

# DNA METYLAATIO PÄÄN JA KAULAN ALUEEN SYÖVISSÄ

---

Syventävien opintojen kirjallinen tutkielma

Kaisa Tanskanen

Turun yliopisto

Lääketieteellinen tiedekunta

Hammaslääketieteen laitos

05.09.2015

Tutkielman oppiala: Suupatologia

Ohjaaja: Stina Syrjänen

Ulkopuolinen arvioija: Jaana Rautava

Laajuus: 30 opintopistettä

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck-järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO

Hammaslääketieteen laitos

TANSKANEN, KAISA: DNA metylaatio pään ja kaulan alueen syövässä

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 60 s.

Suupatologia

Syyskuu 2015

---

Tutkielma on kirjallisuuskatsaus ja käsittelee pään ja kaulan alueen syöpiä, niiden epidemiologiaa sekä epigeneettisiä muutoksia, jotka vaikuttavat syöpien kehittymiseen. Syöpäryhmä on hyvin monimuotoinen ja sen esiintyvyys vaihtelee runsaasti eri maanosien välillä. Ennen pään ja kaulan alueen syöpiä pidettiin lähinnä tupakoivien ja alkoholia runsaasti käyttävien iäkkäiden ihmisten syöpänä. Viimeisten vuosikymmenien aikana on saatu enenevässä määrin uutta tietoa siitä, että ihmisen papilloomavirustartunta (HPV) voi aiheuttaa osan pään ja kaulan alueen syövästä, etenkin suunielun syöpiä, minkä johdosta näitä syöpiä esiintyy myös nuoremmilla tupakoimattomilla ja ei alkoholia käyttävillä henkilöillä.

Tiedetään, että geenien mutaatiot, jotka aiheuttavat häiriöitä geenisekvensseissä voivat johtaa syöpäsolujen syntyyn. Epigeneettiset muutokset, joista yleisin on DNA metylaatio, taas muuttavat geenin toimintaa ilman että itse geenisekvenssi muuttuu. Nämä muutokset ovat periaatteessa reversiibeilejä, ja ne kuuluvat osana yksilön normaalia kehitystä, mutta niitä on osoitettu myös löytyvän syövästä. Näiden haitallisten muutosten osoittamisella voi olla tulevaisuudessa suuri merkitys syöpien diagnostiikassa ja hoidossa, koska muutoksia pystytään mahdollisesti lääkkeellisesti palauttamaan sekä niiden avulla pystytään arvioimaan syöpien luonnetta. Tämän vuoksi epigeneettiset muutokset ovat tiiviin tutkinnan kohteena.

Toinen tärkeä diagnostinen ja hoitolinjaa määrittävä tekijä on HPV:n osoitus syövässä. Se onkin tällä hetkellä yksi tärkeimmistä biomarkkereista pään ja kaulan alueen syövässä. Myös DNA metylaation perustuvia molekyylimarkkereita, sekä mutaatioihin perustuvia markkereita on käytössä pään ja kaulan alueen syövässä. Tulevaisuuden hoito tulee todennäköisesti pitkälti perustumaan lukuisten biomarkkereiden perusteella pohjautuvaan kohdennettuun terapiaan, jolloin kukin syöpäpotilas saa yksilöllistä hoitoa juuri siihen syöpätyyppiin ja sen sisältämiin geneettisiin ja epigeneettisiin muutoksiin mitä itse sairastaa.

Avainsanat: pään ja kaulan alueen syövä, DNA metylaatio, HPV, biomarkkeri

## Sisällysluettelo

1. Johdanto .....	1
2. Pään ja kaulan alueen syövät.....	1
2.1 Epidemiologia .....	3
2.2 Riskitekijät .....	5
2.2.1 Tupakka ja alkoholi .....	6
2.2.2 Ihmisen papilloomavirus.....	7
2.2.3 Suusyöpävaaraa mahdollisesti lisäävät leesiot ja tilat.....	10
3. Epigeneettiset muutokset .....	12
3.1 Histonimodifikaatiot .....	13
3.2 Kromatiinin uudelleenmuokkaus.....	15
3.3 mikroRNA:n modifikaatiot .....	15
3.4 DNA metylaatio.....	16
3.5 Epigenomiikassa käytettävät menetelmät .....	18
3.6 DNA metylaatio ja syöpä .....	19
3.6.1 Hypermetylaatio syövässä .....	19
3.6.2 Hypometylaatio syövässä .....	20
3.6.3 Ravintoaineiden merkitys DNA metylaatioon sekä syöpään .....	22
4. DNA metylaatio pään ja kaulan alueen syövissä .....	23
4.1. Geenien hypermetylaatio pään ja kaulan alueen syövissä .....	23
4.2 Mikrosatelliitti-instabiliteetin merkitys pään ja kaulan alueen syövissä .....	29
4.3 DNA hypometylaatio pään ja kaulan alueen syövissä .....	30
5. HPV ja pään ja kaulan alueen syövät .....	31
5.1 HPV:n biologiset toiminnot isäntäsoluissa.....	31
5.2 HPV-positiivisten syöpien todentaminen .....	33
5.3 HPV:n metylaatio .....	34
5.4 HPV-positiivisten ja HPV-negatiivisten kasvaimien erot metylaatioissa.....	35
6. Pään ja kaulan alueen syöpien ennuste ja hoito .....	37
6.1 HPV-positiivisten syöpien ennuste .....	39
6.2 HPV-rokotteet.....	40
7. Epigeneettiset biomarkerit ja epigeneettiset lääkkeet syövän hoidossa sekä kohdennettu geeniterapia.....	41
7.1 Demetylaatiolääkkeet hoidossa.....	41

7.2 Metylaatiomarkkerit.....	43
8. Yhteenveto .....	44
Lähdeluettelo.....	46

## **1. Johdanto**

Syöpien etiologia on moninainen ja eri syöville on osittain eri tekijät taustalla. Joillakin syöville periytyvyydellä on suuri merkitys syövän kehittymiseen, kun taas toisilla ympäristötekijät ovat ratkaisevassa asemassa. On tärkeää tuntea, miten syöpäsolut muuttavat normaalien solujen molekyylibiologiaa, jotta uusia tehokkaampia hoitomuotoja voitaisiin kehittää.

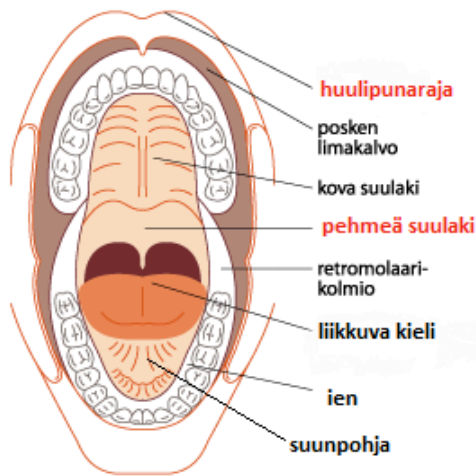
Tässä kirjallisuuskatsauksessa käsitellään pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinomia, painottuen suuontelon ja suunielun levyepiteelikarsinomiin, sekä niissä esiintyviin epigeneettisiin muutoksiin, erityisesti metylaatioihin. On tärkeää, että hammaslääkärit sekä lääkärit tunnistavat pahanlaatuiset muutokset ajoissa, jotta hoito saadaan aloitettua varhain, sillä pään ja kaulan alueen syövät ovat huonoennusteisia ja aikainen diagnoosi parantaa ennustetta huomattavasti.

Ihmisen papilloomaviruksen eli HPV:n yhteys kohdunkaulansyöpiin on tunnettu jo pitkään. HPV:n yhteyttä pään ja kaulan alueen syöpiin, eritoten suunielun syöpiin, on alettu myös enenevässä määrin tutkia. Kirjallisuuskatsauksessa käsitellään lopuksi HPV-positiivisten ja -negatiivisten pään ja kaulan alueen syöpien epigeneettisiä eroavaisuuksia, sillä on havaittu, että kyseisillä syöville on eri hoitoennusteet sekä -vasteet. Aihe on hyvin ajankohtainen, sillä HPV-rokotukset on otettu mukaan tyttöjen kansalliseen rokotusohjelmaan vuonna 2013.

## **2. Pään ja kaulan alueen syövät**

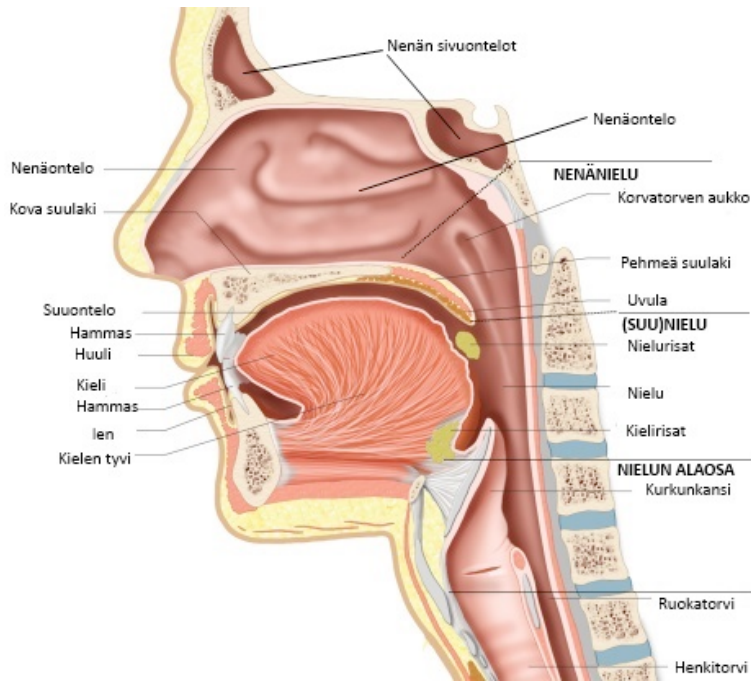
Pään ja kaulan alueen syöpiin kuuluu suuri ryhmä eri syöpiä, jotka ovat pääasiassa levyepiteelikarsinomia. Pään ja kaulan alueen syöpiin luetaan muun muassa syövät, jotka ovat lähtöisin huulesta, suuontelosta, nenäontelosta, nenän sivuonteloista, nenänielusta, kurkunpäästä ja/tai suunielusta, johon kuuluvat muun muassa kielen tyvi, nieluristat ja pehmeä suulaki sekä nielun alaosa eli hypopharynx. (Joensuu ym. 2013.) Primaarikasvaimen lähtökohtaa on kuitenkin toisinaan vaikea määrittää pään ja kaulan alueella ja rajat syöpäryhmän sisällä ovat tällöin vaikeasti erotettavissa. Nämä seikat osaltaan hankaloittavat pään ja kaulan alueen syöpien tutkimista ja tiedon kokoomista.

Suunteloon kuuluvat huulien sisäpinnat, kielen etuosa (2/3 kielestä), ikenet, posken limakalvot, suunpohja sekä kova suulaki. Takaosistaan suuntelo rajautuu kovan ja pehmeän suulaen rajalle, etulakikaareen sekä kielen vallinystyihin, jotka sijaitsevat kielen etu- ja takaosan rajapinnalla (kuva 1) (Joensuu ym. 2013).



Kuva 1. Suuntelo (muokattu Joensuu ym. 2013). Punaisella kirjoitetut alueet eivät kuulu suunteloon.

Nielu koostuu kolmesta osasta: nenänielu, suunielu ja alanielu (kuva 2). Suunielu on sen keskeisin osa, johon kuuluvat pehmeä suulaki, kielen tyvi sekä risakudokset. Risakudosten luokitukset voivat vaihdella tutkimuksittain, sillä vuonna 1993 niiden ICD-koodi muutettiin. Ennen nielurisojen syövät kuuluivat suunielun maligniteetteihin, kun taas nykyään niillä on oma ICD-koodinsa C09, johon taas eivät kuulu kielirisojen syövät (C02.4) eivätkä kitarisojen syövät (C11.1) (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision, 2010). Eri-ikäisissä tutkimuksissa risasyövät kattavat toisistaan poikkeavia kudosityhmiä.



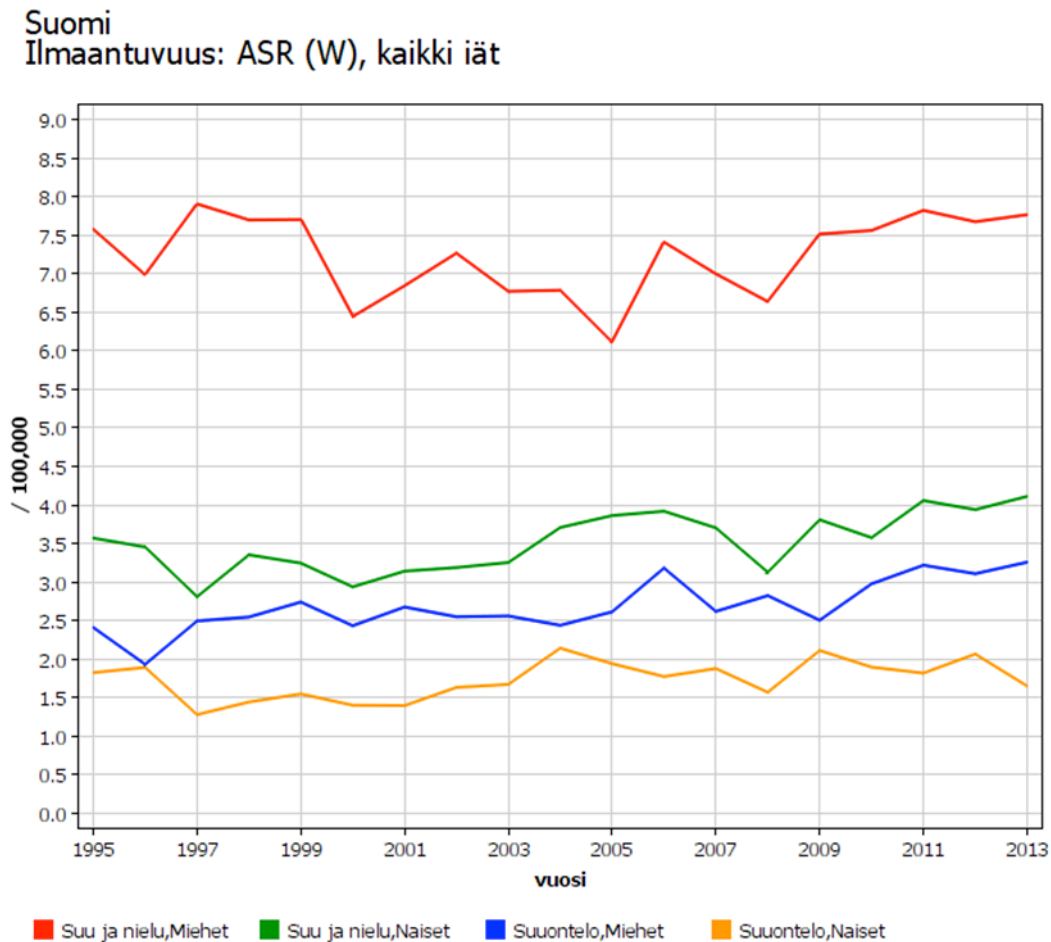
Kuva 2. Suun alueen anatomia (kuva muokattu <http://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=8468>).

## 2.1 Epidemiologia

Pään ja kaulan alueen syövästä huulen ja suuontelon syöpä on miesten 11. yleisin syöpä maailmassa ja kurkunpään syöpä on sijalla 13. Mikään näistä syövästä ei ole naisten 15 yleisimmän syövän joukossa (GLOBOCAN. <http://globocan.iarc.fr/>). Näiden syöpien esiintyvyys vaihtelee kuitenkin suuresti eri maanosien välillä (GLOBOCAN. <http://globocan.iarc.fr/>, Suusyöpä. Käypä hoito 2012.) Miehillä pään ja kaulan alueen syövän esiintyvyys on yli kaksinkertainen naisiin verrattuna. Papilloomavirustartuntaan liittyvien suunielun syöpien esiintyvyys on lisääntymässä molemmilla sukupuolilla. (Cancer facts and figure 2013.)

Vuosien 2009-2013 aikana todettiin Suomessa syöpärekisterin ([www.syoparekisteri.fi](http://www.syoparekisteri.fi)) tilastojen mukaan 597 uutta suun ja nielun alueen syöpätapausta vuodessa ja syöpäkuolemien määrä kyseisellä ajanjaksolla oli vuodessa 193 potilasta. Myös Suomessa kyseisiä syöpiä esiintyy enemmän miehillä kuin naisilla. Kuvassa 3 on eritelty naisten ja miesten suun ja nielun sekä suuontelon syöpien ilmaantuvuudet Suomessa (kuva 3). Maailman terveysjärjestö (WHO) on tilastoinut vuonna 2012 uusia pään ja kaulan alueen syöpiä (C00-14, C32) 686 328 ja siihen kuoli arviolta 375 665 potilasta

maailmalla. Näihin arvoihin on huomioitu huulen, suuontelon, nielun ja kurkunpään syövät. (GLOBOCAN.)



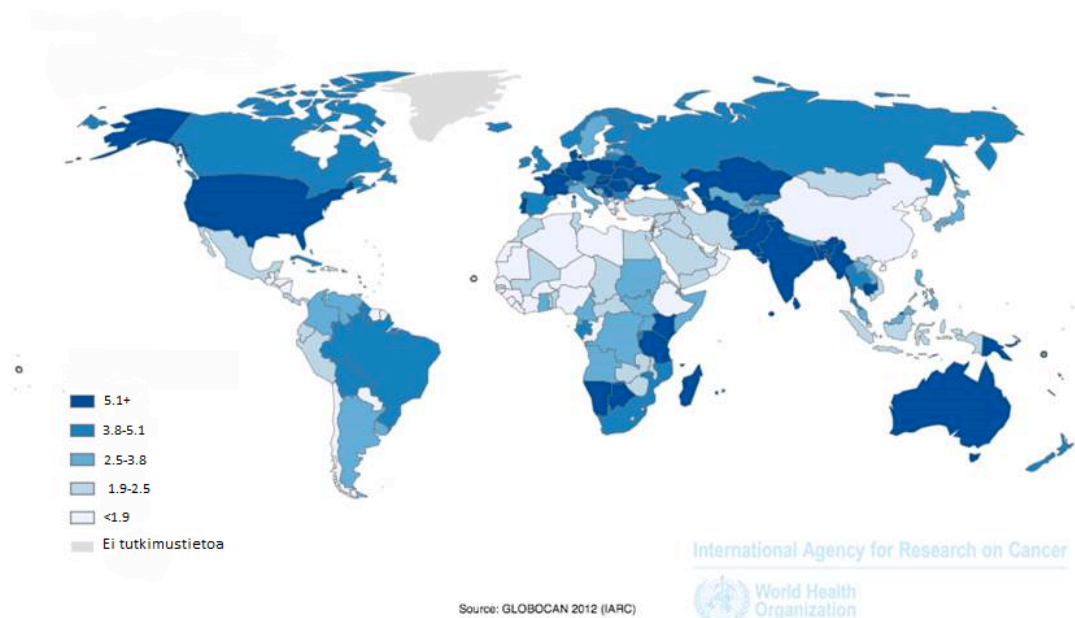
NORDCAN © Association of the Nordic Cancer Registries (12.10.2015)

Kuva 3. Suun ja nielun sekä suuontelon syöpien ilmaantuvuus Suomessa vuosina 1995 - 2013. Ilmaantuvuus 100 000 henkeä kohden, molemmat sukupuolet ja kaikki ikäryhmät mukaan luettuna. (NORDCAN.)

Kuvassa 4 näkyy huulen ja suuontelon syöpien riskialueet maailmanlaajuisesti. Euroopan maista muun muassa Espanjassa, Ranskassa ja Saksassa näiden syöpien esiintyvyys on huomattavaa. Australiassa, Papua-Uusi-Guineassa sekä Intiassa syöpien ilmaantuvuus on myös suuri (Kuva 4). Kehittyneissä maissa pään ja kaulan alueen syövät käsittävät noin 5 % kaikista pahanlaatuisista syövästä, mutta Kaakkois-Aasiassa luku voi nousta jopa 50 %:iin ja kyseiset syövät ovatkin Etelä- ja Kaakkois-Aasiassa yleisimpien syöpien joukossa (van Oijen ja Slootweg 2000, Llewellyn ym. 2001). Etelä- ja Kaakkois-Aasian korkea syöpäilmaantuvuus on yhteydessä betelpähkinän pureskeluun (Argiris 2008).



Arvioitu ikävakioitu ilmaantuvuus 100 000 henkilöä kohden: huulen ja suuontelon syövät. Kaikki ikäluokat, molemmat sukupuolet.



Kuva 4. Huulen ja suuontelon syöpien riskialueet (muokattu GLOBOCAN)

Pään ja kaulan alueen syöpää on aiemmin pidetty iäkkäiden ihmisten syöpänä. Syöpä on kuitenkin yleistynyt alle 60-vuotiaiden keskuudessa viime vuosikymmenen aikana (Gillison ym. 2007). Alle 45-vuotiailla oli 2000-luvun alussa arviolta 6 % kaikista suuontelon ja suunielun syöivistä (Llewellyn ym. 2001).

