

# **HYPERMETYLERING I CYTOLOGISKA PROV FRÅN CERVIX OCH UTVECKLING AV ALLVARLIGA CELLFÖRÄNDRINGAR**

JACOB OSCAR ALSSAMARAY



**LUNDS  
UNIVERSITET**

Kandidatexamensprojekt I Molekylärbiologi, 15 hp  
2020

Biologiska Institutionen

Lunds Universitet

# ABSTRAKT

Cervixcancer kan uppkomma vid ihållande infektion med humant papillomvirus (HPV). HPV orsakar även mildare cellförändringar, CIN-I, som många gånger läker tillbaka. Patienter med cellförändringar av typ CIN-II/III löper däremot större risk att på sikt utveckla cancer. Syftet med studien var att undersöka om det fanns en korrelation mellan hypermetylering på promotorregionerna i tumörsuppressorgenerna FAM19A4 samt hsa-mir124-2 och utveckling av allvarliga cellförändringar i cervix. Cytologiska prov DNA-extraherades, DNA-koncentrationsbestämde och bisulfit-konverterades, varpå metyleringsspecifik realtids-PCR genomfördes med QIASure Methylation Test i Rotor-Gene Q MDx. Totalt 41 prov analyserades, varav 51.2% (21/41) prov var positiva för hypermetylering. 48.8% av de metylerade proven var endast positiva för FAM19A4 och 17.1% endast för hsa-mir124-2. Metyleringsandelen var 100% hos CIN-III-cytologier där livmoderhalsbärare utvecklat skivepitelcancer, 62.5% hos benigna cytologier där livmoderhalsbärare utvecklat skivepitelcancer, 50% hos benign cytologi där livmoderhalsbärare utvecklat CIN-III inom 24 månader samt 20% hos benign cytologi där livmoderhalsbärare utvecklat CIN-III efter 7-8 år.

Studien analyserade relativt få prover men lyckades producera resultat som går i linje med ny forskning där metylering har kopplats till allvarlig cellförändring. Studien indikerar fördelar med FAM19A4 samt hsa-mir124-2 som biomarkörer i metyleringsanalys. Sannolikheten att bli HPV-inficerad är väldigt hög och tidig upptäckt av cellförändringar efter HPV-positivt cellprov vid screening är därmed essentiell. Cytologi är en subjektiv testmetod medan metyleringsanalys är en objektiv metod som i framtiden kan vara en säkrare, enklare, mer effektiv och på sikt sannolikt storskaligt applicerbar metod, som gärna ses i kombination med adekvat HPV-test. Det talar positivt för vidare prövning av metoden, åtminstone för att användas som ett komplement till nuvarande diagnostik.

*Nyckelord: cervix, FAM19A4, hsa-mir124-2, hypermetylering, skivepitelcancer, tumörsuppressorgener*

# **HYPERMETHYLATION IN CYTOLOGICAL SAMPLES FROM CERVIX AND THE DEVELOPMENT OF SEVERE DYSPLASIA**

JACOB OSCAR ALSSAMARAY



**LUND**  
**UNIVERSITY**

Bachelor's Degree Project in Molecular Biology 15 credits  
2020

Department of Biology

Lund University

## **ABSTRACT**

Cervical cancer can occur with a persistent human papillomavirus-infection (HPV) and can cause milder cell changes, CIN-I, which often regress. In contrast, patients with cell changes of type CIN-II/III are at greater risk of developing cancer in the long term. The purpose of the study was therefore to investigate whether there was a correlation present between hypermethylation at the promoter regions of the tumor suppressor genes FAM19A4 as well as hsa-mir124-2, and the development of severe cervical cell changes or lesions. Cytological samples were DNA-extracted, DNA-concentration was determined, and the samples were bisulfite-converted. Real-time methylation-specific PCR was performed with the QIASure Methylation Test in Rotor-Gene Q MDx. A total of 41 samples were analyzed, of which 51.2% (21/41) samples were positive for hypermethylation. 48.8% of the methylated samples were only positive for FAM19A4 and 17.1% only for hsa-mir124-2. The methylation percentage was 100% of the CIN-III cytology where the samples later developed squamous cell cancer, 62.5% among benign cytology where the samples developed squamous cell cancer as well, 50% among benign cytology where the samples developed CIN-III within 24 months, and 20% among benign cytology where the samples developed CIN-III after 7 -8 years.

