactgcag aaactggagg gcattttaca ctttcatcat cactattag
4801 tacacataat tatgaagaa ttcctatgga tacatttatt gtagcaca accctaacac
4861 agtaactagt agcacacca taccagggtc tcgcccagtg gcacgcctag gattatag
4921 tcgcacaaca caacaagta aagttgtaga ccctgctttt ataaccact ccaataaact
4981 tattacatata gataatcctg catatgaagg tatagatgtg gataatacat tatattttc
5041 tagtaatgat aatagtatta atatagctcc agatcctgac ttttggata tagttgctt
5101 acataggcca gcattaacct ctaggcgtac tggcattagg tacagtagaa ttgtaataa

5161 acaaacacta cgtactcgtg gtggaaaatc tataggtgct aaggtacatt attattatga
5221 ttttagtact attgattctg cagaagaaat agaattacaa actataacac cttctacata
5281 tactaccact tcatatgcag ccttacctac ttctattaat aatggattat atgatattta
5341 tgcagatgac ttattacag atacttctac aaccccgta ccatctgtac cctctacatc
5401 tttatcaggt tatattcctg caaatacaac aattcctttt ggtggtgcat acaatattcc
5461 tttagtatca ggtcctgata taccattaa tataactgac caagctcctt cattaattcc
5521 tatagtcca ggttctccac aatatacaat tattgctgat gcagggtgact tttatttaca
5581 tcctagttat tacatgttac gaaaacgacg taaacgttta ccatattttt tttcagatgt
5641 ctctttggct gcctagttag gccactgtct acttgctcc tgtcccagta tctaaggttg
5701 taagcacgga tgaatatgtt gcacgcacaa acatatatta tcatgcagga acatccagac
5761 tacttgtagt tggacatccc tatttctta ttaaaaaacc taacaataac aaaatattag
5821 ttcttaaagt atcaggatta caatacaggg tatttagaat acatttacct gacccaata
5881 agtttggtt tcctgacacc tcattttata atccagatac acagcggctg gtttggcct
5941 gtgtaggtgt tgaggtaggc cgtggtcagc cattaggtgt gggcattagt ggccatcctt
6001 tattaataa attggatgac acagaaaatg ctagtgccta tgcagcaaat gcagggtggt
6061 ataatagaga atgtatatct atggattaca aacaacaca attgtgttta attggttga
6121 aaccacat aggggaacac tggggcaaag gatccccatg taccaatgtt gcagtaaatc
6181 caggtgattg tccaccatta gagttaataa acacagttat tcaggatggt gataggttg
6241 atactggctt tggctgatg gactttacta cattacaggc taacaaaagt gaagttccac
6301 tggatattg tacatctatt tgcaaatatc cagattatat taaaatggtg tcagaacat
6361 atggcgacag cttattttt tatttacgaa gggaacaaat gttgtttaga cattattta
6421 ataggctggt tgctgttggg gaaaatgtac cagacgattt atacattaaa ggctctgggt
6481 ctactgcaaa ttagccagt tcaaattatt ttctacacc tagtggttct atggttac
6541 ctgatgcca aatattcaat aaacttatt ggttacaacg agcacagggc cacaataatg
6601 gcattgttg gggtaacaa ctattgtta ctgtgttga tactacacgc agtacaata
6661 tgtcattatg tgctgccata tctactcag aaactacata taaaataact aacttaagg
6721 agtacctacg acatggggag gaatatgatt tacagttat tttcaactg tgcaaaataa
6781 ccttaactgc agacgttatg acatacatac attctatgaa ttccactatt ttggaggact
6841 ggaatttgg tctacaacct ccccaggag gcacactaga agatactat aggtttgtaa
6901 catcccaggc aattgctgt caaaaacata cacctcagc acctaaagaa gatcccctta
6961 aaaaatacac ttttgggaa gtaaattta aggaaaagt ttctgcagac ctatgacgt
7021 ttcttttagc acgcaattt ttactacaag caggattgaa ggccaaacca aaattacat
7081 taggaaaacg aaaagctaca cccaccact catctactc tacaactgct aaacgcaaaa
7141 aacgtaagct gtaagtattg tatgtatgtt gaattagtgt tgtttgtt ttatatgtt
7201 gtatgtgctt gtatgtgctt gtaaataa agttgtatgt gtgtttgtat gtatggtata
7261 ataaacacgt gtgtatgtt ttttaaatgc ttgtgtaact attgtgcat gcaacataa
7321 taaacttatt gttcaacac ctactaattg tgttggtt attcattgta tataaactat
7381 atttgctaca tcctgtttt gttttatata tactaaattt ttagcgcca gcggcattt
7441 ttagctta acCGaattCG gttgcatgct tttggcaca aatgtgttt ttttaaatag

E2BS1

7501 ttctatgtca gcaactatag tttaaactg tacgtttcct gcttgcctag cgtgccaat
7561 ccctgtttc ctgacctgca ctgcttgcca accattcat tgtttttac actgcactat
7621 gtgcaactac tgaatcacta tgtacattgt gtcatataaa ataaatcact atgcccacac
7681 gcctacata ccgctgttag gcacatattt ttggctgtt ttaactaacc taattgcata
7741 tttggcataa gttttaaact tctaaggcca actaatgtc accctagttc atacatgaac

7801 tgtgtaaagg ttagtcatac attgttcatt tgtaaaactg cacatgggtg tgtgcaaacC

7861 Gttttgggtt acacattac aagcaactta tataataata ctaa

E2BS2