## 2.2 Riskitekijät

Pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomien tärkeimmät yksittäiset vaaratekijät ovat tupakointi ja runsas alkoholin käyttö, jotka selittävät noin 75 % näistä syöivistä (Argiris ym. 2008). HPV-infektio on myös itsenäinen riskitekijä ja sen merkitys on erittäin keskeinen suunielun syövissä (Brennan ym. 1995, Crowe ym. 2002, Argiris ym. 2008, Suusyöpä. Käypä hoito 2012). Ultravioletti säteily on riskitekijä etenkin huulisyövän kehittymiselle. Nuuskan käytön arvellaan myös lisäävän suusyöpäriskiä ja syöpäriski on riippuvainen muun muassa käytetyn nuuskan valmistustavasta. Myös suuvesien, joiden alkoholipitoisuus ylittää 25 %, pitkäaikaisella käytöllä on yhteys lisääntyneeseen suusyöpäriskiin. Ravinnon merkitystä on tutkittu suusyövän kehittymisen yhteydessä ja on todettu että monipuolisella ruokavaliolla sekä tuoreiden hedelmien ja vihannesten sekä kalan käytöllä on suotuisia vaikutuksia syövän kehittymiseen, kun taas runsas lihan syönti saattaa lisätä suusyöpäriskiä. (Suusyöpä. Käypä hoito 2012.) On myös mainittava, että pään ja kaulan alueen syövät voivat liittyä

eräisiin periytyviin syndroomiin, esimerkkinä Fanconin anemia, mutta tämä on erittäin harvinaista (Suusyöpä. Käypä hoito 2012, Joensuu ym. 2013).

### **2.2.1 Tupakka ja alkoholi**

Runsas tupakointi ja alkoholin käyttö ovat pääriskitekijät pään ja kaulan alueen syövässä. Pelkästään tupakoinnin on todettu kuusinkertaistavan suuontelon syöpäriskiä. Tupakoinnilla on suurin vaikutus kurkunpään syöpien ilmaantuvuuteen: tupakoivilla on 20-kertainen riski saada kurkunpään syöpä kuin tupakoimattomilla. (Joensuu ym. 2013.) Sekä tupakoinnista että alkoholinkulutuksesta johtuviin syöpäriskeihin vaikuttaa vahvasti niiden annosmäärät ja sen lisäksi niiden yhtäaikaisella käytöllä on todettu olevan synergistinen vaikutus. Myös alkoholin tyyppillä saattaa olla merkitystä syöpien kehittymiseen: oluen ja väkevien alkoholijuomien on todettu olevan haitallisempia kuin esimerkiksi viinin. Alkoholilla ja tupakalla on todettu olevan yhteys arviolta 75 %:iin suuontelon ja nielun syöpiin. (Blot ym. 1988).

Etanoli ei ole syöpää aiheuttava aine elimistölle ja kudoksille, mutta sen hapettumistuote asetaldehydi on. Etanolin oksidaatio sisältää kaksi reaktiota: ensimmäisessä etanoli hapettuu astealdehydiksi sytosolissa olevan alkoholidehydrogenaasin avulla ja toisessa asetaldehydi hapettuu asetaatiksi mitokondriossa aldehydidehydrogenaasin (ALDH) avulla. (Salaspuro 2003.) Alkoholin haitalliset vaikutukset syntyvät siis etanolin hapettuessa elimistössä asetaldehydiksi alkoholidehydrogenaasi-entsyymien avulla. Asetaatti, joka on etanolin hapettumisreaktion lopputuote on myrkytön ja sen elimistö pystyy poistamaan. (Chang ym. 2011.) Tämän hapettumisreitin lisäksi on todettu, että myös mikrosomaalinen etanolin oksidaatioreitti hapettaa etanolia asetaldehydiksi (Salaspuro 2003).

Asetaldehydin karsinogeenisyys saattaa selittyä sen kykyyn häiritä DNA synteesiä ja DNA:n korjausmekanismeja sekä asetaldehydin kykyyn liittyä proteiineihin, jolloin niiden muoto ja toiminta häiriintyy. On myös osoitettu, että alkoholidehydrogenaaseja koodaavien geenien polymorfismit vaikuttavat pään ja kaulan alueen kohonneeseen syöpäriskiin. On esitetty, että asetaldehydi ei yksinään selittäisi alkoholin karsinogeenisyyttä, vaan että etanolilla olisi kyky liuottaa tupakansavusta karsinogeeneja ja näin ollen lisäisi kemiallista karsinogeenisyyttä. (Chang ym. 2011.) Salaspuro ja työryhmä (2015) kirjoittivat vastikään Lääkärilehteen ALDH:n pistemutaation ja sen aiheuttamasta

ALDH:n puutteen yleisyydestä väestössä. ALDH2:n puutetta esiintyy huomattavassa määrin ja sillä on todettu selvä yhteys yläruoansulatuskanavan syöpiin. He mainitsevat asetaldehydin olevan kenties maailman yleisin karsinogeeni, jota on alkoholin lisäksi kosmetiikka- ja elintarviketuotteissa sekä tupakansavussa. (Salaspuro ym. 2015.)

Vaikka valtaosa etanolin hapettumisesta tapahtuukin maksassa, on myös osoitettu että osa etanolin oksidaatiosta asetaldehydiksi tapahtuu syljessä, mahanesteissä ja paksusuolen luumenissa. Useat suoliston normaaliflooraan kuuluvat bakteerit sekä sylkirauhaset ja limakalvot pystyvät hapettamaan etanolia asetaldehydiksi, mikä selittäisi osaltaan sitä miksi runsas alkoholin käyttö liittyy kohonneeseen riskiin saada ruoansulatuskanavan alueen syöpä. (Salaspuro 2003.)

Yksi tupakansavun sisältämistä lukuisista karsinogeneista on myös asetaldehydi. Salaspuro ja Salaspuro (2004) osoittivat tutkimuksessaan miten alkoholin ja tupakoimisen yhtäaikainen käyttö lisää moninkertaisesti asetaldehydin määrää paikallisesti. Heidän tutkimuksessaan verrattiin tupakoivia henkilöitä tupakoimattomiin, joille molemmille annettiin vakiomäärä etanolia painokiloa kohden. Ensimmäisessä osassa tutkimusta asetaldehydikonsentraatio mitattiin syljestä molemmilta ryhmiltä etanolin annostelun jälkeen, mutta tupakoivatkaan henkilöt eivät saaneet polttaa tänä aikana. Tupakoivilla todettiin olevan kuitenkin kaksinkertainen määrä asetaldehydiä syljessään verrattuna tupakoimattomiin. Toisessa osassa tutkimusta tupakoivat polttivat samanaikaisesti kuin nauttivat etanolia, ja tällöin mitatut asetaldehydikonsentraatiot olivat seitsemänkertaiset verrattuna tupakoimattomiin henkilöihin. Tämä osoittaa tupakoinnin ja alkoholin yhtäaikaisen käytön synergistisiä vaikutuksia. (Salaspuro ja Salaspuro 2014.)

## **2.2.2 Ihmisen papilloomavirus**

HPV:t ovat laaja ryhmä pienikokoisia vaipattomia DNA -viruksia, jotka voivat lisääntyä sekä iholla että limakalvoilla. Ne lukeutuvat yleisimpiin sukupuoliteitse leviäviin viruksiin. HPV:n tiedetään tarttuvan myös muilla tavoilla, kuten synnytyksessä äidistä lapseen tai horisontaalisesti kosketuksen tai jopa syljen välityksellä. Osa viruksista poistuu elimistöstä itsestään, mutta pieni osa infektioista voi kroonistua ja aiheuttaa pahanlaatuisia muutoksia, minkä vuoksi säännöllinen seuranta on tarpeen. Papilloomavirukset jaetaan matalan ja korkean riskin HPV-tyyppeihin niiden aikaansaamien kliinisten

muutosten perusteella. On ajateltu että matalan riskin HPV:t aiheuttavat hyvänlaatuisia muutoksia, kun taas korkean riskin HPV:t esiintyvät usein karsinoomien yhteydessä. (Konttinen ym. 2008, Syrjänen ym. 2011, Johannsen ja Lambert 2013.) Tämä ei ole kuitenkaan täysin yksiselitteinen jako, etenkin pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomissa.

Korkean riskin HPV:t esiintyvät useimmiten levyepiteelisyövissä, erityisesti kohdunkaulansyövissä, ja niistä tyypit 16 ja 18 ovat yleisimmät. Kohdunkaulan syövissä sekä HPV-positiivisissa pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomissa HPV-16 virusta esiintyy eniten. HPV infektiosta yli 90 % on HPV-tyyppiä 16 ja HPV:n osuus on merkittävin suunielun syövissä, joista 20—90 % maanosasta riippuen on HPV-positiivisia. (Kreimer ym. 2005, Syrjänen 2005, D'Souza ym. 2007.) HPV-18 virusta esiintyy toiseksi eniten, mutta sen merkitys jää huomattavasti vähäisemmäksi (Kreimer ym. 2005). Muista HPV-tyypeistä mainittakoon HPV-31, HPV-33 ja HPV-35, joita on osoitettu suunielun syövissä (D'Souza ym. 2007).

HPV-6 virusta, joka siis lukeutuu niin sanottuihin matalan riskin virustyyppeihin, on löydetty pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomista. Sen ei ole todistettu kuitenkaan aiheuttavan kohdunkaulassa pahanlaatuisia kasvaimia, vaan ainoastaan hyvänlaatuisia genitaalialueiden kasvaimia, mutta sen yhteys pään ja kaulan alueen syöpien tuumorigeneesissä on vielä epäselvä (Kreimer ym. 2005.) HPV-6:n on todettu aiheuttavan levyepiteelipapilloomia, jotka lukeutuvat suun tavallisimpiin hyvänlaatuisiin kasvaimiin (Konttinen ym. 2008). On myös todettu, että hyvänlaatuiset papilloomat, jotka ovat aiheutuneet HPV-6 ja HPV-11 infektiosta, voivat muuttua pahanlaatuisiksi sädetyksen jälkeen (Rautava ym. 2012). Rautava ja työryhmä (2012) osoittivat julkaisussaan, että matalan riskin virustyyppejä löytyy pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomista sekä yksittäisten virusten infektoimissa sekä useamman viruksen infektoimissa karsinoomissa. Heidän tutkimuksessaan HPV-6 ja HPV-11 löytyi 27,4 % levyepiteelikarsinoomista. Yksittäisten virusten aiheuttamissa infektoissa HPV-6 esiintyi 8,8 %:ssa, HPV-11 2,9 %:ssa ja HPV-16 64,7 %:ssa karsinoomista, vastaavat luvut useamman viruksen infektoimissa karsinoomissa olivat HPV-6 40,7 %:ssa, HPV-11 51,9 %:ssa ja HPV-16 70,4 %:ssa näytteistä. Tutkimuksessa oli mukana 106 pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomanäytettä, joista HPV-positiivisia oli 57 % ja HPV-negatiivisia 43 %. (Rautava ym. 2012.)

HPV:n osuus pään ja kaulan alueen syövissä osoitettiin jo 1983, mutta vasta 2000-luvulla sen yhteyttä pään ja kaulan alueen syöpien syntyyn alettiin tutkia enemmän, kun huomattiin kielen tyven ja nielurisojen levyepiteelisyöpien yleistyneen. Huomattiin myös, että sairastuneet olivat aiempaa nuorempia. (Syrjänen ym. 1983, Hammarstedt ym. 2006.) Erityisesti tietyt pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooman alaryhmät liitetään HPV-infektioihin. Suunielun syövät, varsinkin kielen tyvestä ja risoista lähtöisin olevat, ovat useammin HPV-positiivisia kuin suuontelon syövät. (Gillison ja Lowy 2004, D'Souza ym. 2007, Chaturvedi ym. 2008.) Onkin tilastoitu, että suuontelon syövät ovat vähentyneet, kun taas suunielun syövät ovat yleistyneet, mikä voi selittyä HPV-positiivisten syöpien kasvulla. (Chaturvedi ym. 2008.) HPV:n osuus tautitapauksissa vaihtelee kuitenkin tutkimuksittain paljon, mikä selittyy muun muassa tutkimusryhmien käyttämistä eri metodeista, löydösten erilaisesta tulkinnasta sekä syöpien sijainnista (Syrjänen 2005, Anaya-Saavedra ym. 2008).

HPV:n esiintyvyys suuontelon, suunielun ja kurkunpään syövissä on maantieteellisesti vaihtelevaa. Uusimman meta-analyysin mukaan korkeimmat luvut suuontelon HPV-positiivisista syöivistä tilastoitiin Aasiassa ja Etelä- ja Keski-Amerikassa ja alhaisimmat luvut taas Afrikassa. Suunielun syövissä Pohjois-Amerikassa tilastoitiin huomattavasti suuremmat luvut kuin Aasiassa, Oseaniassa ja Euroopassa. Alhaisimmat luvut suunielun HPV-syövissä oli taas Etelä- ja Keski-Amerikassa. Näillä alueilla tosin tilastoitiin korkeimmat HPV-positiiviset kurkunpään syövät, kun alhaisin arvo taas oli Pohjois-Amerikassa. Myös maanosien sisällä on huomattavaa vaihtelua syöpäluvuissa. (Ndiaye ym. 2014.)

Yleisesti ajatellaan, että papilloomavirus leviää seksiteitse. Sitä on kuitenkin havaittu esiintyvän jo pienillä lapsilla, jolloin kyseinen leviämistapa ei tule kyseeseen. Mahdollisia leviämistapoja on siis olemassa muitakin. Viruksen leviämistavat voidaan jakaa kolmeen eri muotoon: horisontaalinen transmissio, vertikaalinen transmissio ja autoinokulaatio eli tarttuminen yhdestä ruumiinosasta toiseen samalla yksilöllä. Horisontaalinen transmissio voi syntyä ihojen tai limakalvojen välisissä kontakteissa tai eritteiden, kuten syljen, siemennesteen tai äidinmaidon, välityksellä. Vertikaalisesta transmissiosta taas on kyse, kun lapsi on saanut infektion äidiltään raskauden, synnytyksen tai muutoin synnytyksen jälkeen vanhemmiltaan tai hoitajiltaan. (Syrjänen 2010.) Vastasyntyneillä, joiden äideillä on genitaalialueen HPV-infektio, on jopa 33 % suurempi riski saada HPV-tartunta kuin niillä vastasyntyneillä, joiden äidit ovat HPV-negatiivisia. Toiset lapset saavat äidiltään pelkän

virusen, mutta toiset saavat myös HPV-spesifisiä vastustusaineita. Jos kuitenkin äiti on hiljattain ennen synnytystä saanut ensimmäisen HPV-tartuntansa eikä tällöin vielä kehittänyt immunologista vastetta HPV:lle, ei syntyvä lapsikaan saa vasta-aineita, vaan pelkän infektion. (Koskimaa ym. 2014.)

Täysin selvää ei ole, minkälaiset seksuaaliset kanssakäymiset liittyvät HPV-tartuntoihin. D'Souzan ja työryhmän (2007) tutkimuksessa havaittiin selvä yhteys HPV-positiivisten suunielusyöpää sairastavien potilaiden ja suu – genitaalitransmission välillä. Suuseksin merkitys leviämismuotona ei kuitenkaan ole kiistaton. HPV-positiivisia syöpiä on myös ihmisillä, joilla ei ole ollut monta seksikumppania tai eivät ole harrastaneet suuseksiä (Marur ym. 2010). Hiljattain ilmestyneessä tutkimuksessa D'Souza ja työryhmä (2014) tutkivat HPV-positiivisia suun ja nielun alueen levyepiteelikarsinomapotilaita ja heidän kumppaneidensa HPV-positiivisuutta. Tutkimuksessa ilmeni, että suurimmalla osalla syöpäpotilaiden kumppaneista ei ollut HPV-tartuntaa, joka viittaisi siihen että horisontaalinen tartuntatie syljen välityksellä olisi harvinainen ja/tai että mahdolliset aktiiviset tartunnat poistuisivat tehokkaasti elimistöstä. Suurin osa HPV-infektioista on ohimeneviä, jolloin ei oireita välttämättä esiinny, mutta infektion kroonistuessa syöpäriski myös todennäköisesti kohoaa. (D'Souza ym. 2014.)

Tyypillinen potilas, jolla on HPV-positiivinen pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoma, on valkoihoinen mies, joka ei yleensä polta tai käytä alkoholia. Hän on myös kolmesta viiteen vuotta nuorempi kuin potilas, jolla on HPV-negatiivinen, tupakan ja alkoholin käyttöön liittyvä, levyepiteelikarsinoma. Yleensä potilailla on myös hyvä sosioekonominen status. (Chaturvedi ym. 2008, O'Rorke ym. 2012.) Histologialtaan HPV-positiiviset syövät eroavat HPV-negatiivisista sillä, että ne ovat useammin huonommin erilaistuneita (Marur ym. 2010).

### **2.2.3 Suusyöpävaaraa mahdollisesti lisäävät leesiot ja tilat**

Suun kudoksissa esiintyviin suusyöpävaaraa lisääviin leesioihin (eng. oral potentially malignant disorders, OPMD) liittyy suurentunut syöpäriski verrattuna vastaavaan terveeseen kudokseen. Kaikki eivät siis kuitenkaan kehity syöviksi. (Warnakulasuriya ym. 2007.) Näihin leesioihin kuuluvat leukoplakia, erytroplakia ja suun proliferatiivinen verrukoosinen leukoplakia, lichen ruber planus eli

punajäkälätauti, punajäkälän kaltaiset muutokset eli likenoidit muutokset ja lupus erythematosus eli punahukka (Syrjänen ym. 2011, Suusyöpä.Käypä hoito 2012).

Punajäkälä on krooninen ja tulehduksellinen tauti, jota esiintyy iholla ja limakalvoilla arviolta noin 2 % väestöstä. Suun limakalvoilla se on yleisempi kuin iholla esiintyvä lichen planus. Punajäkälän etiologia on tuntematon, sitä esiintyy kuitenkin useimmiten naishenkilöillä, jotka ovat iältään 30—60-vuotiaita. Arviolta yksi sadasta suun punajäkälästä muuttuu suusyöväksi. Likenoideja muutoksia on vaikea erottaa punajäkälästä, mutta myös niihin liittyy malignisoitumisriski. Punajäkälä on kuitenkin useimmiten molemminpuolinen, kun taas likenoidi muutos voi olla myös toispuoleinen. (Konttinen ym. 2008, Suusyöpä. Käypä hoito 2012, Joensuu ym. 2013.)

Erytroplakisilla eli punertavilla muutoksilla on myös taipumus olla tai muuttua pahanlaatuisiksi: noin 90 % voi muuttua suusyöväksi. Tämän vuoksi erytroplakisia muutoksia tulee aina epäillä pahanlaatuisiksi ja ne tulee poistaa kokonaan ja tutkia histopatologisesti. Leukoplakisilla eli vaaleilla muutoksilla on taas huomattavasti pienempi riski malignisoitua: niistä vain 2—6 % malignisoituu. Tuntemattomasta syystä suurempi suusyöpäriski liittyy ei-homogeenisiin leukoplakisiin muutoksiin, jotka esiintyvät tupakoimattomilla naishenkilöillä. (Konttinen ym. 2008, Suusyöpä. Käypä hoito 2012, Joensuu ym. 2013.) Suun proliferatiivinen verrukoottinen leukoplakia on leukoplakisen muutoksen harvinainen muoto. Se kuitenkin malignisoituu todennäköisemmin kuin muut leukoplakiat. (Syrjänen ym. 2011.) Sekä erytroplakia että leukoplakia ovat kliinisiä termejä. Toisin sanoen, kun kaikki muut mahdolliset aiheuttavat tekijät on poistettu tai poissuljettu ja muutos sen jälkeen säilyy ennallaan kahden viikon ajan, diagnoosina on erytroplakia tai leukoplakia. Leuko- ja erytroplakiasta tulee aina ottaa kudoksenäyte lopullisen diagnoosin selvittämiseksi kahden viikon sisällä diagnoosista. Histologinen kuva voi olla vaihteleva epiteelin ylisarveutumasta dysplasian eri asteisiin tai jopa syöpä. (Suusyöpä. Käypä hoito.2012.)

HPV:ta on esitetty löytyvän kaksin- tai jopa kolminkertaisesti enemmän suusyöpävaaraa lisäävistä leesioista ja lähes viisinkertaisesti enemmän suuontelon levyepiteelikarsinoomista kuin normaaleista suun limakalvonäytteistä. (Miller ja Johnstone 2001, Syrjänen ym. 2011.) HPV:ta on löydetty suun punajäkälänäytteistä kaksinkertaisesti verrattuna suun normaaleihin limakalvonäytteisiin. HPV-tyypit, joita esiintyy eniten suun punajäkälänäytteissä, ovat 6 ja 11, jotka ovat niin sanottuja matalan riskin virustyyppisiä. Myös HPV-16 on todettu esiintyvän suun punajäkälänäytteissä, mutta vähemmän kuin

HPV-6:ta ja HPV-11:ta. Leukoplakisissa näytteistä sekä proliferatiivisista verrukoottisista leukoplakioista on myös löydetty HPV DNA:ta suunnilleen yhtä paljon kuin suun punajäkälänäytteistä. Erytroplakisissa muutoksissa HPV:n määrä näytteissä on suurempi: yli puolet näytteistä sisälsi HPV-16:sta. HPV-infektion osuus edellä mainittujen muutoksien ja tilojen kehittymiselle vaatii vielä tarkentavia tutkimuksia, jotta todellinen yhteys selviää. Voidaan kuitenkin todeta, että HPV:ta esiintyy enemmän suusyöpäriskiä lisäävissä suun limakalvomuutoksissa. (Syrjänen ym. 2011.)