The study analyzed relatively few samples but managed to produce results that are in line with new research, where methylation has been linked to severe cell change. The study indicates advantages of FAM19A4 and hsa-mir124-2 as biomarkers in methylation analysis. The likelihood of becoming HPV-infected is very high and early detection of cell changes after HPV-positive cell testing at screening is therefore essential. Cytology is a subjective test method, while methylation analysis is an objective method that in the future may be a safer, simpler, more efficient and, in the long run, likely to be large-scale application, which is preferably seen in combination with adequate HPV testing. It speaks well for further testing of the method, at least to be used as a complement to current diagnostics.

*Keywords: cervix, FAM19A4, hsa-mir124-2, hypermethylation, squamous-cell carcinoma, tumor suppressor genes*

# FÖRORD

Tack till handledare Ola Forslund, Associate Professor, vid Medicinsk Mikrobiologi för att ha fått vara delaktig i ett spännande och innovativt projekt. Tack även till Molekylär på Medicinsk service, Klinisk Mikrobiologi i Lund för tillgång till deras lokaler, utrustning och positiva arbetsmiljö. Tack likaså till Heike Kotarsky och Klinisk Patologi i Lund för tillgång till deras utrustning. Särskilt tack till legitimerad biomedicinsk analytiker Tim Berglund för vägledning. Ett speciellt tack till Cezar och Jessica för allt stöd i tribulationer. Utan er hade jag gett upp.

Slutligen, för att citera en av mina hjältar: The beautiful thing about learning is, nobody can take it away from you. – Riley B. King.

## **ETISK BEDÖMNING**

Handledaren har ett etiskt tillstånd för studien (2019–01463) och allt tillgängligt material är avidentifierat och kan inte kopplas till enskild patient. Information som erhålls är ålder, tid mellan cytologiskt prov och biopsi samt om biopsi visat positivt för dysplasi (CIN-I – CIN-III eller mer) i cervix.

# Innehållsförteckning

<b>FÖRORD</b> .....	4
<b>ETISK BEDÖMNING</b> .....	5
<b>INTRODUKTION</b> .....	7
DIAGNOSTIK .....	7
HYPERMETYLERING OCH TUMÖRSUPPRESSORGENER.....	8
UTFÖRANDE OCH SYFTE.....	8
<b>MATERIAL OCH METODER</b> .....	9
EXTRAKTION .....	9
KONCENTRATIONSKVANTIFIERING.....	9
BISULFIT-KONVERSION .....	10
METYLERINGSSPECIFIK REALTIDS-PCR .....	10
STATISTISK ANALYS .....	10
FELKÄLLOR.....	11
<b>RESULTAT</b> .....	11
<b>DISKUSSION</b> .....	14
METODDISKUSSION .....	14
RESULTATDISKUSSION .....	15
<b>SLUTSATS</b> .....	17
<b>REFERENSER</b> .....	18
<b>APPENDIX</b> .....	21

# INTRODUKTION

Humant papillomvirus (HPV) är det vanligaste sexuellt överförbara viruset i världen. Enligt Socialstyrelsens senaste statistik konstaterades 540 fall av cervixcancer i Sverige år 2018 (Socialstyrelsen, 2020). Sannolikheten att bli infekterad minst en gång i livet är runt 85%-90% (Chesson et al., 2014) och HPV orsakar infektioner hos båda könstyperna. Immunförsvaret läker ofta ut HPV-infektionen men i vissa fall uppkommer cellförändringar, som kan leda till utveckling av bl.a. skivepitelcancer eller adenocarcinom, som orsakar cervixcancer. Det är vetenskapligt bevisat att HPV är starkt kopplat till utveckling av cervixcancer (Stratton & Culkim, 2016), samt att HPV även är associerat med penis-, anal- och tonsillcancer (Rai et al., 2016).