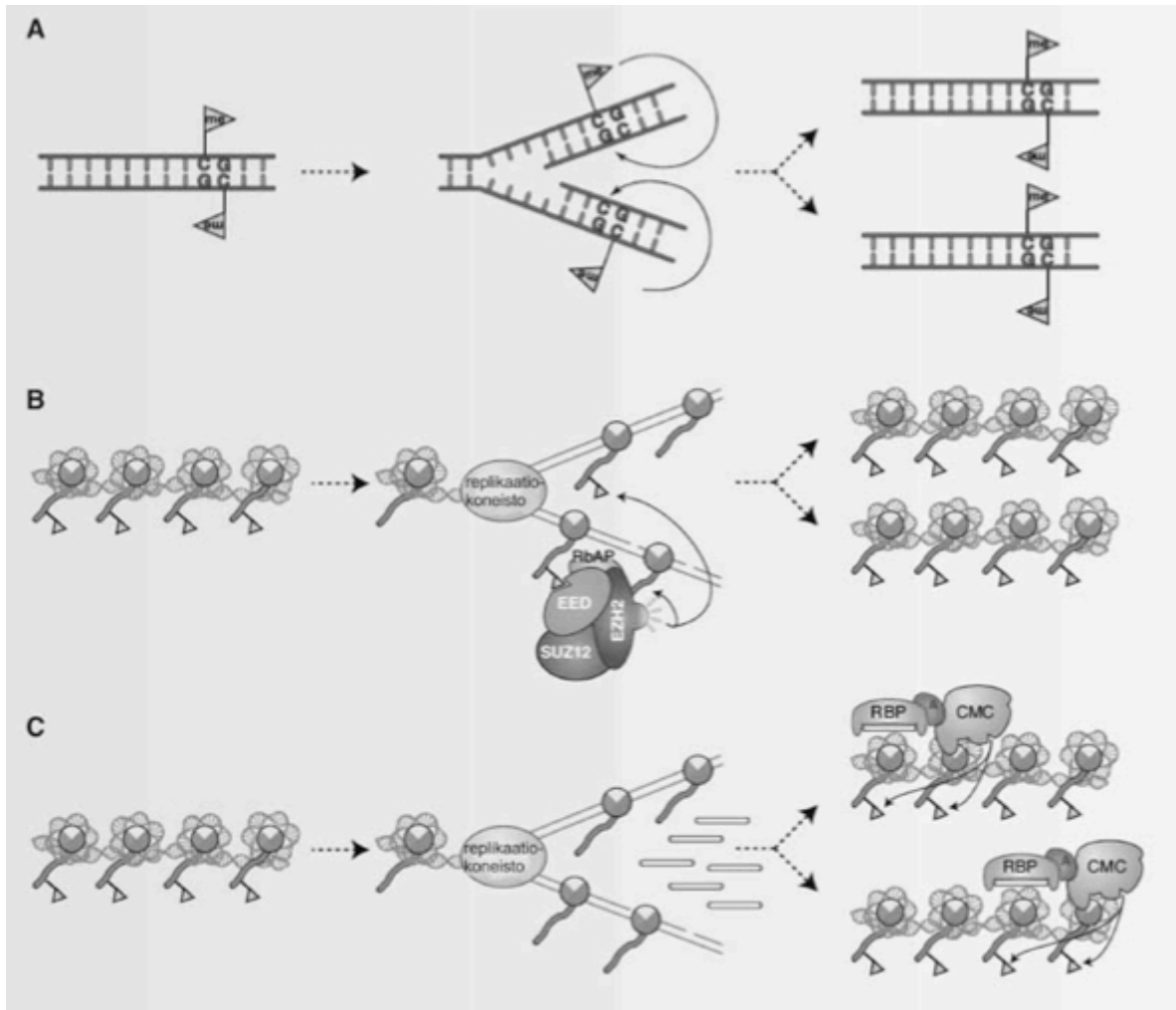
### 3. Epigeneettiset muutokset

Epigenomiikka säätelee geenejä genomien ulkopuolisten tekijöiden avulla. Epigeneettiset modifikaatiot eli DNA:n ”päälle” tapahtuvat muutokset, ovat edellytys nisäkkäiden normaalille kehitykselle. Ne voivat kuitenkin saada aikaan myös onkogeneenien aktivoitumista ja tuumorisuppressorigeenien inaktivoitumista, edesauttaen syöpien kehittymistä (Esteller 2006). Epigenomi koostuu kromatiinista ja siinä esiintyvistä muutoksista, sekä kovalenttisista muutoksista sytosiini-emäksien välillä. Epigenomi on mukana niin solun normaaleissa kuin epänormaaleissa toiminnoissa: muun muassa syöpien kehityksessä, virusinfektioissa, somaattisessa geeniterapiassa, kloonauksessa, geenien leimautumisessa, psyykkisessä terveydessä ja X-kromosomin inaktivaatiossa. (Costello ja Plass 2001, Laird 2003, Das ja Singal 2004, Baylin 2005.) Epigeneettisissä tapahtumissa syntyy muutoksia geenien ilmentymässä kehityksen ja solusyklin aikana niin, että itse DNA:n tai RNA:n nukleotidisekvensseissä ei tapahdu muutoksia. Tämä johtaa siihen, että muutokset ovat palautuvia, vaikka ne voivatkin olla periytyviä (kuva 5). (Das ja Singal 2004, Baylin 2005.) Epigenetiikka on nopeasti kasvava molekyylibiologian tieteenala, johtuen sen osuudesta tautien kehityksessä sekä sen mahdollistaman terapian vuoksi.

Epigeneettisiä mekanismeja on neljä: DNA metylaatio, histonimodifikaatiot, kromatiinin uudelleenmuokkaus sekä koodaamattoman RNA:n, kuten mikroRNA:n säätely (Sharma ym. 2010, Weichenhan ja Plass 2013). Jotta epigeneettiset muutokset olisivat mahdollisia, tarvitaan eri entsyymejä katalysoimaan ryhmien liittämistä DNA:han tai histoneihin sekä ryhmien poissiirtämistä DNA:sta tai histoneista. Näihin entsyymeihin kuuluvat muun muassa DNA metyyli transferaasit (DNA methyltransferases, DNMT), histoni metyyli transferaasit (histone methyltransferases, HMT) sekä histoni asetyyli transferaasit (histone acetyltransferases, HAT). (Weichenhan ja Plass 2013.) Seuraavaksi käsitellään lyhyesti eri epigeneettiset muutokset ja ne menetelmät, joita



epigenomiikassa käytetään. Kirjallisuuskatsaus painottuu kuitenkin DNA metylaatioon syövissä, joten sitä käsitellään laajemmin seuraavassa kappaleessa.



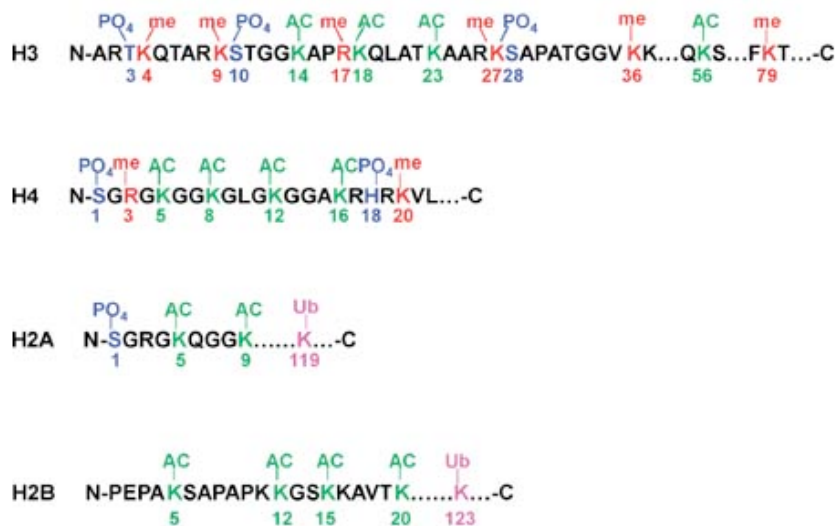
Kuva 5. Epigeneettisten muutosten periytyminen. **A.** DNA metylaatio ja sen periytyminen DNA:n replikoitua. **B.** Histonimodifikaatio ja sen periytyminen. Histoneihin voi liittyä useita erilaisia ryhmiä, jotka toimivat epigeneettisinä merkkeinä (pieni lippu kuvassa). Nämä epigeneettiset muutokset periytyvät entsyymaattisesti kun DNA replikoituu. **C.** Kromatiinin uudelleenmuokkaus. Heterokromatiinin transkriptio tuottaa miRNA-molekyylejä (vaakasuorat sauvat kuvassa). Nämä aktivoivat entsyymejä, jotka saavat aikaan sen että epigeneettiset muutokset säilyvät replikaation jälkeen. (Portin 2012.)

### 3.1 Histonimodifikaatiot

Ennen histonimodifikaatioita pidettiin toissijaisina muutoksina verrattuna DNA metylaatioon, mutta *Neurospora crassa*-sienilajikkeella tehdyt tutkimukset osoittavat, että DNA metylaatio voi myös olla riippuvainen histonimetylaatiosta (Tamaru ja Selker 2001). Histonimodifikaatioilla on tärkeä tehtävä

geeniekspression säätelyssä sekä kromatiinin rakenteessa (Esteller 2006). Kromatiini on DNA:n pakkausmuoto, joka koostuu nukleosomeista. Histonit, H3, H4, H2A, H2B, ovat proteiineja, joiden ympärille DNA-molekyylä kiertyy ja näin ollen histonin ja DNA:n muodostama kompleksi, nukleosomi, pystytään pakkaamaan solulle riittävän pieneen tilaan. (Sharma ym. 2010.) Histonimodifikaatioiden ja metylaation välillä on osoitettu olevan tiivis yhteys (Esteller 2006, Sharma ym. 2010) ja on mahdollista, että nämä kaksi tapahtumaa ovat riippuvaisia toisistaan (Li ym. 2013).

Histonimodifikaatiot tapahtuvat post-translacionaalisesti sen N-terminaali hännässä (kuva 6). Näihin translaation jälkeisiin tapahtumiin kuuluvat muun muassa asetylaatio, fosforylaatio, metylaatio ja ubikitinylaatio, jotka vaikuttavat transkriptioon, replikaatioon sekä solun korjausmekanismeihin (Tamaru ja Selker 2001, Sharma ym. 2010). Eri histonimodifikaatioilla on erilaisia vaikutuksia: toiset aktivoivat geenejä ja toiset inaktivoivat. Tiedetään, että osa histonimodifikaatioista aikaansaavat yhdessä metylaation kanssa tuumorisuppressorigeenin hiljentymisen. (Esteller 2006.) Myös histonin asetylaatio- ja metylaatioryhmien menetyksillä on raportoitu olevan yhteys ihmisten kasvaimiin. Histoni H4:n lysyiini-16 monoasetylaation sekä lysyiini-20 trimetylaation menetyksellä on todettu olevan yhteys kasvaimiin ja niitä pidetäänkin mahdollisina biologisina markkereina pahanlaatuisten muutosten synnyssä. (Fraga ja Esteller 2005.)



Kuva 6. Post-translacionaaliset histonimodifikaatiot. Histonien H3, H4, H2A ja H2B kovalentit modifikaatiot nisäkkäillä. PO<sub>4</sub>=fosforylaatio, me=metylaatio, AC=asetylaatio, Ub=ubikitinylaatio. (Kuva muokattu Zhang ja Dent 2005.)

### 3.2 Kromatiinin uudelleenmuokkaus

Ei-kovalenttisilla mekanismeilla on niin ikään tärkeä merkitys kromatiinin muokkauksessa. Näihin ei-kovalentteihin mekanismeihin kuuluvat muun muassa nukleosomien uudelleenmuokkaus ja histoniproteiinien korvaaminen toisilla histonivarianteilla, kuten H3.3:lla ja H2A.Z:lla. Liittämällä kyseisiä histonivariantteja nukleosomiin voidaan saada aikaan muutoksia geenien aktiivisuudessa. H2A.Z histonivariantin liittäminen saattaa vaikuttaa geenien aktivaatioon suojaamalla geenejä DNA metylaatioilta. Nukleosomien uudelleenmuokkaus, DNA metylaatiot ja histonimodifikaatiot ovat kaikki keskeisiä geeniekspressiossa sekä kromatiinin rakentumisessa. (Sharma ym. 2010.)

### 3.3 mikroRNA:n modifikaatiot

Ihmisen genomi koostuu suurelta osin pitkistä koodaamattomista RNA-jaksoista sekä lyhyistä koodaamattomista RNA-jaksoista, kuten mikroRNA:sta eli miRNA:sta. Nämä ovat lyhyitä, yksijuosteisia RNA-molekyylejä, jotka eivät koodaa proteiineja. Koodaamattomat RNA-jaksot säätelevät proteiinien solunsisäistä lokalisaatiota ja ovat mukana muun muassa translaatiossa, posttranslacionaalisissa modifikaatioissa, mRNA:n stabilisaatiossa ja kromatiinin muokkauksessa. (Weichenhan ja Plass 2013.) MiRNA:t säätelevät geeniekspressiota hiljentämällä posttranskriptionaalisesti geenejä. MiRNA:n ekspressiota voidaan säädellä epigeneettisin menetelmin, mutta ne pystyvät myös itse muokkaamaan epigeneettisiä mekanismeja solun sisällä. Niiden kohteena voi olla muun muassa DNA metyylitransferaasit, jolloin genomien normaali DNA metylaatio häiriintyy. (Sharma ym. 2010.) On havaittu, että osa miRNA:sta on onkogeenisia, kun taas osa ehkäisee tuumorigeneesiä. Syövissä on todettu olevan miRNA-155:n ja miRNA-21:n yliekspressoituneina ja miRNA-146:n, miRNA-15:ta ja miRNA-16:ta hiljennettynä. (You ja Jones 2012.) Tanskalainen tutkimusryhmä julkaisi vuonna 2012 työn, jossa he osoittivat että HPV-positiivisten ja -negatiivisten pään ja kaulan alueen karsinoomien miRNA-mallit eriävät toisistaan (Lajer ym.2012). Tähän syvennyttään myöhemmin kappaleessa 5.

### 3.4 DNA metylaatio

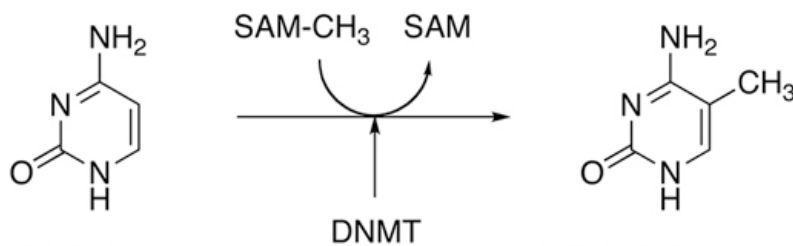
DNA metylaatio kuuluu yleisimpiin epigeneettisiin muutoksiin (Das ja Singal 2004), joka aikaansaa geenien, kuten tuumorisuppressorigeenien, hiljentymisen (González-Ramírez ym. 2011a). Se säätelee myös geenien ilmentymistä nisäkkäiden normaalissa kehityksessä. Syöpäsoluissa DNA metylaatiomallit ovat häiriintyneet.

DNA metylaatioissa metyyliryhmä (-CH<sub>3</sub>) sitoutuu kovalenttisesti sytosiinin rengasrakenteen 5'-hiileen, jolloin syntyy 5-metyylisytosiini (Kuva 7). Nämä metyyliryhmät liittyvät DNA:han sen isossa uurteessa, niin sanotussa major groovessa, sijaitseviin sytosiineihin, jossa ne ehkäisevät geenien transkriptiota. (Baylin 2005.) DNA metylaatiota tapahtuu pääosin sytosiini-guaaniini dinukleotideissa, joita esiintyy noin 1/80 dinukleotidien välein (Costello ja Plass 2001, González-Ramírez ym. 2011a). Metylaatiota esiintyy myös CpA- ja CpT-dinukleotideissa, mutta selvästi vähemmän (Costello ja Plass 2001, Das ja Singal 2004). Ihmisen genomi sisältää huomattavasti vähemmän CpG-dinukleotideja verrattuna CpA- ja CpT-dinukleotideihin. Ne myös sijaitsevat hajallaan genomissa. (Laird 2003.)

Vaikka DNA metylaatiota tapahtuukin CpG-saarekkeissa, jolloin se ehkäisee kromosomien epävakaaisuutta, niin pääsääntöisesti DNA metylaatiota esiintyy geenien välisillä alueilla sekä toistuvissa jaksoissa, kuten mikrosatelliittijaksoissa ja LINE- (eng. long interspersed nuclear element) ja SINE- (eng. short interspersed nuclear elements) jaksoissa. CpG-saarekkeet ovat normaalisti melko metyloitumattomia, mutta syöpäsolujen genomeissa on kuitenkin tyypillistä, että CpG-promootorialueet ovat hypermetyloituneita ja geenien väliset alueet hypometyloituneita. (Weichenhan ja Plass 2013).

CpG-saarekkeita ovat ne alueet DNA:ssa, jotka sisältävät kymmenkertaisen määrän CpG-dinukleotideja, sytosiini-guaaniini dinukleotideja, verrattuna muuhun DNA:han. CpG-saarekkeita pidetään geenien promootorialueiden osana, jotka vastaavat geenien transkription sekä replikaation aloituksesta (Delgado ym. 1998). Ihmisen genomista näiden saarekkeiden osuus on 1–12 % (González-Ramírez ym. 2011a). Noin 60 % kaikista geeneistä sisältää CpG-saarekkeita (Costello ja Plass 2001, Sharma ym. 2010). DNA metylaatiota esiintyy siis tavallisesti saarekkeiden ulkopuolella, lukuun ottamatta muutamia poikkeuksia, jotka kuuluvat yksilön normaalin kehitykseen. Esimerkki

kyseisestä on metylaatio naisten toisessa X-kromosomin geenissä aiheuttaen sen hiljentymisen (Costello ja Plass 2001).



Kuva 7. Sytosiinin metylaatio 5-metyylisytosiiniksi DNA metyyli transferaasin katalysoimassa reaktiossa. Metyyli ryhmän luovuttajana toimii S-adenosyylimetioniini. (Kuva muokattu [www-medchem.ch.cam.ac.uk](http://www-medchem.ch.cam.ac.uk)).

DNA metyyli transferaasit ovat entsyymiryhmä johon kuuluu kolme, DNMT1, DNMT2, DNMT3, entsyymiperhettä, jotka voidaan edelleen jakaa useampaan alaryhmään. Ne aikaansaavat DNA:n hypermetylaatiota liittämällä metyyli ryhmän sytosiinirenkaseen. Osa entsyymeistä saa aikaan uusia, *de novo*, metylaatiomalleja, jossa CpG-dinukleotidit ovat lähtökohtaisesti molemmissa DNA-juosteissa metyloitumattomia. Toiset entsyymit taas ovat niin sanottuja metylaatiomallin ylläpitäviä entsyymejä, jotka toimivat kun toisen DNA-juosteen CpG-dinukleotidi on metyloitunut ja toinen ei, eli ne ovat hemimetyloituneita. Nisäkkäillä on todettu olevan DNMT1, DNMT3a ja DNMT3b entsyymejä. Kaikki kolme entsyymiä aikaansaavat *de novo* -metylaatioita, mutta DNMT1:tä pidetään pääosin ylläpitävänä entsyyminä. (Costello ja Plass 2001, Das ja Singal 2004, Sharma ym.2010.)

DNA metylaation ollessa reversiibeli täytyy olla myös entsyymejä, jotka poistavat metyyli ryhmän sytosiinista, demetylaaseja. Demetylaasit ja niiden toiminta on jäänyt tutkijoillekin melko pitkään epäselväksi. Koska metyyli ryhmän poisto sytosiinista on energiataloudellisesti epäsuotuisa, niin vaihtoehtoisia mekanismeja ja entsyymejä, kuten glykosylaaseja, on ajateltu aiheuttavan aktiivista demetylaatiota. (Bhattacharya ym. 1999.) Toisaalta saattaa myös olla, että tapahtuu niin sanottua passiivista demetylaatiota DNA replikaation yhteydessä, jos ylläpitävä DNMT ei ole läsnä (Costello ja Plass 2001). Entsyymejä, joiden ajatellaan aiheuttavan demetylaatiota, ovat muun muassa 5-metyylisytosiiniglykosylaasi, joka poistaa metyloituneen sytosiinin DNA:sta, sekä MBD2b (eng. methyl-CpG binding domain 2), joka saa aikaan demetylaatiota hydrolysoimalla 5-metyylisytosiinin sytosiiniksi ja metanoliksi (Das ja Singal 2004).

### 3.5 Epigenomiikassa käytettävät menetelmät

González-Ramírez ja työtoverit (2011a) ovat listanneet artikkelissaan useita eri metodeja, joilla DNA metylaatioita voidaan tutkia. Menetelmät ovat kehittyneet ja edelleen kehittyvät jatkuvasti. Useat menetelmät perustuvat Southern Blot-tekniikkaan eli molekyylikoetinmenetelmään, jonka avulla pystytään tunnistamaan haluttu DNA-sekvenssi DNA-näytteestä. Tutkittava DNA-näyte pilkotaan restriktioentsyymeillä ja ajetaan elektroforeesin avulla geelissä, jonka jälkeen geelin sisältämät DNA kappaleet siirrostetaan kalvolle, josta haluttu DNA-sekvenssi voidaan paikantaa hybridisaation avulla käyttämällä leimattua komplementtisekvenssiä eli koetinta. DNA-sekvenssin täytyy olla yksijuosteinen, jotta koetin pystyy hybridisoitumaan näytteeseen. (Voet ja Voet 2011.)