HPV är ett dubbelsträngat DNA (dsDNA) som tillhör papillomavirus-familjen. Genital HPV-infektion överförs sexuellt genom direkt kontakt mellan hud och slemhinnor. De vanligaste HPV-typerna i världen är HPV16 och HPV18, som är kopplade till carcinogenes i cervix (Bhat et al., 2017). De orsakar också ca 70% av all HPV-inducerad cancer (Li et al., 2010). Profylaktiskt vaccin finns på marknaden men det ger inte ett fullständigt skydd mot cervixcancer (Brianti et al., 2017).

## Diagnostik

Cellförändringar kan upptäckas med en screeningmetod där ett gynekologiskt cellprov på livmodertappen erhålls. Kvinnor med livmoder bjuds in var tredje år på cellprovtagning från och med 23–49 års ålder och var femte år från 50–64 års ålder. Provet tas för att i tidigt skede upptäcka eventuella cellförändringar som annars kan leda till cervixcancer. Trots att den relativa femårsöverlevnaden för diagnosticerad livmoderhalscancer ligger på mellan 80%-90% så kan den leda till många förlorade år, då den drabbar en relativt ung demografi. Om cellprovet uppvisar cellförändringar genomgår en gynekologisk undersökning med kolposkopi för att se eventuella livmoderhalstapp-förändringar, där även vävnadsprov kan tas. (Liu et al., 2018).

En cellulär förändring i livmoderhalsen kallas för cervikal intraepitelial neoplasi (CIN) och olika nivåer av dysplasi klassificeras därför in i kategorierna CIN-I, CIN-II eller CIN-III, beroende på dysplasiernas allvarlighet. Majoriteten av dysplasier hanteras av immunförsvaret och genomgår därför en regression till tidigare CIN-stadie, alternativt läker ut helt. Ungefär 60% av CIN-I läker ut till normal cytologi efter ett år. Cellförändringar är dock inte cancer utan anses vara förstadium, som potentiellt kan utvecklas vidare till cancer om de förblir obehandlade. Patienter med dysplasier av typerna CIN-II/III lider därför större risk för att på sikt utveckla cancer, vilket gör regelbundna kontroller och HPV-vaccinering essentiellt för hållbar utveckling (Mello & Sundstrom, 2020).



Två kommersiellt tillgängliga tester för att detektera HPV i cervix är cobas® av Roche samt Aptima™ av Hologic. Cobas är ett kvalitativt, DNA-baserat, *in vitro*-test medan Aptima detekterar E6/E7-mRNA, båda för samma 14 olika HPV-högrisktyper. Även om Aptima demonstrerar signifikant högre specificitet för tester av biopsier än Cobas så är båda testerna för HPV träffsäkra vid cervix-biopsier av cellförändringar (Ge et al., 2017).

### **Hypermetylering och tumörsuppressorgener**

DNA-metylering innebär att en metylgrupp adderas till en eller flera nukleotider och därigenom slår på eller av gener. Hypermetyleringen sker oftast i CpG-sekvenser, närmare bestämt på femte positionen på den aromatiska cytosin-ringen som följs åt av ett guanin och kvarstår på DNA-strängarna efter replikation. Onormala DNA-metylerade sekvenser kan spela en stor roll i carcinogenes om de tystas eller slås ut helt, vilket kan leda till dysplasi eller neoplasia (Lorincz, 2016). Tumörsuppressorgenerna FAM19A4 och hsa-mir124-2 är två promotor-sekvenser som specifikt brukar vara hypermetylerade vid cervixcancer (Estécio, 2011; Bu, 2018) och används som biomarkörer. Potentiellt kan hypermetylering av dessa promotorer komma att användas för att vägleda om kvinnor som deltar i screening bör kallas till gynekologisk utredning.