Myös polymeerasiketjureaktioon, PCR, perustuvia menetelmiä on useita. PCR:n avulla pystytään monistamaan DNA:ta eksponentiaalisesti, joten jo hyvin pieni määrä DNA:ta riittää tutkimuksen suorittamiseen. Muun muassa metylaatio spesifissä PCR-menetelmässä pystytään selvittämään DNA:sta metyloituneet sytosiinit metyloitumattomista sytosiineista. Osa menetelmistä taas pohjautuu genomien määrittämiseen muun muassa isotooppien ja 2-D elektroforeesin avulla tai mikroarray- menetelmiin ja/tai bisulfinointiin, missä DNA käsitellään natriumbisulfiitilla, jonka jälkeen se monistetaan PCR-menetelmällä ja hybridisoidaan tai sekvensoidaan. (González-Ramírez ym. 2011a.)

DNA metylaatiota voidaan analysoida koko genomia kattavalla bisulfiitti sekvensoinnilla eli whole-genome bisulfite sequencing-menetelmällä, lyhyesti WGBS. Sillä voidaan erottaa metyloituneet ja metyloitumattomat sytosiinit toisistaan. Metyloitumattomat sytosiinit muuttuvat kyseisellä menetelmällä urasiiliksi kun metyloituneet sytosiinit pysyvät muuttumattomina. Ennen DNA-näytettä tarvittiin mikrogrammoja tekniikan suorittamista varten, mikä saattaa olla este tiettyjä kudos- ja tuumorinäytteitä otettaessa. Nykyään on kuitenkin käytössä uudempi menetelmä, joka pohjautuu niin sanottuun tagmentaatioon eli transposaasi-entsyymien toimintaan. Kyseinen menetelmä tarvitsee vain nanogrammoja DNA:ta analysoitavaksi. Toinen uusi menetelmä, joka myös mahdollistaa analysoinnin hyvin pienestä määrästä DNA:ta on PBAT eli post-bisulfite adaptor tagging. Etuna WGBS-menetelmään on se, että sillä voidaan välttää bisulfiitti sekvensoinnin aiheuttamat koskemattomien templaatti-DNA:n menetykset. (Weichenhan ja Plass 2013.)

### 3.6 DNA metylaatio ja syöpä

Epigeneettisten poikkeavuuksien yhteys syöpien kehityksessä havaittiin jo 80-luvulla (Costello ja Plass 2001). Syöpää pidetäänkin sekä geneettisten että epigeneettisten muutosten aikaansaamana tautina (Esteller 2006). Osa geeneistä, kuten tuumorisuppressorigeenit, voivat olla hypermetyloituneita, jolloin niiden toiminta inaktivoituu. Osa geeneistä taas voi olla hypometyloituneita, jolloin geenit, esimerkiksi onkogeenit, aktivoituvat. (Szyf 2006.) Varsinkin hypermetylaatio on ollut tiiviin tutkinnan aiheena jo pitkään, mutta viimeaikoina myös kiinnostus hypometylaation osuuteen syövän kehittymisessä on kasvanut.

#### 3.6.1 Hypermetylaatio syövässä

DNA hypermetylaatio saa aikaan geenien, varsinkin tuumorisuppressorigeenien, hiljentymisen sekä lisää genomien instabiliteettia (Demokan ja Dalay 2011). Monella eri syöpätyypillä on todettu olevan hypermetyloituneita CpG-saarekkeita tietyissä tuumorisuppressorigeeneissä, kuten *CDKN2A* (eng. cyclin-dependent kinase inhibitor), joka koodaa proteiinia p16, *BRCA1* ja *hMLH*, jolloin niiden toiminta hiljentyy (Esteller 2006, Ran ym. 2011). Metylaatio tapahtuu lähes yksinomaan CpG-saarekkeissa, jotka sijaitsevat useimmiten geenien promoottorialueilla (Moselhy ym. 2013). Solulla on kuitenkin olemassa monta korjausmekanismia, jolla se pyrkii estämään CpG-saarekkeiden hypermetylaatiota: aktiivisella transkriptiolla ja demetylaatiolla ja replikaation aloituksella. Myös kromatiini on muodostunut niin, että se estää DNMT-entsyymien pääsyn sen lähelle. On tutkittu, että useat geenit, jotka liittyvät apoptoosiin, solusyklin säätelyyn, DNA:n korjaukseen, lääkeresistenssin muodostumiseen, angiogeneesiin, solujen erilaistumiseen sekä metastaasien syntyyn syövässä, läpikäyvät hypermetylaatiota. (Das ja Singal 2004.) Osa näistä geeneistä, kuten *CDKN2A* ja *RASSF1A*, ovat hypermetyloituneet useassa eri syöpätyypissä, kun taas toisten geenien hypermetylaatio on enemmän syöpäspesifistä. Eturauhassyövässä on lähes aina hypermetyloitunut *GSTP1*-geeni (glutathione S-transferase), mutta akuutissa myeloisessa leukemiassa kyseinen geeni taas on lähes aina metyloimaton (Das ja Singal 2004). Pään ja kaulan alueen syöpään on yhdistetty *CDKN2A* geenin metylaatio (Sanchez-Cespedes ym. 2000). Kyseisen geenin promoottorialueen hypermetylaatiota on osoitettu esiintyvän myös useissa muissa syöpätyypeissä (Tsou ym.2002). Sen koodamaa proteiinia p16 käytetään myös HPV:n diagnostiikassa (Lassen ym. 2011).

CpG-saarekkeiden hypermetylaatio saa aikaan myös sellaisten tuumorisuppressorigeenien hiljentämistä, jotka koodaavat miRNA:ta. Munasarjasyövän kudoksesta on löydetty miR-130b, miRNA prekursorin, hypermetylaatiota. Myös syöpäresistenteistä solulinjoista on löydetty miR-130b hypermetylaatiota. (Li ym. 2013.) Li ja työtovereiden (2013) kohdunkaulan syöpiä koskevassa julkaisussa todetaan, että miRNA:den DNA metylaatio on yhteydessä tuumorin aggressiivisuuteen. He esittävät mahdollisuuden, että miRNA:den, jotka liittyvät syöpiin, hiljentäminen CpG-saarekkeiden hypermetylaatiolla on yhteydessä kasvaimien syntyyn ihmisissä.

Promoottorialueiden hypermetylaatio tapahtuu useimmiten tärkeiden tuumorisuppressorigeenien CpG-saarekkeissa. Yleisimpiä tuumorisuppressorigeenejä, jotka metyloituvat ja tällöin inaktivoituvat, ovat *VHL*, *hMLH1* ja *CDKN2A* (Sanchez-Cespedes ym. 2000). Tutkimusten välillä on kuitenkin suurta vaihtelua, missä tuumorisuppressorigeeneissä metylaatioita tapahtuu, ja ne vaihtelevat eri syöpien välillä. Tuumorisuppressorigeenien lisäksi on havaittu muidenkin geenien hiljentymistä promoottorialueen hypermetylaatiolla. DNA:n korjausgeeni *MGMT* (<sup>6</sup>O-Methylguanine-DNA-methyltransferase), detoksifikaatio geeni *GSTP1* ja etäpesäkkeiden syntyä inhiboiva geeni *DAPK* (death associated protein kinase) ovat esimerkkejä näistä (Sanchez-Cespedes ym. 2000).

Hypermetylaation on siis osoitettu olevan mukana monen eri syövän kehityksessä. Myös monet eri geenit ovat hypermetylaation kohteena, joidenkin ollessa monessa eri syövässä hypermetyloituneina ja joidenkin vain tietyissä syövässä. Esimerkiksi keuhkosyövässä on raportoitu olevan yli 40 geeniä, joilla oli normaalista poikkeava DNA metylaatio (Tsou ym. 2002). Ne geenit, jotka hypermetyloituvat usein pään ja kaulan alueen syövässä, käydään läpi tarkemmin kappaleessa 4.

### **3.6.2 Hypometylaatio syövässä**

Hypometylaatiota ja sen osuutta syövässä ei pitkään pidetty niin olennaisena kuin hypermetylaation osuutta, ja näin ollen suuri osa tutkimuksista keskittyi pääasiassa hypermetylaation vaikutuksiin syövässä. Hypometylaatio on kuitenkin tärkeä syövän synnyn kannalta ja syöpäsoluissa on havaittu esiintyvän genomilaajuista hypometylaatiota (Tsou ym. 2002, Ehrlich 2009). On myös todistettu että syövän genomissa esiintyy useimmiten samanaikaisesti sekä hypo- että hypermetylaatiota (Ehrlich 2009).



Syöpien hypermetylaatio liittyy lähes aina CpG-saarekkeisiin, kun taas hypometylaatiota esiintyy usein toistuvissa DNA-jaksoissa (eng. repeated elements). Kaksi yleisintä toistuvaa jaksoa, joita havaitaan syövän genomissa on LINE, varsinkin LINE-1:tä, ja SINE, joista yleisin on Alu-jakso. Myös muita hypometyloituneita toistuvia jaksoja on löydetty tuumoreista muun muassa LTR-jaksot (eng. long terminal repeats) (Rauch ym. 2007). Syöpäsolujen hypometylaatio johtaa usein eri retrotransposonien, kuten edellä mainitut LINE-1 ja SINE, aktivoitumiseen (Das ja Singal, 2004, Costello ja Plass 2001). Retrotransposonit ovat DNA-sekvenssin osia, jotka pystyvät muuttamaan paikkaa genomissa sisällä. LINE-1, joka on arviolta 6 kb:n pituinen, sijaitsee lähinnä ei-koodaavassa DNA:ssa ja sen osuus ihmisen genomista on 15–18 % (Ehrlich 2002, Hur ym. 2013). Kyseinen jakso sisältää myös runsaasti metyloituneen CpG-saarekkeen (Hur ym. 2013). Alu-jakso on pienempi noin 0,3 kb:n pituinen ja sen osuus genomista on hieman yli 10 %. Normaalisti Alu-jaksot ovat runsaasti metyloituneita, mutta syövässä ne esiintyvät hypometyloituneina. (Ehrlich 2002.)

Sekä hypo- että hypermetylaatiolla on tyypillistä, että ne voivat esiintyä lähes kaikentyypisissä syöpäsoluissa, ne voivat esiintyä hyvin aikaisessa vaiheessa tuumorigeneesiä ja ne yleensä lisääntyvät syövän kehittyessä. Niillä molemmilla on myös todettu olevan tarkoin määrätty malli tietyille syöpätyypeille. (Ehrlich 2009.) Esimerkki hypo- ja hypermetylaation vuorovaikutuksesta on *UNC5D*-geeni, jossa on havaittu syöpäspesifejä hypo- sekä hypermetylaatioita. Geenin promootorialueen huomattiin olevan hypermetyloitunut, kun SINE-jaksot olivat hypometyloituneet. (Rauch ym. 2007.) Hypometylaatio osallistuu karsinogeneesiin kuitenkin usealla tavalla, kuten vaikuttamalla epäsuorasti tiettyihin geeneihin ja lisäämällä kromosomaalista instabiliteettia ja retrotransposonien aktivaatiota (Ehrlich 2002, Tsau ym. 2002, Das ja Singal 2004). Liikkuvan DNA:n hypometylaatio voi myös aikaansaada transkriptionaalisen aktivoitumisen ja häiritä viereisten geenien ekspressiota (Das ja Singal 2004).

DNA hypometylaatio on liitetty useaan eri syöpätyyppiin, kuten koolonin, prostatan, mahan sekä kohdunkaulan syöpiin (Feinberg ja Vogelstein 1983, Bedford ja Helden 1987, Kim ym. 1994, Cravo ym. 1996). Myös pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinooman yhteyttä hypometylaatioon on tutkittu. Smithin ja työtovereiden (2007) tutkimuksessa osoitettiin, että 67 % levyepiteelikarsinoomista pään ja kaulan alueella olivat hypometyloituneita promootorialueella.

Tuoreessa julkaisussa on tutkittu LINE-1 hypometylaation ja paksusuolensyövän metastaasien yhteyttä. Tutkimuksessa todettiin selvä yhteys paksusuolensyövän sekä varsinkin sen maksametastaasien ja LINE-1 hypometylaation välillä. Tutkimus osoittaa myös, että spesifinen LINE-1-jaksojen hypometylaatio, aikaansaa tiettyjen onkogeenien, *MET*, *RAB3IP* ja *CHRM3*, aktivaation. Myös lisääntyneen 5-hydroksimetyylisytyosiinin (5-hydroxymethylcytosine, 5hmc) ja LINE-1 hypometylaation välillä todettiin yhteys (Hur ym. 2013). Jo vuonna 1983 Feinberg ja Vogelstein osoittivat, että *HRAS* geeni on hypometyloitu useassa paksusuolen adenokarsinoomassa, todistaen onkogeenien ja hypometylaation välisen yhteyden (Feinberg ja Vogelstein 1983).

Toinen endogeeninen hypometyloitu retrotransposoni LINE-1:n lisäksi on *HERV-K*-geeniperhe. Se on normaalisti runsaasti metyloitu, mutta hypometyloituneena se on usein yhdistetty syöpään. Vaikka *HERV*:n promootterin demetyloituminen ei ole niin merkittävä kuin LINE:n, niin se on silti hyvä mainita. (Rauch ym. 2007).

Mekanismi hypometylaation taustalla on vielä suhteellisen tuntematon ja siitä on olemassa useita hypoteeseja. On mahdollista, että toistuvat DNA-jaksot demetyloituvat syöpäsoluissa vilkkaasti DNA demetylaasin aktivoituessa. Kyseisen entsyymin toiminta nisäkkäillä on kuitenkin vielä jäänyt osittain selvittämättä. Toinen mahdollinen mekanismi hypometylaatiolle on DNMT1-entsyymin vajavainen toiminta syöpäsoluissa (Rauch ym. 2007). Toisaalta DNMT3a:n ja DNMT3b:n osuutta mekanismin taustalla on myös tutkittu. DNA-jaksojen hypometylaatio voi myös epäsuorasti tai suorasti vaikuttaa geeniekspressioon lisäämällä DNA:n rekombinaatiota. (Elrich 2009.)

### **3.6.3 Ravintoaineiden merkitys DNA metylaatioon sekä syöpään**

Eri ravintoaineiden vaikutuksia DNA metylaatioon on tutkittu. Varsinkin B-ryhmän vitamiinit folaatti ( $B_9$ ) sekä kobalamiini ( $B_{12}$ ) vaikuttavat metylaatioon, sillä ne vaikuttavat hiilimetaboliaan ja niiden määrien ollessa vajavaiset metabolia häiriintyy. Ravinnosta saatavan folaatin ja metyleeni tetrahydrofolaatti reduktaasin (MTHFR) häiriöiden vaikutukset metylaatiomalleihin sekä syöpä- että normaaleissa kudoksissa ovat tutkinnan kohteena. (Das ja Singal 2004.)

MTHFR-entsyymi muuttaa 5,10-metyleenitetrahydrofolaatia 5-metyylitetrahydrofolaatiksi, joka taas voi luovuttaa metyyliryhmänsä homokysteiinille muodostaen metioniinia (Das ja Singal 2004). Metioniinin täytyy taas edelleen muuttua S-adenosyylimetioniiniksi (SAM), joka on ensisijainen metyyliryhmän luovuttaja monissa reaktioissa (Costello ja Plas 2001). Entsyymistä on havaittu olevan kaksi polymorfista varianttia, joista toinen on yhteydessä tiettyjen syöpien lisääntyneeseen riskiin. Tämä polymorfismi saattaa olla yhteydessä folaatin saantiin. Jos folaatin saanti on liian vähäinen, sekä DNA metylaatio että DNA synteesi ja sen korjaus, saattavat huonontua yksilöillä joilla on kyseinen polymorfismi. Tämä taas saattaa lisätä yksilön riskiä saada syöpä. (Das ja Singal 2004.)

Liian vähäisellä folaatin saannilla on todettu olevan yhteys sekä geenien hypo- että hypermetylaatioon. On todettu, että *p53*-geenillä tapahtuu hypometylaatiota. Myös DNMT-entsyymien aktiivisuus lisääntyy, kun folaatin saanti on vähäistä. Folaattivajeen jatkuessa pitkään lisääntyy kuitenkin sekä *p53*:n metylaatio että genomilajainen metylaatio. (Das ja Singal 2004.) Suuremmalla folaatin saannilla voi olla suojaava vaikutus muun muassa keuhkosyöpää vastaan (Dai ym. 2013).

#### **4. DNA metylaatio pään ja kaulan alueen syövissä**

Kuten muissakin syövissä, myös pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomissa geenien promoottimetylaatiolla on suuri merkitys syövän kehityksessä (González-Ramírez ym. 2011a). Suun alueen syövät ovat niin heterogeeninen ryhmä, että metyloituvat geenit ja niiden metylaatioaste kuitenkin vaihtelevat paljon (Demokan ja Dalay 2011). Seuraavaksi käsitellään geenien hyper- ja hypometylaatioiden sekä mikrosatelliitti-instabiliteetin merkityksiä pään ja kaulan alueen syövissä.

##### **4.1. Geenien hypermetylaatio pään ja kaulan alueen syövissä**

Yalniz ja työtoverit (2011) tutkivat 24 tuumorisuppressorigeenin metylaatioita pään ja kaulan alueen syövissä. He havaitsivat, että 16:sta geenissä oli metylaatioita yhdessä tai useammassa kasvainnäytteessä. Geenit, joiden todettiin olevan toistuvasti hypermetyloituneita kasvainkudoksessa olivat *CHFR* (19 %), *RARβ* (15 %), *DAPK1* (11.9 %) ja *RASSF1A* (11.1 %). Kahdeksalla geenillä ei havaittu

promootterialueen metylaatiota missään kudoksenäytteissä. Nämä geenit olivat *CDKN2A*, *CDKN1B*, *MLH1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PTEN*, *HIC1* ja *VHL*. Chenin ja työtovereiden (2007) tutkimuksessa oli 28 primaaria pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomaa, joista 14:sta tapauksesta löydettiin promootterihypermetylaatiota. Tutkimuksen kohteena oli 22 syöpägeeniä ja hypermetyloituneimmat geenit olivat *RARβ* (39 %), *CHFR* (25 %) ja *APC* (21 %). Yalnizin ja työtovereiden (2011) sekä Chenin ja työtovereiden (2007) tulokset *RARβ*:n ja *CHFR*:n hypermetylaatiosta täydentävät toisiaan.

Steinmann ja työtoverit (2009) tutkivat 15 geenin promootterihypermetylaatiota 54 pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomanäytteessä sekä 23 normaalissa kudoksenäytteessä. Tutkimus osoitti, että geenien hypermetylaatiota esiintyi huomattavasti enemmän karsinoomanäytteissä (42 %) kuin tavallisissa kudoksenäytteissä (23 %). Geenit, joissa heidän tutkimuksen mukaan oli eniten promootterialueen hypermetylaatiota, olivat *p16* (60 %), *MGMT* (53 %), *DAPK* (67 %), *RARβ* (75 %), *MLH1* (69 %), *CDH1* (43 %), *RASSF5* ja *MST1* (96 %). (Steinmann ym. 2009.) Steinmannin ja työtovereiden (2009) sekä Yalnizin ja työtovereiden (2011) tulokset *p16* (*CDKN2A*) metylaatiosta ovat ristiriidassa. Taulukossa 1 on koottu yhteen eri tutkimusryhmien löydökset geenien hypermetylaatioista.

Taulukko 1. Promootterihypermetylaatio suuontelon (OC) tai pään ja kaulan alueen (HNC) levyepiteelikarsinoomissa

Tutkimus	Kudos	n	p15 (%)	p16 (%)	E-kad. (%)	DAPK (%)	MGMT (%)	MLH1 (%)	RARβ (%)	MST1 (%)
Viswanathan ym. 2003	OC	99	23	23	35		41	8		
Kulkarni ja Saranath 2004	OC	60		67		68	52			
Czerninski ym. 2009	OC	28						17		
Supić ym. 2009	OC	77		58	43	37	34			
González-Ramírez ym. 2011b	OC	50						76		
de Freitas Cordeiro-Silva ym. 2012	OC	45		24						
Sanchez-Céspedes ym. 2000	HNC	95		27		18				
Rosas ym. 2001	HNC	30		47		33	23			
Chen ym. 2007	HNC	28							39	
Steinmann ym. 2009	HNC	54		60		67	53	69	75	96
Yalniz ym. 2011	HNC	126		0		11,9		0	15	

*RASSF*-geenit ovat mukana signaalitransduktiossa, *RARβ*-geeni taas vaikuttaa solujen erilaistumiseen, *CDH1*-geeni on mukana soluadheesiossa, *DAPK* ja *MST* indusoivat apoptoosia, *p16* ja *LATS*-geenit

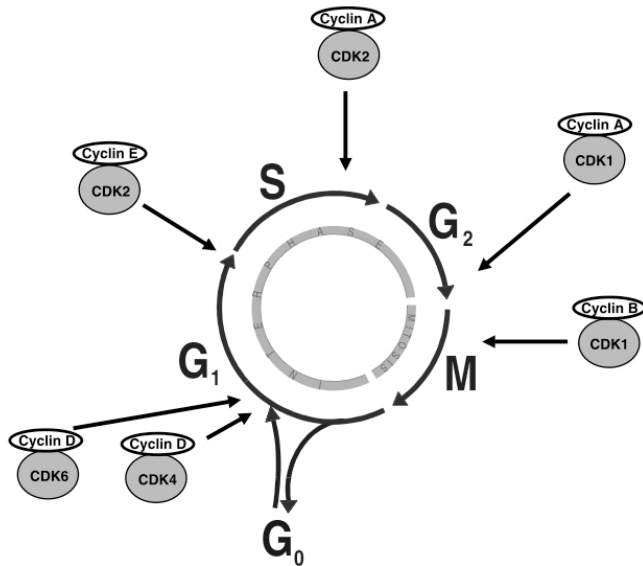
kontrolloivat solusykliä. DNA:n korjausgeenejä ja geenejä, jotka estävät DNA:n vaurioita ovat *GSTP1*, *MGMT* ja *MLH1*. (Steinman ym. 2009.) (Taulukko 2)

Taulukko 2. Yleisimmät hypermetyyloituivat geenit suuontelon syövässä (www.omim.org, Wang ym. 2011, Lleras ym. 2013, Dammann ym. 2015).

Geeni	Tehtävä	Sijainti	Metylaation vaikutus
<b>p15 (CDKN2B)</b>	Kasvunsäätelijä	9p21.3	G1-vaiheen inaktivaatio (CDK4, CDK6 inaktivaatio)
<b>p16 (CDKN2A)</b>	Koodaa proteiineja, jotka säätelevät p53- ja Rb-reittejä	9p21.3	G1-vaiheen inaktivaatio (CDK4, CDK6 inaktivaatio)
<b>MLH1</b>	DNA mismatch-korjausgeeni	3p22.2	Geenin ekspression hiljeneminen ja häiriöt DNA:n korjausmekanismeissa
<b>MGMT</b>	DNA:n korjausgeeni	10q26.3	Lisää sensitiisyyttä alkyloiviin aineisiin
<b>E-kadheriini (CDH1)</b>	Lisää solujen proliferaatiota ja invaasiota, solujen välinen adheesio	16q22.1	aktivoi EGFR:a, lisää syövän invaasiokykyä?
<b>DAPK</b>	Käynnistää apoptoosin	9q34.1	Apoptoosin häiriö
<b>RARβ</b>	Solujen erilaistuminen	3p24.2	Geenin hiljentymisen
<b>MST1</b>	Käynnistää apoptoosin	3p.21.31	Apoptoosin häiriö
<b>CHFR</b>	Säätelee solusyklin siirtymistä mitooseen	12q24.3	Mitoottinen "tarkastusasema" häiriintyy
<b>RASSF</b>	Signaalitransduktiossa, solukasvun säätelijä, solukuoleman käynnistäjä	3p21.3	Apoptoosin häiriö?
<b>APC</b>	Wnt-signaali, soluadheesio, migraatio, apoptoosi	5q22.2	Vaikuttaa syövän kehittymiseen sekä uusiutumiseen
<b>Rb</b>	Solusyklin säätelijä	13q14.2	Solujen proliferaatio

Kuten on jo mainittu, on vaikeaa määrittellä millä geneilla on suurimmat vaikutukset pään ja kaulan alueen syöpien kehittämisessä, koska tutkimustulokset ovat ristiriidassa keskenään. Tuloksiin vaikuttaa tutkittavana ollut syöpätyyppi ja tutkimusmenetelmä, sillä osa tutkimuksista käsittelee pään ja kaulan alueen syöpiä laajempina kokonaisuuksina, joka kattaa kaikki pään ja kaulan alueen syövät, kun taas toiset ovat tutkineet spesifisemmin esimerkiksi suuontelon levyepiteelikarsinomia. Kuitenkin, kuten muissakin syövässä, ne geenit joissa promootterimetylaatiota tapahtuu, ovat usein vastuussa solusyklin säätelystä. Seuraavaksi käsitellään niitä geenejä, joiden hypermetylaatiota on tutkittu toistuvasti pään ja kaulan alueen syövässä.

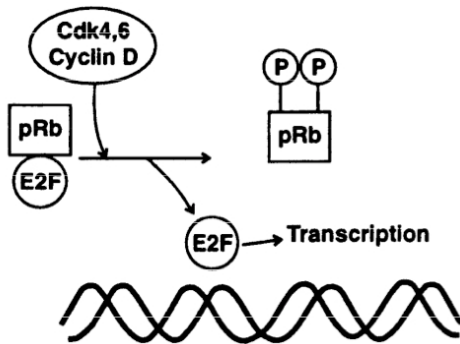
*CDKN2A* koodaa sykliinikinaasi-inhibiittoria ja se pitää retinoblastooma (Rb) proteiinin aktiivisena ja estävää sen fosforyloitumisen (kuva 9)(Rosas ym. 2001). Se estää solua siirtymästä G1-faasista S-faasiin (kuva 8) (El-Naggar ym. 1997).



Kuva 8. Solusykli. G<sub>1</sub>-vaiheessa solu kasvaa, S-vaiheessa tapahtuu DNA:n replikaatio, G<sub>2</sub>-vaiheessa varmistetaan DNA:n eheys ja M-vaiheessa tapahtuu solun jakautuminen eli mitoosi. G<sub>0</sub>-vaiheessa solujen solusykli on pysähtynyt. Suurin osa soluista on G<sub>0</sub>-vaiheessa, josta solusykli voi taas käynnistyä kun tarvittavat kasvutekijät ovat läsnä. Solusyklin säätelyn pääkomponentit ovat sykliinit ja sykliiniriippuvaliset proteiinikinaasit (CDK:t). (Schafer 1998.)

Muutokset *CDKN2A* funktiossa tapahtuu joko deleetioilla, promootterialueen hypermetylaatioilla tai harvemmin pistemutaatioilla (Rosas ym. 2001). Tutkimuksissa on tilastoitu vaihtelevia metylaatioasteita. Viswanathan ja työtoverit (2003) löysivät 23 % *CDKN2A* promootterialueen hypermetylaatiota tapauksistaan, kun taas Kulkarnin ja Saranathin (2004) tutkimuksessa tulos oli 67 %. Molemmissa tutkimuksissa käytettiin näytteinä suuontelon levyepiteelikarsinoomia. Useiden geenien metylaatioita tutkiva ryhmä ei havainnut *CDKN2A* metylaatioita (Yalniz ym. 2011). Rosasin ja työtovereiden (2001) tutkimus pään ja kaulan alueen primaarisyöpien *CDKN2A* hypermetylaation esiintyvyydestä oli 47 %. El-Naggar ja työtoverit (1997) toivat esille tutkimuksessaan myös sukupuolten mahdollisen merkityksen sen muutoksille. He totesivat, että 92 % naisten kasvaimista ja 55 % miesten kasvaimista osoitti muutoksia *CDKN2A*-geenissä. Toisaalta tutkimuksessa oli mukana ainoastaan 13 naista ja 33 miestä, joten tulos ei ole täysin verrattavissa suuren epäsuhtan vuoksi. He saivat myös selville, että nielun kasvaimissa on enemmän *CDKN2A* muutoksia kuin muilla pään ja kaulan alueilla. Nielun syöivistä 85 %:lla, kielen syöivistä 50 %:lla ja muilla alueilla 67 %:lla on muutoksia tässä geenissä. (El-Naggar ym. 1997.)

*Rb*-geenillä on todettu yhteys suuontelon syöpien karsinogeneesiin. *Rb* on onkogeeni, jonka tehtävänä on estää säännöstelemätöntä solukasvua. De Oliveiran ja työtovereiden (2012) tutkimuksessa todettiin suuontelon levyepiteelikarsinoomanäytteiden sisältävän enemmän *Rb*-proteiinia kuin mitä näytteet suusyöpävaaraa lisäävistä leesioista sisälsivät. Pahanlaatuiset leesiot sisälsivät siis enemmän *Rb*-proteiinia, mikä viittaa siihen että sitä voitaisiin käyttää ennusteen määrittämisessä tai biomarkkerina (De Oliveira ym. 2012).



Kuva 9. Retinoblastoomaproteiinin (pRb) inaktivaatio. Hypofosforyloitunut pRb on sitoutunut E2F-transkriptiofaktoriin. Kun sykliini-cdk-kompleksi fosforyloi pRb:n se inaktivoituu ja vapauttaa samalla E2F-transkriptiofaktoriin, joka aikaansaa solusyklin aktivoitumisen. (Schafer 1998.) HPV-16 E7 onkoproteiini vapauttaa myös E2F-transkriptiofaktoriin sitoutuessaan *Rb*-proteiiniin (ks. sivu 36).

*E*-kadheriini on kalsiumriippuvainen glykoproteiini, joka toimii solupinnan adheesiomolekyylinä (Moselhy ym. 2013). Sitä kutsutaan myös *Cadheriini-1* sekä lyhyemmin *CDH1* ([www.omim.org](http://www.omim.org)). Häiriöt *E*-kadheriinin normaalissa toiminnassa ovat yhteydessä eri syöpiin, varsinkin epiteelistä lähtöisin oleviin syöpiin. On tutkittu, että glykoproteiinin promoottorialueen hypermetylaatiolla, kromatiinirakenteen muutoksilla sekä transkriptiotekijöiden toiminnalla on osuutta *E*-kadheriinin toiminnan vajavuuteen. Kuitenkin syövässä, joissa todetaan *E*-kadheriinin normaalissa toiminnassa häiriöitä, on harvoin mutaatioita. (Moselhy ym. 2013.) Sen toiminnan vaje on yleinen löydös useissa syövässä ja sillä on todettu olevan yhteys myös syövän levinneisyyteen ja kykyyn metastasoida (Ran ym. 2011). Ran ja työtoverit (2011) myös tutkivat *E*-kadheriinin promoottorialueen hypermetylaatiota nenänielun syövässä. He osoittivat, että nenänielun syövässä oli yleisesti havaittavissa *E*-kadheriinin promoottorialueen hypermetylaatiota verrattuna nenänielun normaaliin kudokseen, jossa tällaista hypermetylaatiota ei ollut. Tutkimustulos samalla viittaa, että CpG-saarekkeiden hypermetylaatiolla ja *E*-kadheriinin hiljentymisellä on yhteys.

Viswanathan ja työtoverit (2003) ehdottavat tutkimuksessaan, että DNA:n korjausgeeni *MGMT*:n sekä *E*-kadheriinin metylaatiota esiintyisi eniten suuontelon levyepiteelikarsinoomissa intialaisilla

potilailta. He saivat tulokseksi, että 41 % *MGMT*:n ja 35 % *E-kadheriin*in promooterialueista oli hypermetyloitunut kaikista suuontelon levyepiteelikarsinomanäytteistä. Toisaalta Rosas ja työtoverit (2001) julkaisivat omassa tutkimuksessaan, että *MGMT*:n hypermetylaatiota esiintyi vain 23 % pään ja kaulan alueen kasvaimista. Kulkarni ja Sarah (2004) sitä vastoin julkaisivat suurimman yhteyden *MGMT*:n hypermetylaatiolla ja suuontelon levyepiteelikarsinoomalla, he löysivät 52 %:lla näytteistä kyseisen geenin hypermetylaatiota. Heidän näytteensä olivat potilailta, jotka käyttivät purutupakkaa, joka voi vaikuttaa tulokseen.

On raportoitu aikaisemmin, että epidermaalinen kasvutekijäreseptori eli EGFR vähentäisi *E-kadheriin*in toimintaa. EGFR sekä sen ligandin yliekspressiota on löydetty 80–90 %:ssa pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomissa (Muller ym. 2008). Sen yliekspression on osoitettu olevan yhteydessä huonontuneeseen hoitovasteeseen sekä eloonjäämisennusteeseen (Ang ym. 2002). Myös *E-kadheriin*in vaikutusta EGFR:iin tutkittiin tuoreessa julkaisussa, jossa todettiin *E-kadheriin*in vähentyneen aktivaation aiheuttavan EGFR:n transkription lisääntymistä. Jos *E-kadheriin*in toiminta loppuu kokonaan saattaa se johtaa pään ja kaulan levyepiteelikarsinoomien määrän kasvuun aktivoimalla EGFR:a ja siihen liittyviä signalointireittejä. (Wang ym. 2011.)

Yleisin geeni, joka liitetään kaikkiin syöpiin on *p53*, joka saa aikaan solujen apoptoosia G1-vaiheessa (kuva 8), silloin kun DNA on vaurioitunut niin, ettei se enää korjaudu. Tämän vuoksi sitä pidetään myös tuumorisuppressorigeeninä. Useissa syövissä on todettu *p53*:n olevan mutatoitunut, jolloin solun normaali toiminta häiriintyy ja soluissa tapahtuu kontrolloitumatonta proliferaatiota sekä solujen antiproliferatiiviset toiminnot, kuten apoptoosi, loppuu. *p53*:n mutaatiot ovat vahvasti yhdistetty tupakan polttoon pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomissa (Brennan ym. 1995, Llewellyn 2001). On julkaistu, että mutaatiot *p53*:ssa ovat 3,5-kertaiset niillä, jotka sekä polttavat ja juovat alkoholia kuin niillä, jotka eivät polta tai juo (Brennan ym. 1995). *p53*:n inaktivaatio saattaa myös olla tärkeä suusyöpävaaraa lisäävien leesioiden synnyssä pään ja kaulan alueen syövissä (Boyle ym. 1993). De Oliveiran ja työryhmän (2012) mukaan premaligneissa leesioissa oli enemmän *p53*:a kuin suuontelon levyepiteelikarsinoomissa. On tutkittu, että muutokset *p53*-geenissä voivat saada aikaan sen tuumorisuppressorivaikutuksen alenemista, mutta myös aikaansaada mutantin *p53*-proteiinin, jolla taas saattaa olla onkogeenisia ominaisuuksia (Min ym. 1994).



## 4.2 Mikrosatelliitti-instabiliteetin merkitys pään ja kaulan alueen syövässä

Ihmisen mismatch-korjaus-järjestelmä, MMR-järjestelmä, on tärkeä genomin eheyden ylläpitämisessä. Jos MMR-järjestelmä järkkyy, lisääntyvät mutaatiot kaksin- tai kolminkertaisesti ja syöpien, joissa on mikrosatelliitti-instabiliteettia, kehittyminen lisääntyy. (Wang ym. 2013.) DNA:n MMR-järjestelmän aktivaation loppuminen MMR-geenien hypermetylaatiolla aiheuttaa DNA:n toistojaksojen epävakauden, jota siis kutsutaan mikrosatelliitti-instabiliteetiksi (Demokan ym. 2006, Wang ym. 2001). Pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomissa mikrosatelliitti-instabiliteettia on todettu arviolta 7–30 %:lla potilaista (Ishwad ym. 1995, El-Naggar ym. 1996). Wangin ja työtovereiden (2001) tutkimuksessa mikrosatelliitti-instabiliteettia löytyi kaikkiaan 58 %:lla pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomanäytteistä. Jos alle 45-vuotiaita ei lasketa mukaan, mikrosatelliitti-instabiliteetin esiintyvyys on 36 %, kun taas jos pelkästään alle 45-vuotiaat otetaan mukaan, nousee arvo 88 %:iin. Tämä todistaa, että mikrosatelliitti-instabiliteetti liittyy varsinkin nuorempien potilaiden pään ja kaulan alueen karsinoomien syntyyn. (Wang ym. 2001.)

Mismatch-geenien inaktivaatiota pidetään yleisimpänä syynä sille, että mikrosatelliitti-instabiliteettia esiintyy kasvaimissa (Wang ym. 2013). Pään ja kaulan alueen syöpien kannalta tutkimukset ovat melko alussa ja tutkimustulokset mismatch-geenien osuudesta syöpien kehittymiselle ovat vielä ristiriitaisia. Eniten tutkitut mismatch-geenit, ovat *hMLH1* ja *hMSH2*. *hMLH1*-geeni on yhdistetty myös muun muassa maksa-, rinta- ja mahasyöpiin (González-Ramírez ym. 2011b). Viswanathan ja työtovereiden (2003) tutkimuksessa *hMLH1*:n promootterihypermetylaatiota on vain 8 % suun levyepiteelikarsinoomissa. Hieman uudemmassa Czerninskin ja työtovereiden (2009) julkaisussa sen sijaan 50 %:ssa suun levyepiteelikarsinoomanäytteistä löytyi promootterialueen hypermetylaatiota *hMLH1*:ssä ja *hMSH2*:ssa. Suurempi esiintyvyys näiden kahden geenin välillä oli *hMSH2*:lla, sillä *hMLH1*:n promootterialueen hypermetylaatiota esiintyi 17 %:lla näytteistä, kun vastaavasti *hMSH2*:n promootterialueen hypermetylaatiota 36 %:lla. Näihin tuloksiin sisältyi yksi tapaus, jossa esiintyi hypermetylaatiota molemmissa geeneissä. Czerninskin ja työtovereiden (2009) tutkimus osoittaa myös näiden mismatch-geenien hypermetylaation yhteyden potilaisiin, joilla yhtäaikaaisesti todetaan useampi suun levyepiteelikarsinooma: kaikilla potilailla, joilla oli useampi suun alueen karsinooma, oli joko *hMLH1*- tai *hMSH2*-geeni hypermetyloitunut. Erään julkaisun mukaan näiden geenien hypermetylaatioita ei todettu yhdessäkään alle 45-vuotiaan potilaan suuontelon levyepiteelikarsinoomissa (Wang ym. 2001). Suuret erot julkaisujen tuloksissa voivat johtua muun

muassa tutkimuksissa käytettyjen menetelmien eri herkkyyksistä tai näyttöiden eri histologisesta luokituksesta (Wang ym. 2001).

Muutamit julkaisut raportoivat naisilla esiintyvän enemmän promootterialueen hypermetylaatiota kuin miehillä (Demokan ym. 2006, Czerninski ym. 2009). Demokanin ja työtovereiden (2006) julkaisussa *hMSH2*:n promootterin hypermetylaatiota esiintyy enemmän naisilla kuin miehillä. Myös Czerninskin ja työtovereiden (2009) julkaisu *hMLH1*:stä ja *hMSH2*:sta viittaavat siihen, että naisilla olisi useammin hypermetyloitunut mismatch-geeni.

Wang ja työtoverit tarkastelevat *hPMS1* yhteyttä suuontelon levyepiteelikarsinoomiin. Tutkimuksessa todetaan sen olevan ainoa geeni, jonka proteiinin ilmentyminen oli vähentynyt sekä nuorilla että vanhemmilla potilailla. He myös tutkivat *hMSH3*, *hMSH6*, *hPMS1* ja *hPMS2*-geeneissä esiintyviä mahdollisia mutaatioita sekä niiden ilmentymistä. Mutaatioita ei havaittu *hPMS1*-geenin genomien eksoneissa eikä promootterialueilla. Western blot-analyysissä todettiin, että 100 % niistä kasvaimista, jotka sisälsivät mikrosatelliitti-instabiliteettia, oli joko vähentynyt ilmentyminen tai *hPMS1* ei ilmentynyt lainkaan. Ne kasvaimet, jotka eivät sisältäneet mikrosatelliitti-instabiliteettia, ilmensivät proteiinia normaalisti. Muutokset proteiiniekspressiossa tapahtuvat ilmeisesti post-transkriptonaalisilla modifikaatioilla. (Wang ym. 2013.)

#### **4.3 DNA hypometylaatio pään ja kaulan alueen syövässä**

Myös pään ja kaulan alueen syövässä hypometylaation vaikutuksia on tutkittu huomattavasti vähemmän mitä hypermetylaation vaikutuksia. Suuontelon levyepiteelikarsinoomissa metylaatiomuutoksista 59,4 % oli hypometyloitunut, kun vastaavasti 40,6 % oli hypermetyloitunut, kurkunpään levyepiteelikarsinoomissa 65,8 % oli hypometyloitunut ja 34,2 % hypermetyloitunut ja suunielun levyepiteelikarsinoomissa hypometyloituneita oli 16,3 % ja hypermetyloituneita 83,7 %. Näistä luvuista mainittakoon se, että valtaosa hypometylaatioista kaikissa kolmessa syöpäryhmässä sijaitsivat CpG-saarekkeiden ulkopuolella, kun taas hypermetylaatiot sijaitsivat valtaosaltaan CpG-saarekkeissa. (Lleras ym. 2013.)

Richards ja työtoverit (2009) tutkivat LINE-1:n ja Alu-jakson hypometylaatioiden vaikutuksia pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomiin. Syöpäsolunäytteiden toistuvissa jaksoissa todetaan pääpiirteissään olevan vähemmän metylaatioita. Varsinkin LINE-jaksot ovat enemmän hypometyloituneita niissä syöpänäytteissä, jotka ovat HPV-negatiivisia. Genomin instabiliateettia havaitaan myös enemmän niissä syöpänäytteissä, joissa on enemmän LINE-hypometylaatiota. Myös HPV-negatiivisuudella, lisääntyneellä genomin epävakaaisuudella sekä vähentyneellä genomin metylaatiolla havaittiin olevan yhteys. (Richards ym. 2009.)

## **5. HPV ja pään ja kaulan alueen syövät**

Tässä osiossa käsitellään HPV:n integroitumista isäntäsoluihin ja miten tämä vaikuttaa solujen toimintaan. HPV:n metylaation mekanismit ja metylaation vaikutuksia käydään läpi ja verrataan HPV-positiivisten ja -negatiivisten syöpien eroja ja niiden vaikutusta syövän ennusteessa. Kuten jo aikaisemmin mainittiin, HPV:ta löydetään useimmiten risojen ja kielen tyven syövästä erityisesti länsimaissa, kun taas suunielun ulkopuolella, esimerkkeinä suuontelo, kurkunpää ja alanielu, viruksen esiintyvyys on huomattavasti pienempi. (Gillison ja Lowy 2004, D'Souza ym. 2007, Chaturvedi ym. 2008, Kang ym. 2015.)

### **5.1 HPV:n biologiset toiminnot isäntäsoluissa**

HPV infektoi epiteelin tyvisoluja ja integroituu usein isäntäsolun genomiin. HPV:lla on kahdeksan lukukehystä (eng. open reading frames): aikaiset geenit (eng. early genes) E1, E2, E4, E5, E6 ja E7, joiden koodaamat proteiinit vaikuttavat geeniekspressiossa, replikaation säätelyssä ja transkriptiossa ja myöhäisen vaiheen geenit (eng. late genes) L1 ja L2, jotka koodaavat viruskapsidin rakenneproteiineja. (Syrjänen ym. 2011, Vinokurova ja von Knebel Doeberitz 2011.) Taulukossa 3 on eritelty geenien tehtävät tarkemmin. HPV:n genomiin kuuluu myös säätelevä alue eli LCR (eng. long control region), joka ei sisällä koodaavia alueita (Zaravinos 2014). (Kuva 10.)

Taulukko 3. HPV:n geenit sekä niiden tärkeimmät tehtävät. (Dalianis 2014.)

Geeni	Tehtävä
<b>E1</b>	Muodostaa heterodimeerisen kompleksin E2:n kanssa ja kontrolloi viraalista replikaatiota
<b>E2</b>	Säätlee aikaisen vaiheen geenipromootteria ja yhdessä E1:n kanssa DNA replikaatiota
<b>E4</b>	Saattaa välittää viraalisten partikkelien vapauttamista
<b>E5</b>	Stimuloi kasvutekijöiden mitogeenisiä signaaleja
<b>E6</b>	Inaktivoi monia soluproteiineja ja koodaa E6 onkoproteiinia
<b>E7</b>	Inaktivoi monia soluproteiineja ja koodaa E7 onkoproteiinia
<b>L1</b>	On pääasiallinen viruskapsidiproteiinin tuottaja ja HPV-rokotteen rakenneos
<b>L2</b>	On pienempi viruskapsidiproteiinin tuottaja

Muutos HPV-16 E1/E2 sekvenssissä rengasmaisen HPV:n avautuessa mahdollistaa viruksen genomien soluttautumisen isäntäsolun genomiin. Tämä kasvattaa tuumorigeneesiä lisäämällä E6 ja E7 geenien aktiiviteettia, koska E2 rikkoutuu integraatiossa. E2 on E6 ja E7 ekspressiotason säätelijä. (Ragin ym. 2004.) HPV:n onkoproteiineja ovat E5, E6 ja E7. Ne voivat saada aikaan häiriöitä isäntäsolun solujakautumisessa, erilaistumisessa, apoptoosissa ja immunologisessa tunnistamisessa. (Syrjänen ym. 2011, Zaravinos 2014.) E6 ja E7 proteiinit vaikuttavat genomien toimintaan sitomalla tai hajottamalla p53- ja Rb- proteiineja ja näin ollen lisäävät karsinogeenisyyttä (Steenbergen ym. 1995, Ragin ym. 2004, Zaravinos 2014). Useimmissa syövässä esiintyy p53:n mutaatioita, mutta HPV-positiivisissa syövässä p53:n toiminta on inaktivoitu, eikä se sisällä siis itsessään mutaatioita. E6 onkoproteiini inaktivoi p53:a, kun taas E7 inaktivoi pRb:aa, johtaen E2F transkriptiotekijän vapautumiseen ja p16 proteiinin yliekspressioon. (Zaravinos, 2014.)(Kuva 9.)

Tarkka HPV:n patogeneesin malli on esitetty kohdunkaulansyöväälle, mutta pään ja kaulan alueen syövässä molekylaarinen malli ei ole yhtä selvä. Yli 90 % kohdunkaulantuumoreista on todettu sisältävän viraalista HPV-DNA:ta, joista osa esiintyy episomaalisessa muodossa ja osa on yhdistynyt eli integroitunut isäntäsolun genomiin. On esitetty, että suurin osa episomaalisessa muodossa esiintyvistä viruksista löytyisi syövän esiasteista, kun taas integroitunut virusmuoto löytyisi vastaavasti invasiivisista syövästä. Näin ollen virusintegraation väitetään tapahtuvan syövän kehittymisen myöhäisemmässä vaiheessa (Ragin ym. 2004.) Kulmalan ja työtovereiden (2006) julkaisussa kuitenkin esitetään, että asia olisi päinvastoin. Uutta kvantitatiivista reaaliaikaista PCR-menetelmää apuna käyttäen he havaitsivat, että HPV oli sekä integroituneena että episomaalisena kohdunkaulansyövän esiasteissa. Naiset, joilla oli vain integroitunutta HPV-16 muotoa olivat lähemmäs 10 vuotta vanhempia kuin ne naiset, joilla HPV-16 oli episomaalinen. (Kulmala ym. 2006.)

Pään ja kaulan alueen syövässä HPV voi olla joko episomaalisessa muodossa ja/tai integroituneena isäntäsolun genomiin. Olthof ja työryhmä (2014) tutkivat miten nämä eri virusmuodot vaikuttavat viraalisten geenien ekspressioon sekä virusten infektoimien isäntägeenien ekspressioon. Tutkimuksessa oli mukana 75 HPV-16 positiivista suunielun karsinoomanäytettä, joista 39 %:ssa HPV oli integroituneena ja 69 %:ssa episomaalisena. *E2*, *E6* ja *E7* RNA ekspressiotasoissa ei todettu eroja integroituneen ja episomaalisen virusmuotojen sisältämien näytteiden välillä. Heidän tutkimuksen mukaan siis integraatiolla ei ollut vaikutusta HPV:n onkogeneenien luentaan, mikä on ristiriidassa aikaisempien tutkimusten kanssa. (Olthof ym. 2014.) Badaraccon ja työryhmä (2007) totesi, että heidän 21 näytteen aineistossaan kaikki näytteet sisälsivät integroitunutta HPV:ta, ja kolmasosa näytteistä sisälsi sekä integroitunutta että episomaalista HPV:ta (Badaracco ym. 2007). Viruksen esiintymismuoto saattaa vaikuttaa syövän hoitoon. On esitetty, että interferonihoito tehoaisi episomaalista HPV:ta sisältäviin syöpäsoluihin. Integroitunutta HPV:ta sisältäviin syöpäsoluihin interferonihoidolla näyttäisi taas olevan epäsuotuisia vaikutuksia. (Olthof ym. 2015.)

Useita HPV-16 integraatiokohtia on kartoitettu kohdunkaulansyövälle. Monet näistä kohdista sisältävät tuumorisuppressorigeenejä koodittavia alueita. (Ragin ym. 2004.) Useat integraatioalueet korkean riskin HPV-tyypeille kohdunkaulansyövässä sijoittuvat niin sanottuihin epävakaisiin kromosomialueisiin (eng. chromosome fragile site) (Groves ja Coleman 2015). HPV-16:sta integraatio isäntägenomiin vaikuttaa pääasiallisesti sattumanvaraiselta, mutta Wilson ja työryhmä (2013) ovat kuitenkin osoittaneet selvän yhteyden isäntägenomin ja viraalisten *E2* sekä *E4* ja *E5* alueiden integraation välillä.

## 5.2 HPV-positiivisten syöpien todentaminen

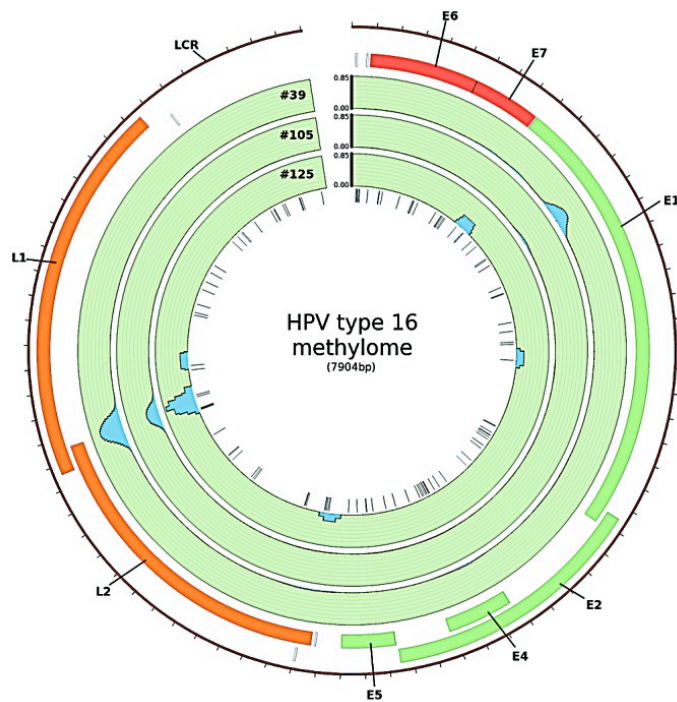
*E7* onkoproteiinin aiheuttama *pRb*:n inaktivaatio johtaa p16 yliekspressioon, joka voidaan havaita immunohistokemiallisilla värjäyksillä (Zaravinos, 2014). HPV-negatiiviset syövät voivat kuitenkin olla myös p16-positiivisia (Marur ym. 2010). Uudemmat julkaisut esittävät, että p16 yliekspression todentaminen ei yksiselitteisesti osoita HPV-positiivisuutta, ja näin ollen ei toimisi HPV:n diagnostiikassa yksinään (Bussu ym. 2013, Perrone ym. 2011). Perronen ja työryhmän (2011) mukaan HPV:n osoittamisessa tulisi määrittää sekä p16 yliekspressio että HPV DNA:n määrittäminen *in situ* hybridisaatiolla. Toinen tapa osoittaa HPV-positiivisuus on käyttää *E6* ja *E7* vasta-aineita todentamiseen. Kyseisten vasta-aineiden vähäinen esiintyvyys suunielun näytteissä kuitenkin viittaisi

testin huonoon herkkyyteen. Kumpikaan näistä menetelmistä ei siis ole täysin tyydyttävä HPV:n osoitukseen. (Combes ja Franceschi 2014.) Perustuen saksalaisiin tutkimuksiin p16, cycliini D1, pRb ja p53 ekspression analysointi immunohistokemiallisesti on tullut osittain jo rutiinikäytäntöön. HPV positiivisissa näytteissä ainoastaan p16 ekspressoituisi. (Prigge ym. 2015.)

### 5.3 HPV:n metylaatio

Hypermetylaatiota tapahtuu HPV-16:sta *L1*-geenissä sekä LCR-alueella (Balderas-Loeza ym. 2007). Mekanismi on osittain tuntematon, mutta on esitetty, että HPV-16 ja -18 genomit voivat liittyä isäntäsolun DNA:han kasvaimen kehityksen aikana, jolloin virusgenomin normaali geenisekvenssi häiriintyy, johtaen transkription loppumiseen niissä viruksen geeneissä, jotka sijaitsevat 5'-asemassa LCR-alueella. Koska transkription loppumisen on havaittu käynnistävän *de novo* -metylaatiota, johtaa tämä lopulta näiden muuttuneiden virus DNA-sekvenssien metylaatioon. On myös todisteita siitä, että minkä tahansa DNA:n liittäminen kromosomiin voi aikaansaada metylaatiota. (Balderas-Loeza ym. 2007.) Wilson ja työryhmä (2013) havaitsivat metylaatiomuutoksia pään ja kaulan alueen syövässä, varsinkin *L1*- ja *L2*-geenien raja-alueella ja *E1*-geenin sisällä (kuva 10).

Balderas-Loeza ja työtoverit (2007) totesivat 10/12 tutkimissaan suuontelon karsinomanäytteessä olevan muutoksia HPV-16 genomien DNA metylaatioissa. Heidän mukaansa promootterihypermetylaatio *E2* proteiinin sitoutumiskohdassa, joka sijaitsee LCR-alueella, saattaa lisätä karsinogeneesiä estämällä *E2* proteiinin sitoutumista. *E2* proteiini siis normaalisti estää *E6* geenin toimintaa, mutta proteiinin toiminnan estyessä *E6* geenin onkogeeninen toiminta jatkuu. Tämä mekanismi selittää, miksi niissä alaryhmissä, joissa *E2* geeni on tallella, nähdään silti lisääntynyt *E6* ja *E7* onkogeenien ilmentyminen. (Bhattacharjee ja Sengupta 2006, Balderas-Loeza ym. 2007.)



Kuva 10 (muokattu Wilson ym. 2013). HPV-16 genomi episomaalisessa muodossa. LCR= long control region eli pitkä säätelyalue; E1, E2, E4,E5, E6 ja E7= early region genes eli aikaisen vaiheen geenit; L1 ja L2= late region genes eli myöhäisen vaiheen geenit. Metylaatioalueet näkyvät kuvassa vaaleansinisenä. Tutkimuksessa käytettiin apuna MeDIP-seq aineistoa.

Viruksen muoto isäntäsolussa vaikuttaa siihen, miten metylaatiot vaikuttavat geenien toimintaan. HPV-16 episomaalisen muodon CpG-metylaatiot E2 proteiinin sitoutumiskohdassa ovat yleisiä, kun taas yksittäisen integroituneen virusgenomin geneeissä ei metylaatioita juurikaan esiinny. Jos taas virus on monistanut genominsa, niin metylaatioita esiintyy kaikissa CpG-saarekkeissa, mikä viittaisi siihen, että metylaatiolla hiljennetään suurin osa monisteista. E2 proteiinin sitoutumisalueen metylaatiot saattavat siis johtaa lisääntyneeseen virusproteiinien ekspressioon sekä useamman virusgenomin läsnä ollessa virusmäärän kontrollointiin. (Chaiwongkot ym. 2013.)

#### 5.4 HPV-positiivisten ja HPV-negatiivisten kasvaimien erot metylaatioissa

Suunielun HPV-positiiviset ja -negatiiviset levyepiteelikasvaimet eroavat toisistaan yleisesti ottaen molekyylogeneettisiltä ominaisuuksiltaan, riskitekijöiltään, väestötason esiintyvyydellään sekä ennusteeltaan. Pääsääntöisesti HPV-positiiviset syövät ovat ennusteeltaan parempia. (Chaturvedi ym. 2008, Bosch ym. 2013.) HPV-positiivisissa syövässä E6 ja E7 onkoproteiinit inaktivoivat

tuumorisuppressoriproteiinit p53:n ja pRb:n kiinnittymällä niihin. Tämä saa aikaan muutoksia, jotka voivat johtaa solun muuttumiseen ja pahanlaatuisen muutoksen kehittymiseen. pRb:n degradaatio saa aikaan myös *CDKN2A* (*p16*) ilmentymisen kasvun kyseisissä soluissa. (Bosch ym. 2013.)

Worsham ja työtoverit (2013) havainnoivat HPV-positiivisissa syövässä esiintyvän enemmän promootterihypermetylaatioita mitä HPV-negatiivisissa syövässä. HPV-positiivisilla soluilla oli suurempi metylaatioaste CpG-alueilla sekä toistuvissa että toistumattomissa alueissa (Sartor ym. 2011, Worsham ym. 2013). Myös Lleras ja työtoverit (2013) vahvistavat tutkimuksessaan sen, että suunielun karsinoomissa esiintyy yleisimmin HPV-positiivisuutta: 37 % suunielun, 17 % suuontelon näytteistä ja 22 % kurkunpään näytteistä sisälsi HPV DNA:ta. He tutkivat edelleen suunielun hypo- ja hypermetyloituneiden CpG-alueiden lukumäärää ja vertailivat niiden yhteyttä HPV-statukseen: metylaatiomuutoksien lukumäärä oli yli kaksinkertainen HPV-positiivisissa syövässä. HPV-negatiivisissa syövässä hypermetylaatiota esiintyi 161 CpG-alueella ja hypometylaatiota 12 CpG-alueella, kun vastaavasti HPV-positiivisissa syövässä arvot olivat 428 ja 49.

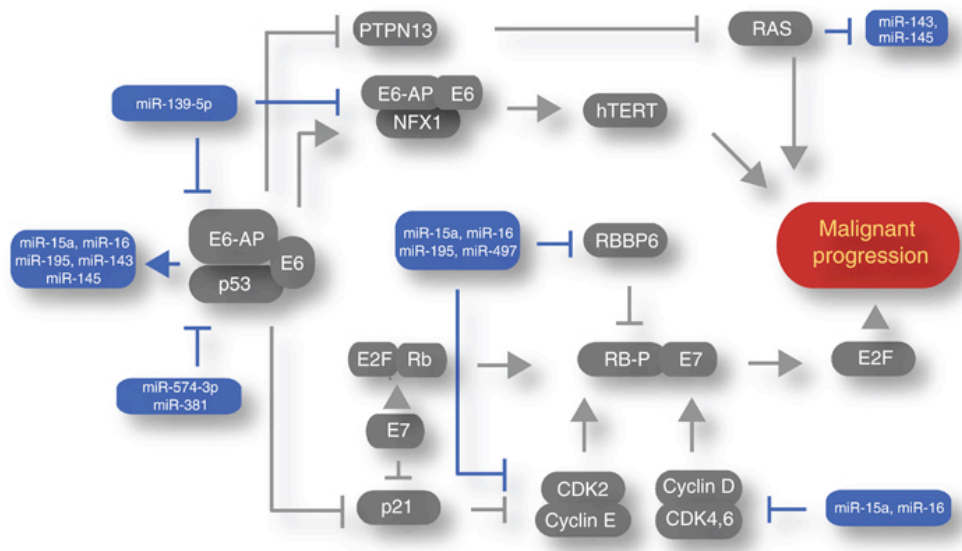
Sartorin ja työtovereiden (2011) mukaan *CDKN2A* (*p16*) ekspressio on vähentynyt HPV-negatiivisissa kasvaimissa, kun taas sen ekspressio on lisääntynyt HPV-positiivisissa kasvaimissa, joko kromosomaalisilla deleetioilla, mutaatioilla tai promootterihypermetylaatioilla sekä E7:n sitoutuessa Rb-proteiiniin. Tämä on ainoita alueita, jotka ovat enemmän metyloituneita HPV-negatiivisissa syövässä kuin HPV-positiivisissa syövässä.

Richards ja työtoverit (2009) tutkivat toistuvien jaksojen CpG-metylaatioita HPV-positiivisissa sekä -negatiivisissa pään ja kaulan alueen levyepiteelisyövässä. HPV-positiivisuudella ja LINE metylaatiolla löydettiin yhteys, kun taas HPV-negatiiviset syövässä oli havaittavissa LINE hypometylaatiota. Samaan tulokseen pääsivät myös Sartor ja työtoverit (2011) tutkimuksessaan. HPV-positiiviset syövät olivat myös genomiltaan vakaampia kuin HPV-negatiiviset syövät. Globaali hypometylaatio, joka lisää genomien instabiliteettia, on korostunut HPV-negatiivisissa pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomissa (Richards ym. 2009).

Lajer ja työryhmä (2012) tutkivat miRNA ekspressiota HPV-positiivisissa ja -negatiivisissa pään ja kaulan alueen syövässä. Heidän tutkimuksen mukaan näiden syöpien miRNA-malleissa on eroavaisuuksia.



HPV-positiivisilla pään ja kaulan alueen syöville ja kohdunkaulan syövän välillä oli enemmän yhtäläisyyksiä miRNA-malleissa kuin HPV-positiivisten ja -negatiivisten pään ja kaulan alueen syöpien välillä. Tärkeimmät HPV:n ydin miRNA:t, jotka heidän tutkimuksessaan liitettiin HPV:n patogeneesiin olivat miRNA-15a-, miRNA-16-, miRNA-497-perhe sekä miRNA-106-363-ryhmä. He myös totesivat, että HPV:n ytimen miRNA:lla on yhteys HPV:n onkoproteiinien E6:n säätelemän p53-reitin ja E7:n säätelemän pRb-reitin välillä. Kuvassa 11 havainnollistetaan näitä mahdollisia interaktioita HPV:n ydin miRNA:den ja eri syöpää aiheuttavien tekijöiden välillä. HPV E7 sitoutuu *pRb*:aan aiheuttaen sen inaktivaation sekä vapauttaen E2F-transkriptiotekijää, joka saa aikaan solusyklin etenemisen S-faasiin, jolloin solu jakautuu. E7 ja p21:n yhteys taas saa aikaan sen, että miRNA-15a, miRNA-16, miRNA-195 ja miRNA-479 kohteina olevien sykliinien toiminta estyy. Tämä aiheuttaa sen, että solusyklin keskeytys estyy ja pahanlaatuisten muutosten synty lisääntyy. E6:n inaktivoima *p53* aiheuttaa lopulta apoptoosin häiriöitä ja DNA:n vaurioita. *p53* myös säätelee miRNA-15a, miRNA-16, miRNA-195, miRNA-143 ja miRNA-145 transkriptiota, joten *p53*:n inaktivaatio aiheuttaa kyseisten miRNA:den transkriptioiden häiriöitä. (Lajer ym.2012.)



Kuva 11. HPV:n ydin miRNA:den sekä E6 ja E7 onkoproteiinien aiheuttamien geenimuutosten yhteys pahanlaatuisiin muutoksiin (Lajer ym. 2012).

## 6. Pään ja kaulan alueen syöpien ennuste ja hoito

Syövän ennusteeseen ja hoitovalintaan vaikuttavat muun muassa kasvaimen histologia, koko ja paikka, paikallinen invaasiotapa ja sen paksuus, paikalliset ja ja kaukaiset metastaasit, HPV-

positiivisuus ja toisten primaarikasvainten esiintyvyys sekä muut yleissairaudet ja tupakointi (Licitra ym. 2006, Woolgar 2006, Demokan ja Dalay 2011). Pään ja kaulan alueen syöpäpotilailla on lisääntynyt riski saada toinen primaarikasvain ylähengitysteiden ja ruoansulatuskanavan yläosien alueelle. Riski toisen primaarikasvaimen kehittymiselle on 5—35 % välillä, mikä on suurempi kuin millään muulla syöpäryhmällä. (Dhooge ym. 1998.) Koska potilailla esiintyy tavallisesti useita syöpäriskiä lisääviä tai jo pahanlaatuisia leesioita, Slaughter ja työtoverit kehittivät vuonna 1953 niin sanotun kenttäkarsinogeeniteorian (eng. field cancerization) (Slaughter ym. 1953, Califano ym. 1996, van Oijen ja Slootweg 2000). Kyseinen teoria olettaa, että karsinogeeni ylähengitysteiden ja ruoansulatuskanavan yläosien alueella voi aiheuttaa geneettisiä poikkeavuuksia ja näin ollen useiden pahanlaatuisten kasvainten syntymistä kyseisille alueille (Califano ym. 1996). Näiden uusien primaarikasvaimien kehittyminen on muun muassa syynä siihen, miksi kyseisellä syöpäryhmällä on huono ennuste (Dhooge ym. 1998).

Pään ja kaulan alueen syövät diagnosoidaan usein melko myöhään, sillä ne pysyvät oireettomina pitkään. Koska potilaalla ei ole oireita, ei hän myöskään hakeudu hoitoon, jolloin syöpä usein havaitaan liian myöhään. Ennuste huononee tuumorin koon mukaan: viisivuotisennuste T1-luokan kasvaimelle on 80—90 %, T2-luokan kasvaimelle 50—70 % ja T3-T4-luokan kasvaimelle 20—40 % (Joensuu ym. 2013). Hammaslääkärin onkin tärkeää havaita rutiinitarkastuksissa mahdolliset pahanlaatuiset muutokset jo varhaisessa vaiheessa, mielellään esiasteina, jotta hoito saadaan ajoissa käyntiin ja hoitovaste olisi parempi. Syövän hoito on eri lääketieteen alan specialistien laajaa yhteistyötä, johon osallistuu muun muassa pään ja kaulan alueen kirurgeja, korva-, nenä- ja kurkkutautien erikoislääkäreitä, plastiikkakirurgeja, onkologeja ja radiologeja sekä hammaslääkäreitä (Argiris ym. 2008).

Kirurgia ja sädehoito ovat olleet pitkään pääasiallinen hoitomuoto, myös solunsalpaajien sekä epigeneettisen terapian liittäminen hoitoon on lisääntynyt. Kookkaita kasvaimia hoidetaan yleensä samanaikaisesti sekä säde – että solunsalpaajahoidolla. Solunsalpaajahoidoa ei kuitenkaan käytetä yksinään ilman sädehoitoa tai kirurgista toimenpidettä. (Joensuu ym. 2013.)

Koska pään ja kaulan alueen syöpien geneettinen tausta on moninainen, etenkin HPV-negatiivisilla syöville, yhteneviä kohteita epigeneettiselle terapialle ei ole löydetty. Tämän vuoksi olisi tarpeen tuntea kaikki geenit ja mekanismit näiden syöpien taustalla, jotta yksilölliset terapiamuodot olisivat

mahdollisia ottaa käyttöön. Kappaleessa 7 on käsitelty tarkemmin hoitomuotoja, jotka pohjautuvat epigeneettisten muutosten tuntemiseen sekä eri geenien mutaatioiden osoittamiseen.

## 6.1 HPV-positiivisten syöpien ennuste

Syövän HPV-status on yksi käytössä olevista biomarkkereista, joka kertoo muun muassa syövän ennusteesta. Sen arvoa potilaan hoidon valinnan ohjauksessa tutkitaan parhaillaan (Marur ym. 2010). HPV-positiivisilla suunielun levyepiteelikarsinoomilla on osoitettu olevan parempi ennuste verrattuna HPV-negatiivisiin levyepiteelikarsinomiin: potilailla, joilla on HPV-positiivinen syöpä, on arviolta puolet parempi viidenvuoden ennuste (overall survival). Käytännössä tämä tarkoittaa noin 30 % parempaa ennustetta (absolute survival). (Bosch ym. 2013.) Tämä saattaa johtua siitä, että HPV-positiiviset syövät reagoivat paremmin säde- ja kemoterapiahoitoihin (Chaturvedi ym. 2008). Leikkaushoidot tehoavat myös tutkitusti paremmin HPV-positiivisiin syöpiin (O'Rorke ym. 2012). Taudin eteneminen on huomattavasti pienempi HPV-positiivisilla potilailla. Merkittävää on myös se, että syövän uusiutuminen oli pään ja kaulan alueen levyepiteelikarsinoomista 59 % ja suunielun levyepiteelikarsinoomista 63 % pienempi kuin HPV-negatiivisilla syöville. On vielä varhaista sanoa, johtuvatko nämä erot yksinomaan HPV-statuksesta, vai vaikuttaako tulokseen muun muassa se, että tyypillisesti HPV-negatiiviset syövät löytyvät vanhemmilta, tupakoivilta ja alkoholia käyttäviltä henkilöiltä. (O'Rorke ym. 2012.) Pienellä ryhmällä potilaita, joilla on HPV-positiivinen syöpä, tulee kuitenkin myöhäisiä ja kaukaisia etäpesäkkeitä jopa viiden vuoden kuluttua (Lin ym. 2013).

HPV-positiivisten syöpien ennusteeseen vaikuttavaa heikentävästi EGFR yliexpressio sekä kromosomaalinen epävakaus. EGFR yliexpressio huonontaa tosin sekä HPV-negatiivisten että positiivisten syöpien ennustetta. (Olthof ym. 2015.) Parempaan ennusteeseen viittaavat taas *p16* yliexpressio, alhainen MHC luokka 1 sekä kohonneet CD44-, CD98- ja CD8+ TIL- (eng. tumor infiltrating lymphocyte) arvot. Näiden lisäksi tupakoimattomuus ja hyvä yleisterveys parantaa hoidon ennustettavuutta. (Dalianis 2014.)

## 6.2 HPV-rokotteet

HPV-rokotteet kuuluvat taudin ehkäisyyn, sillä ne torjuvat virustartuntaa ja antavat suojan viruksen aiheuttamilta kohdunkaulan syövän esiasteilta ([www.thl.fi](http://www.thl.fi)). Tällä hetkellä maailmalla käytössä ovat Cervarix®- ja Gardasil®-rokotteet. Niiden vaikutuksia HPV-positiivisten pään ja kaulan alueen syöpien kehittymiseen ovat tutkimuksen kohteena. Nämä rokotteet eivät tehoa enää tapauksissa, joissa HPV-tartunta on jo syntynyt. Sen vuoksi rokotteet annetaan nuorille tytöille, jotka eivät ole vielä aloittaneet sukupuolielämää. (Zaravinos 2014, [www.thl.fi](http://www.thl.fi).) Se, että osa lapsista saa HPV-infektion jo elämänsä varhaisvaiheessa, ei-seksuaaliteitse, aiheuttaa kysymyksiä oikeasta rokoteajankohdasta. Tältä alueelta tarvitaan tutkimustietoa nopeasti.

Cervarix® on bivalentti rokote, joka sisältää HPV-16:n ja HPV-18:n puhdistettuja viraalisia proteiineja. Gardasil®-rokote taas sisältää neljän eri HPV-tyypin, HPV-6, -11, -16, ja -18, puhdistettuja viraalisia proteiineja. (WHO 2014, [www.thl.fi](http://www.thl.fi).) Euroopan markkinoille tulee syksyllä 2015 Merckin 9-valenttinen HPV-rokote, mikä antaa suojan seitsemälle korkean riskin HPV-tyypille ja kahdelle matalan riskin HPV-tyypille (European Medicines Agency, [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

HPV-rokotteiden käyttö on yleistynyt ja se on sisällytetty lähes kaikkien Euroopan maiden kansalliseen rokoteohjelmaan. Sosiaali- ja terveysministeriö käynnisti rokotusohjelman Suomessa syksyllä 2013 Cervarix®-rokotteella. (Järvi 2013.) Se kuuluu siis nykyään Suomen kansalliseen rokotusohjelmaan, ja sen saavat ilmaiseksi 6.-luokkalaiset tytöt sekä 7.- 9.-luokkalaiset tytöt rokotusohjelman kahden ensimmäisen vuoden aikana ([www.thl.fi](http://www.thl.fi)). HPV-rokoteohjelmien käyttöön ottojen vuoksi HPV-positiivisten syöpien määrän laskua on todennäköisesti odotettavissa tulevaisuudessa (O'Rorke ym. 2012).

Preventiivisten rokotteiden ohella on kehitteillä terapeuttisia rokotteita. Tällä hetkellä on viisi lupaavaa terapeuttista rokotetta kliinisissä kokeiluissa, joista kaksi on peptidirokotetta, yksi rokote sisältää puhdistettua E7 DNA:ta sekä kaksi on vektorirokotteita. (Zaravinos 2014.)

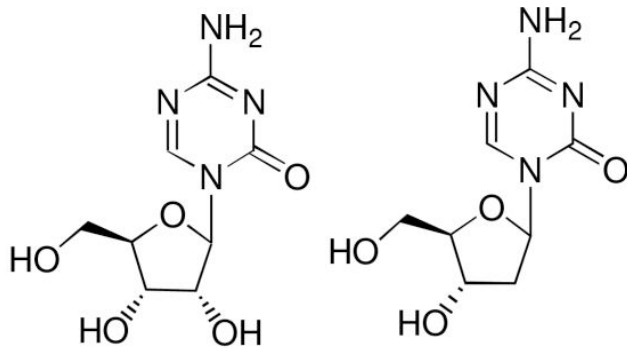
## **7. Epigeneettiset biomarkkerit ja epigeneettiset lääkkeet syövän hoidossa sekä kohdennettu geeniterapia**

DNA metylaatiot ovat reversiibeilejä tapahtumia, jonka vuoksi ne ovat lupaavia kohteita geeniterapialle (Das ja Singal 2004). DNA metylaatioon liittyvät teknologiat ovat hyviä sekä kliinisessä diagnostiikassa että syöpien hoidossa. DNA metylaatiomarkkereita käytetäänkin syövän diagnostiikassa, sillä tietyt geenimetylaatiot on liitetty tiettyihin syöpätyyppeihin. Markkereita voidaan myös käyttää avuksi hoidon suunnittelussa, sillä niiden avulla pystytään ennustamaan, mikä hoito tehoaa parhaiten. (Laird 2003.) Uusimmat julkaisut painottavat sitä, että tuntemalla kaikki taustalla olevat geneettiset muutokset, voidaan pyrkiä kehittämään kullekin taustalla olevalle muutokselle spesifi hoitomuoto. Tietyt geenit ja niiden molekyylireitit, kuten tuumorisuppressiogeneenien p53-, pRb- ja Notch-reitit sekä onkogeneenien EGFR-, PI3K-, Ras-, MET- ja JAK/STAT-reitti, ovat keskeisiä ja näiden mahdollisuuksia kohdennettuun terapiaan tutkitaan (Suh ym. 2014). Myös FGF-reseptoriperhe on liitetty pään ja kaulan alueen syöpiin (Kang ym. 2015).

### **7.1 Demetylaatiolääkkeet hoidossa**

Demetylaatiolääkkeet voivat tutkimusten mukaan peruuttaa metylaation aiheuttamat geenien hiljennykset (Das ja Singal 2004). Lääkkeitä on olemassa kahta eri pääryhmää: DNA metylaatioinhibiittorit ja histonideasetylaatioinhibiittorit (histone deacetylase, HDAC). DNA metylaatioinhibiittorit jaetaan edelleen kahteen ryhmään: nukleosidianalogeihin ja ei-nukleosidianalogeihin. (Mulero-Navarro ja Esteller 2008.)

Nukleosidianalogit, muun muassa sytidiinianalogit 5-asa- ja 5-asa-2'-deoksisytidiini (Kuva 12) (Mai ja Altucci 2009), voivat liittyä DNA:n ja/tai RNA:n kanssa, jolloin ne estävät muun muassa DNA metylaatiota (Yoo ja Jones 2006, Mulero-Navarro ja Esteller 2008). Molempien lääketyyppien sekä asatidiinin (5-asasytidiini) että desitabiinin (5-asadeoksisytidiini) on todettu saavan aikaan remissiota sekä kliinistä kohennusta yli puolessa potilaista (Issa 2007)(Kuva 12). Jotta lääke toimisi, solun täytyy olla proliferaatiovaiheessa. Tämä onkin lääkkeiden haittapuoli, sillä ne ovat voimakkaasti soluille myrkyllisiä ja johtavat lopulta solukuolemaan (Mulero-Navarro ja Esteller 2008). Ne ovat kuitenkin hyvin tehokkaita jo pienissä konsentraatioissa, ja annostusta on pienennetty, mikä on johtanut lääkkeiden parempaan tehoon sekä vähentänyt niiden toksisuutta (Yoo ja Joens 2006).



Kuva 12. Vasemmanpuoleinen 5-asasytidiini ja oikeanpuoleinen 5-asadeoksisytidiini (kuva muokattu Nelson ym. 2004).

Nukleosidianalogien vaikutus on reversiibeli. Jos lääkkeen käyttö lopetetaan, voi kasvainsolujen määrä lisääntyä tämän jälkeen voimakkaasti. Tätä ei tapahdu muilla lääketyypeillä. (Mulero-Navarro ja Esteller 2008.) Ei-nukleosidianalogit, muun muassa prokaiiniamidi ja hydraalatsiini (Mai ja Altucci 2009), sitoutuvat DNMT-entsyymien katalyyttiseen kohtaan, ja eivät siis integroidu DNA:han. Näin ollen lääkkeillä ei ole epäspesifejä vaikutuksia kuten edellisillä nukleosidianalogeilla. (Mulero-Navarro ja Esteller 2008.) Kliinisiä kokeita niillä on kuitenkin tehty huomattavasti vähemmän kuin nukleosidianalogeilla, ja näin ollen lisätutkimukset ovat tarpeen ennen kuin ei-nukleosidianalogeja voidaan hyödyntää syöpien hoidossa (Yoo ja Jones 2006).

DNA metyylointiinhibiittorien lisäksi on kehitetty histonideasetyylaatioinhibiittoreja. Deasetylaasit poistavat asetyyliryhmän nukleosomaalisesta DNA:sta, jolloin siitä tulee inaktiivinen. (Mai ja Altucci 2009.) DNA metyylointi vaimentaa geeniekspressiota osin histonideasetyylaasien avulla. Tästä syystä HDAC inhibiittoreita on käytetty aktivoimaan metyloituneita geenejä. HDAC inhibiittorit eivät kuitenkaan pysty aktivoimaan tiheästi metyloituneita geenejä, mutta demetyloivien aineiden kanssa käytettynä ne voivat saada aikaan geenien aktivoitumisen. (Das ja Singal 2004.) HDAC inhibiittorit jaetaan neljään ryhmään: lyhytketjuisiin rasvahappoihin, hydroamisiin happoihin, sykliisiin tetrapeptideihin sekä bentsamideihin, joilla kaikilla on eri funktionaalinen ryhmä (Yoo ja Jones 2006, Mai ja Altucci 2009). HDAC inhibiittoreilla on tehty vähemmän kliinisiä kokeita kuin DNA metyylointiinhibiittoreille, sillä niiden käytön on havaittu aiheuttavan useita toksisia vaikutuksia. Prekliiniset kokeet myös viittaavat siihen, että kombinaatiohoito olisi tehokkaampaa. (Mulero-Navarro ja Esteller 2008.)

## 7.2 Metylaatiomarkkerit

CpG-saarekkeiden hypermetylaatiota pidetään yhtenä yleisimpänä markkerina, jota esiintyy ihmisen syövässä. Niiden käyttöä biomarkkereina puoltaakin moni asia. Ensinnäkin muutokset DNA metylaatioissa ovat tunnusomaisia neoplastisille soluille, jota voidaan hyväksikäyttää syövän diagnostiikassa ja syöpätyypin tunnistuksessa. Toiseksi metylaatiospesifit PCR-menetelmät, korkean erotuskyvyn nestekromatografia ja korkean erotuskyvyn kapillaarielektroforeesi, ovat kaikki nopeita ja tarkkoja menetelmiä. Kolmanneksi DNA on hyvin stabiili molekyyli, jota saadaan tutkittavaksi monesta eri kohteesta. DNA myös säilyy pitkään, jolloin sitä voidaan käyttää melko pitkään näytteenoton jälkeen. (Mulero-Navarro ja Esteller 2008.)

Tiettyjen geenien hypermetylaatiota voidaan myös käyttää määriteltäessä syövän ennustetta. Mielcarek-Kuchtan ja työryhmän (2014) tutkimuksessa geenihypermetylaatiota esiintyi eniten *CDKN2A* ja *CDH1* (*E-kadheriini*) geneeissä. He tutkivat näiden geenien hypermetylaatioiden yhteyksiä syöpien kliinispatologiseen kuvaan: *CDKN2A* hypermetylaatiolla oli suotuisa vaikutus syövän ennusteeseen. (Mielcarek-Kuchta ym. 2014.) *E-kadheriinia* voidaan taas usein pitää huonon ennusteen markkerina, sillä sen metylaatio on yhteydessä syövän lisääntyneeseen invaasiokykyyn ja metastasointiin (Lleras ym. 2013).

Syövän ennusteen lisäksi epigeneettisiä markkereita käytetään hoitovasteen arvioinnissa ja hoitotyypin valinnassa (Mulero-Navarro ja Esteller 2008). *MGMT* on hyvä markkeri, sillä sen promoottorialueen metylaatio lisää kasvaimen vastetta solunsalpaahoidolle (Das ja Singal 2004). *MGMT* muun muassa lisää gliomien herkkyyttä alkyloiville aineille (Esteller ym. 2000). Toinen ennustava biomarkkeri on *hMLH1*, joka liittyy useisiin DNA:n korjausreitteihin. DNA mismatch korjausgeenin inaktivaatio *hMLH1* geenin promoottierihypermetylaatiolla on yleinen muutos useissa syövässä. (Mulero-Navarro ja Esteller 2008.) Kyseisen geenin demetylaatio saa aikaan paremman vasteen tietyille lääkkeille kuten sisplatiinille (Mulero-Navarro ja Esteller 2008), joka on syöpien hoidossa käytetty platinajohdos (Argiris ym. 2008).

Vuonna 2011 Demokan ja Dalay tulivat siihen tulokseen, että DNA metylaatiomuutoksilla ei vielä ole käytännön merkitystä pään ja kaulan alueen syöpien kliinisessä hoidossa, sillä ne ovat liian

epäluotettavia. Koska metylaatioanalyysit ovat kuitenkin hyvin tarkkoja, niin pään ja kaulan alueen syöville tullaan heidän mukaansa kuitenkin löytämään sopivat markerit, kunhan laajempia aineistoja on tarkasti selvitetty.

## 8. Yhteenveto

Syövän taustalla olevien geneettisten, epigeneettisten sekä viraalisten mekanismien tunteminen antaa tietoa syövästä, sen ennusteesta ja hoitovasteesta eri hoitomuodoille. Useiden geenien mutaatioita sekä geenimetylaatioita, jotka johtavat geenien hiljennyksiin, on liitetty pään ja kaulan alueen syöpiin. Tutkituin epigeneettinen muutos on DNA metylaatio, johon liittyy joko metyyliiryhmän liittyminen tai poistuminen. Geenien hypermetylaatiota esiintyy useissa fysiologisissa tapahtumissa, kuten kehityksessä ja X-kromosomin inaktivaatiossa. Monissa syöissä promootterialueiden CpG-saarekkeiden metylaatiot on liitetty muun muassa tuumorisuppressiogeneenien hiljentymiseen, joka lopulta johtaa syövän kehittymiseen. (Worsham y. 2012.) Yleisimmät geenit, joissa on raportoitu olevan DNA hypermetylaatioita pään ja kaulan alueen syöissä ovat *CDKN2A (p16)*, *RASSF*, *RARB2*, *MGMT*, *LATS*, *RAR $\beta$* , *DAPK*, *MST*, *GSTP1*, *MGMT*, *MLH1*, *APC*, *CHFR* ja *E-kadheriini (CDH1)* (Taulukko 3). Nämä kuitenkin vaihtelevat tutkimusten välillä paljon ja tällä hetkellä on vielä vaikea määrittää tarkasti kaikkia niitä geenejä syöissä, jotka läpikäyvät epigeneettisiä muutoksia.

Hypermetylaatio on helposti havaittavissa soluista PCR-menetelmällä. Eri geenien hypermetylaatioilla vaikuttaa olevan diagnostista arvoa. Muutokset ovat palautuvia ja siten hypermetylaatiomuutokset todennäköisesti avaavat uusia mahdollisuuksia syöpien hoitoon, mikä onkin johtanut useisiin lääkekokeisiin. Osa lääkekokeista kohdistuu tuumorisuppressorigeenien uudelleenaktivointiin ja osa DNA metyyliitransferaasien inhibaatioon. (Worsham ym. 2012.)

HPV-positiiviset ja -negatiiviset pään ja kaulan alueen syövät eroavat toisistaan. HPV-positiiviset syövät ovat tutkimusten mukaan parempiennusteisia kuin HPV-negatiiviset syövät. (Bosch ym. 2013.) HPV-statuksen määrittäminen tulisikin nykyään kuulua osana rutiinidiagnostiikkaa, sillä se on tällä hetkellä yksi luotettavimmista molekyyli-markkereista pään ja kaulan alueen syöissä, vaikkakaan sitä ei vielä toistaiseksi tutkimustiedon puuttuessa voida käyttää taudin ennusteen arvioinnissa ja



hoitolinjausta päätettäessä. HPV:n osoittamisen lisäksi tällä hetkellä käytössä olevia biomarkkereita syöpädiagnostiikassa ovat muun muassa EGFR:n ja *Rb*:n yliexpressio. Myös seuraavien geenien hypermetylaatiot toimivat biomarkkereina pään ja kaulan alueen syöpädiagnostiikassa: *CDKN2A*, *hMLH1*, *MGMT* ja *CDH1*. (Das ja Singal 2004, Esteller 2000, Kang ym. 2015, Mulero-Navarro ja Esteller 2008.)

HPV-positiivisissa syöissä havaitaan HPV onkoproteiinien, E6 ja E7, toimintaa, jotka taas inaktivoivat *p53* ja *pRb* toimintaa. HPV-positiivisissa syöissä esiintyy vähemmän mutaatioita kuin HPV-negatiivisissa. Myös *CDKN2A* yliexpressio on liitetty HPV-positiivisuuteen. (Worsham ym. 2012.) HPV-positiivisten syöpien diagnostiikassa käytetäänkin molekulaarisia markkereita, kuten p16 proteiinin todentamista, ja/tai serologisia markkereita, kuten E6/E7 vasta-aineiden osoittamista. Molemmilla on kuitenkin puutteensa: molekulaariset markerit ovat epätarkkoja ja serologiset markerit epäsensitiivisiä. (Combes ja Franceschi 2014.)

Pään ja kaulan alueen syöpiin vaikuttavat monet epigeneettiset ja geneettiset muutokset. Näiden muutosten, sekä muiden hoitoon ja ennusteeseen vaikuttavien tekijöiden tunteminen, on ensisijaisen tärkeää tulevaisuuden syöpähoidossa. Jokaiselle potilaalle tulisi pystyä tarjoamaan kohdennettua terapiaa juuri kyseessä olevan syöpätyypin mukaan. Näin päästäisiin mahdollisimman hyviin hoitotuloksiin ja saataisiin parannettua tämän huonoennusteisen syöpäryhmän ennustetta.

Lähdeluettelo:

Anaya-Saavedra, G., Ramírez-Amador, V., Irigoyen-Camacho, M.E. ym. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Archives of Med Res* 2008; 39: 189 – 197

Ang, K. K., Berkey, B. A., Tu, X. ym. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 7350 – 7356

Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D., Ferris, R. L. Head and neck cancer (seminar). [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com) 2008; 371: 1695 – 1709

Badaracco, G., Rizzo, C., Mafera, B. Ym. Molecular analyses and prognostic relevance of HPV in head and neck tumours. *Oncol Rep* 2007; 17: 931 – 939

Balderas-Loaeza, A., Anaya-Saavedra, G., Ramirez-Amador, V. A., ym. Human papillomavirus-16 DNA methylation patterns support a causal association of the virus with oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2007; 120: 2165 – 2169

Baylin, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer (review article). *Nature Clinical Practice Oncology* 2005; 2: 4 – 11

Bedford, M. T., Helden, P. D. Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate. *Cancer Res* 1987; 47: 5274 – 5276

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

Blot, W. J., McLaughlin J. K., Winn, D. M. Ym. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988; 48: 3282 – 3287

Boyle, J. O., Hakim, J., Koch, W. ym. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 4477 – 4480

Bosch, F. X., Broker, T. R., Forman, D. ym. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases (review article). *Vaccine* 2013; 31: 1 – 31

Brennan, J. A., Boyle, J. O., Koch W.M. ym. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332: 712 – 717

Bussu, F., Sali, M., Gallus R. ym. HPV infection in squamous cell carcinomas arising from different mucosal sites of the head and neck region. Is p16 immunohistochemistry a reliable surrogate marker? *Brit J Can* 2013; 108: 1157 – 1162

Califano, J., van der Riet, P., Westra, W. ym. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56: 2588 – 2492

Chaiwongkot, A., Vinokurova, S., Pientong, C., 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: 2087–2094

Chang, J. F., Straif, K., Guha, N. The role of alcohol dehydrogenase genes in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis of ADH1B and ADH1C. *Mutagenesis* 2012; 27: 275 – 286

Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Anderson, W. F., Gillison, M. L. Incidence trends for human papillomavirus – related and – unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26: 612 – 619

Chen, K., Sawhney, R., Khan, M. ym. Methylation of multiple genes in diagnostic and therapeutic markers in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 133: 1131 – 1138

Combes, J-D., Franceschi, S. Review: Role of human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers. *Oral Oncol* 2014; 50: 370 – 379

Costello, J. F., Plass C. Methylation matters (review article). *J Med Genet* 2001; 38: 285 – 303

Cravo, M., Pinto, R., Fidalgo, P. ym. Global DNA hypomethylation occurs in the early stages of intestinal type gastric carcinoma. *Gut* 1996; 39: 434 – 438

Crowe, D. L., Hacia, J. G., Hsieh, C.-L. ym. Molecular pathology of head and neck cancer (review article). *Histol Histopathol* 2002; 17: 909 – 914

Czerninski, R., Krichevsky, S., Ashhab, Y. ym. Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2009; 15: 206 – 213

Dai, W-M., Yang, B., Chu, X-Y. ym. Association between folate intake, serum folate levels and the risk of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Chin Med J* 2013; 126: 1957 – 1964

Dalianis, T. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy. *Int J Oncol* 2014; 44: 1799 – 1805

Dammann, R., Schagdarsurengin, U., Seidel, C. ym. The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update. *Histol Histopathol* 2005; 20: 645 – 663

Das, P. M., Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4632 – 4642

De Freitas Cordeiro-Silva, M., Stur, E., Agostini, L. P. ym. Promoter hypermethylation in primary squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a study of a Brazilian cohort. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 10111 – 10119

Delgado, S., Gómez, M., Bird, A., Antequera, F. Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *The EMBO Journal* 1998; 17: 2426 – 2435

Demokan, S., Dalay, N. Role of DNA methylation in head and neck cancer (review article). *Clin Epigenet* 2011; 2: 123 – 150

Demokan, S., Suoglu, Y., Demir, D. ym. Microsatellite instability and methylation of the DNA mismatch repair genes in head and neck cancer. *Ann Oncol* 2006; 17: 995 – 999

De Oliveira, M. G., Ramalho, L. M. P., Gaião, L. ym. Retinoblastoma and p53 protein expression in pre-malignant oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* 2012; 6: 163 – 166

Dhooge, I. J., De Vos, M., Cauwenberge, P. B. Multiple primary malignant tumors in patients with head and neck cancer: results of a prospective study and future perspectives. *The Laryngoscope* 1998; 108: 250 – 256

D'Souza, G., Gross, N.D., Pai, S.I. ym. Oral human papillomavirus (HPV) infection in HPV-positive patients with oropharyngeal cancer and their partners. *Am Soc Clin Oncol* 2014; 32: 2408 – 2415

D'Souza, G., Kreimer, A. R., Viscidi, R. ym. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007; 356: 1944 – 1956

Ehrlich, M. DNA methylation in cancer: Too much, but also too little (review article). *Oncogene* 2002; 21: 5400 – 5413

Ehrlich, M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 2009; 1: 239 – 259

El-Naggar, A. K., Hurr, K., Huff, V. ym. Microsatellite instability in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Am J Pathol* 1996; 148: 2067 – 2072

El-Naggar, A. K., Lai, S., Clayman, G. ym. Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma. *Am J Path* 1997; 151: 1767 – 1774

Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E. ym. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; 343: 1350 – 1354

Esteller, M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumor-suppressor genes. *Br J Cancer* 2006; 94: 179 – 183

Feinberg, A. P., Vogelstein, B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 111: 47 – 54

Fraga, M. F., Esteller, M. Towards the human cancer epigenome. *Cell Cycle* 2005; 4: 1377 – 1381

Gillison, M. L., Lowy, D. R. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet* 2004; 363: 1488 – 1489

Gillison, M. L. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck* 2007; 29: 779 – 792

González- Ramírez, I., García-Cuellar, C., Sánchez-Pérez, Y., Granados-García, M. DNA methylation in oral squamous cell carcinoma: molecular mechanisms and clinical implications (review article). *Oral Disease* 2011a; 17: 771 – 778

González- Ramírez, I., Rámirez-Amador, V., Irigoyen-Camacho, M. E. ym. hMLH1 promoter methylation is an early event in oral cancer. *Oral Oncology* 2011b; 47: 22 – 26

Groves, I., Coleman, N. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J Pathol* 2015. doi: 10.1002/path.4496

Hammarstedt, L., Lindquist, D., Dahlstrand, H. ym. Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2006; 119: 2620 – 2623

Hur, K., Cejas, P., Feliu, J. ym. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis. *Gut* Julkaistu internetissä 23.5.2013 doi:10.1136/gutjnl-2012- 304219

International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10) Version for 2010. <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en#/C00-C14>

Issa, J-P. J. DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1634 – 1637

Ishwad, C. S., Ferrel, R. E., Rossie, K. M. ym. Microsatellite instability in oral cancer. *Int J Cancer* 1995; 64: 332 – 335

Joensuu, H., Roberts, P. J., Kellokumpu-Lehtinen, P-L., ym. Syöpätaudit. *Duodecim*. 2013, kpl 19.

Johannsen, E., Lambert, P. F. Epigenetics of human papillomaviruses. *Virology*. Julkaistu internetissä 13.08.2013 <http://dx.doi.org.ezproxy.utu.fi:2048/10.1016/j.virol.2013.07.016>

Järvi, U. HPV-rokotukset alkavat syksyllä. *Lääkärilehti*: [http://www.laakarilehti.fi/uutinen.html?opcode=show/news\\_id=13537/type=1](http://www.laakarilehti.fi/uutinen.html?opcode=show/news_id=13537/type=1). Julkaistu 31.05.2013

Kang, H., Kiess, A., Chung, C. Review: Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomic. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12: 11 – 26

Kim, Y. I., Giuliano, A., Hatch, K. D. ym. Global DNA hypomethylation increases progressively in cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* 1994; 74: 893 – 899

Konttinen, Y. T., Ali, A., Hietanen, J. ym. Suulääketiede. *Therapia odontologica* 2008; 24: 899 – 972

Koskimaa, H-M., Paaso, A., Welters, M. ym. Human papillomavirus 16 E2-, E6- and E7-specific T-cell responses in children and their mothers who developed incident cervical intraepithelial neoplasia during a 14-year follow-up of the Finnish Family HPV cohort. *J Transl Med* 2014; 12: 44

Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P., Franceschi, S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 467 – 475

Kulkarni, V., Saranath, D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncology* 2004; 40: 145 – 153

Kulmala, S-M. A., Syrjänen, S. M., Gyllenstein, U. B. ym. Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol* 2006; 59: 513 – 517

Laird, P. W. The power and the promise of DNA methylation markers (review article). *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 253 – 266

Lajer, C., Garnæs, L., Friis-Hansen, L. ym. The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer. *Brit J Canc* 2012; 106: 1526 – 1534



Lassen, P., Eriksen, J., Krogdahl, A. ym. The influence of HPV-associated p16-expression on accelerated fractionated radiotherapy in head and neck cancer: Evaluation of the randomized DAHANCA 6&7 trial. *Radiother Onc* 2011; 100: 49 – 55

Li, B-L., Lu, W., Qu, J-J. ym. CpG island hypermethylation-associated silencing of micro-RNAs promotes human endometrial cancer. *Cancer Cell International* 2013; 13: 44

Licitra, L., Perrone, F., Bossi, P. ym. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5630 – 5636

Lin, B., Wang, H., D'Souza, G. ym. Long-term prognosis and risk factors among patients with HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2013; 119: 3462–3471. doi: 10.1002/cncr.28250.

Lleras, R. A., Smith, R. V., Adren, L. R. ym. Unique DNA methylation loci distinguish anatomic site and HPV status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 5444 – 5455

Llewellyn, C. D., Johnson, N. W., Warnakulasuriya K. A. A. S. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people – a comprehensive literature review. *Oral Oncology* 2001; 37: 401 – 418

Mai, A., Altucci, L. Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead (review article). *Intl J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 199 – 213

Marur, S., D'Souza, G., Westra, W. H., Forastiere, A. A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic (review article). *Lancet Oncol* 2010; 11: 781 – 789

Mielcarek-Kuchta, D., Paluszczak, J., Seget, M. ym. Prognostic factors in oral and oropharyngeal cancer based on ultrastructural analysis and DNA methylation of the tumour and surgical margin. *Tumour Biol* 2014; 35: 7441 – 7449

Miller, C. S., Johnstone, B. M. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997 (review article). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 622 – 635

Min, B-M., Baek, J-H., Shin, K-H. ym. Inactivation of the p53 gene by either mutation or HPV infection is extremely frequent in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1994; 30: 338 – 345

Moselhy, S. S., Kumosani, T. A., Kamal, I. H. ym. Hypermethylation of p15, p16, and E-cadherin genes in ovarian cancer. *Toxicology and Industrial Health* julkaistu internetissä 2013 doi: 10.1177/0748233713484657

Mulero-Navarro, S., Esteller, M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncon Hemat* 2008; 68: 1 – 11

Muller, S., Su, L., Tighiouart, M. ym. Distinctive E-cadherin and epidermal growth factor receptor expression in metastatic and non metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2008; 113: 97 – 107

Ndiaye, C., Mena, M., Alemany, L. ym. HPV DNA, E6/E7, and p16<sup>INK4a</sup> detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 2014; 15: 1319 – 1331

Nelson, S. M., Ferguson, L. R., Denny, W. A. DNA and the chromosome- varied targets for chemotherapy. *Cell Chromosome* 2004; 24: 2

van Oijen, M. G. C. T., Slootweg, P. J. Oral field cancerization: Carcinogen –induced independent events or micrometastatic deposits? (review article). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 249 – 256

Olthof, N., Huebbers, C., Kolligs, J., ym. Viral load, gene expression and mapping of viral integration sites in HPV16-associated HNSCC cell lines. *Int J Cancer* 2015; 136: E207 – E218

Olthof, N., Speel, E.-J., Kolligs, J., ym. Comprehensive analysis of HPV16 integration in OSCC reveals no significant impact of physical status on viral oncogene and virally disrupted human gene expression. *PLoS One* 2014; 9: e88718. doi:10.1371/journal.pone.0088718

O'Rorke, M. A., Ellison, M. V., Murray, L. J. ym. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: A systematic review and meta-analysis (review article). *Oral Oncol* 2012; 48: 1191 – 1201

Perrone F., Cortelazzi B., Bossi P. ym. Isolating p16-positive/HPV-negative oropharyngeal cancer: an effort worth making. *Am J Surg Pathol.* 2011; 35: 774 – 777

Portin, P. Mullistaako epigeneettinen perityminen evoluutioteorian perusteet? *Tieteessä tapahtuu* 2012; 2: 26 – 34

Prigge, E.-S., Toth, C., Dyckhoff, G. ym. p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67 co-expression specifically identifies transformed cells in the head and neck region. *Int J Cancer.* 2015; 136: 1589–1599. doi: 10.1002/ijc.29130

Ran, Y., Wu, S., You, Y. Demethylation of E-cadherin gene in nasopharyngeal carcinoma could serve as a potential therapeutic strategy. *J Biochem* 2011; 149: 49 – 54

Rauch, T. A. Zhong, X. Wu, X. ym. High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *PNAS* 2007; 105: 252 – 257

Rautava, J., Kuuskoski, J., Syrjänen, K. ym. HPV genotypes and their prognostic significance in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Virol* 2012; 53: 116 – 120

Richards, K. L., Zhang, B. Baggerly, K. A. ym. Genome-wide hypomethylation in head and neck cancer is more pronounced in HPV-negative tumors and is associated with genomic instability. *PLoS One* 2009; 4: e4941

Rosas, S. L. B., Koch, W., Carvalho, M. G. C. ym. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 939 – 942

Salaspuro, M. Acetaldehyde, microbes, and cancer of the digestive tract. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003; 40: 183 – 208

Salaspuro, M., Härkönen, M., Marvola, M. ym. Näkökulma: Asetalehydi on vaiettu karsinogeeni. *Suomen lääkärilehti* 2015;33: 1978 – 1979

Salaspuro, V., Salaspuro, M. Synergistic effect of alcohol drinking and smoking on in vivo acetaldehyde concentration in saliva. *Int J Cancer* 2004; 111: 480–483

Sanchez-Cespedes, M., Esteller, M., Wu, L. ym. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2000; 60: 892 – 895

Sartor, M. A., Dolinoy, D. C., Jones, T. R. ym. Genome-wide methylation and expression differences in HPV(+) and HPV(-) squamous cell carcinoma cell lines are consistent with divergent mechanisms of carcinogenesis. *Epigenetics* 2011; 6: 777 – 787

Sharma, S., Kelly, T. K., Jones, P. A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31: 27 – 36

Schafer, K. A. The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol* 1998 35: 461

Smith, I. M., Mydlarz, W. K., Mithani, S. K., Califano, J. A. DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage. *Int J Cancer* 2007; 121: 1724 – 1728

Steenbergen, R. D. M., Hermsen, M. A. J. A., Walboomers, J. M. M. ym. Integrated human papillomavirus type 16 and loss of heterozygosity at 11q22 and 18q21 in an oral carcinoma and its derivative cell line. *Cancer Res* 1995; 55: 5465 – 5471

Steinmann, K., Sandner, A., Schagdarsurengin, U., Dammann, R. H. Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2009; 22: 1519 – 1526

Supić, G., Kozomara, R., Branković-Magić, M. ym. Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 2009; 45:1051-1057

Suh, Y., Amelio, I., Guerrero Urbano, T., Tavassoli, M. Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1018

Suusyöpä. Käypä hoito-suositus 9.1.2012. Suomalaisen Lääkäriseura Duodecimin ja Suomen Hammaslääkäriseuran Apollonian asettama työryhmä. [www.kaypahoito.fi](http://www.kaypahoito.fi). Luettu 10.7.2013

Syrjänen, K., Syrjänen, S., Lamberg, M. ym. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983; 12: 418 – 424

Syrjänen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS* 2010; 118: 494–509

Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer (review article). *Journal of Clinical Virology* 2005; 32: 59 – 66

Syrjänen, S. Ihmisen papilloomavirukset ja niiden aiheuttamat suuinfektiot. *Suomen Hammaslääkärilehti* 2006; 13: 304 – 312

Syrjänen, S., Lodi, G., von Bültzingslöwen, I. ym. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Diseases* 2011, 17: 58–72

Szyf, M. Targeting DNA methylation in cancer. *Bull Cancer* 2006; 93: 961 – 972

Tamaru, H., Selker, E. U. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 2001; 414: 277 – 283

Tsou, J. A., Hagen, J. A., Carpenter, C. L., Laird-Offringa, I. A. DNA methylation analysis. A powerful new tool for lung cancer diagnosis (review article). *Oncogene* 2002; 21: 5450 – 5461

Vinokurova, S., von Knebel Doeberitz, M. Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. *PLoS One* 2011; 6: e24451

Viswanathan, M., Tsuchida, N., Shanmugam, G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 105: 41 -46

Voet D., Voet, G. *Biochemistry*, 4<sup>th</sup> edition. John Wiley & Sons, Inc 2011: 111-113

Wang, D., Su, L., Huang, D. ym. Downregulation of E-cadherin enhances proliferation of head and neck cancer through transcriptional regulation of EGFR. *Mol Cancer* 2011; 10: 116

Wang, Y., Irish, J. MacMillan, C. ym. High frequency of microsatellite instability in young patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma: lack of involvement of the mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2. *Int J Cancer* 2001; 93: 353 – 360

Wang, Y., Zhou, X., Song, Y. ym. The mismatch repair gene hPMS1 (human postmeiotic segregation1) is down regulated in oral squamous cell carcinoma. *Gene* 2013; 524: 28 – 34

Warnakulasuriya, S., Johnson, Newell. W., van der Waal, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007; 36: 575 – 580

Wilson, G., Lechner, M., Köferle, A. Ym. Integrated virus-host methylome analysis in head and neck squamous cell carcinoma. *Epigenetics* 2013; 8: 953 – 961

Woolgar, J. A. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma (review article). *Oral Oncology* 2006; 42: 229 – 239

World Health Organization. Weekly epidemiological record. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper. 2014; 43: 465 – 492

Worsham, M., Ali, H., Dragovic, J., Schweitzer, V. Molecular characterization of head and neck cancer: How close to personalized targeted therapy? *Mol Diagn Ther* 2012; 16: 209 – 222

Worsham, M., Chen, K., Ghanem, T. ym. Epigenetic modulation of signal transduction pathways in HPV-associated HNSCC. *Otolaryngol Head Neck Surg* Julkaistu internetissä 4.6.2013 doi: 10.1177/0194599813490895

Yalniz, Z., Demokan, S., Suoglu, Y. ym. Simultaneous methylation profiling of tumor suppressor genes in head and neck cancer. *DNA Cell Biol* 2011; 30: 17 – 24

Yoo, C. B., Jones, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 37 – 50

Zaravinos, A. An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. *Oncotarget* 2014; 5: 3956 – 3969

Zhang, K., Dent, S. Y. R. Histone modifying enzymes and cancer: Going beyond histones. J Cell Biochem 2005; 96: 1137 – 1148

<http://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=8468>. Luettu 7.9.2013.

<http://www.thl.fi/fi/web/rokottaminen/rokotteet/hpv-rokote>. Luettu 24.01.2015.

<http://www.omim.org/>. Luettu 14.02.2015.

EuropeanMedicinesAgency.[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003852/human\\_med\\_001863.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003852/human_med_001863.jsp&mid=WC0b01ac058001d124). Luettu 5.9.2015.

NORDCAN. <http://www-dep.iarc.fr/NORDCAN/FI/frame.asp>. Luettu 12.10.2015.

GLOBOCAN. <http://globocan.iarc.fr/>. Luettu 12.5.2015.