FAM19A4 är en proteinkodande gensekvens och är en förkortning för familj med sekvenslikhet 19-medlem A4 (Bu et al., 2018). Som en ligand i formylpeptidreceptor 1, kan FAM19A4 agera som promotor för fagocytos och öka makrofagernas aktivitet, aktivering och migrering under patogena infektioner (Bu et al., 2018). Den kan även uppreglas i lipopolysackarid-stimulerade makrofager samt monocyter, och har de senaste åren börjat undersökas som en möjlig biomarkör vid screening för cervixcancer (Luttmer et al., 2015). hsa-mir124-2 (Homo sapiens mikroRNA) är en annan möjlig biomarkör för screening. Ett mikroRNA (miRNA) är en kort, icke-kodande, RNA-molekyl som agerar bl.a. vid post-transkriptionell genreglering av mRNA och tystning av RNA (Oltra et al., 2018). Genspecifik hypermetylering korrelerar ofta med hypermetylering i CpG-rika promotorsekvenser. Metylering av DNA kan därför orsaka en tystning och därigenom nedreglering av specifika miRNA, däribland hsa-mir124-2 (Del Pino et al., 2019).

### **Utförande och Syfte**

Denna studie använder en extraktionsteknik som filtrerar och separerar DNA-material (Chircov et al., 2019), som därefter koncentrationsbestäms med en fotospektrometer (ThermoFisher, 2018). Det extraherade DNA-materialets koncentration är avgörande för korrekt metyleringskonvertering med bisulfit-reagens, ett salt med vätesulfitjonen  $\text{HSO}_3^-$  som konverterar icke-metylerat cytosin till uracil. Därefter sker en PCR-amplifiering som översätter uracil till tymin, medan det metylerade 5-metylcytosin (5-mC) förblir okonverterat och intakt (Zymo Research, 2018). Multiplex Realtids-PCR amplifierar de hypermetylerade promotorregionerna i tumörsuppressorgenerna, varpå metyleringsanalysen identifierar om promotor-hypermetyleringar på FAM19A4 och hsa-mir124-2-generna har inträffat.

Syftet med studien var att undersöka om det fanns en korrelation mellan hypermetylering på promotorregionerna i tumörsuppressorgenerna FAM19A4 samt hsa-mir124-2 och utveckling av allvarliga cellförändringar i cervix. Är resultaten lovande så är förhoppningen att på sikt bidra till införande av storskalig metyleringsanalys som ett komplement och indikativt verktyg i framtida cytologisk diagnostik av cervixcancer.

## **MATERIAL OCH METODER**

Projektet genomfördes på Avdelningen för Medicinsk Mikrobiologi vid Lunds Universitet, i deras lokaler på Medicinsk service, Klinisk Mikrobiologi, i Lund. Provmaterialet för arbetet tillhörde en biobank för cervixprov.

Antal tillgängliga cytologiska prov för projektet var 280 stycken. Fyra kategorier med sammanlagt 61 prov valdes med avseende på hypotes och tillgänglig tidsram. Under fyra veckor analyserades 52 funna prov, varav 41 gick vidare till slutgiltig analys. Urvalet gjordes för cytologiska prov tagna före fastställande av allvarlig cellförändring med biopsi och kategoriserades i kategorierna A-D. De cytologiska proverna är insamlade mellan 4 månader och åtta år före fastställande av allvarlig cellförändring. HPV har tidigare testats för i en annan del av projektet och informationen samt resultaten har fått användas som ett komplement i denna studie.

Kategori A hade cytologisk starkt avvikande dysplasi med skivepitelcancer inom 0.3–2 år. Kategori B hade benign cytologi med skivepitelcancer inom 0.5–7 år. Kategori C hade benign cytologi som utvecklat CIN-III inom 0.3–2 år. Kategori D hade benign cytologi som utvecklat CIN-III inom 7–8 år.

### **Extraktion**

DNA-material i cytologiska prov späddes först till 400µl för vidare extraktion mha MagDEA DxSV-kit i PSS magLead® 12gC till arbetsvolym 50µl. Proven löstes i en lysis-buffert och DNA separerades ut i brunnarna, varpå magnetkolor i lösningen absorberade DNA-materialet, Därefter flyttades DNA-materialet över till en tvättbuffert för vidare rening av nukleinsyror. Slutligen tvättades DNA i etanol innan det resuspenderades i sterilt vatten, vilket gav isolerat DNA-material (PSS, 2018).

### **Koncentrationskvantifiering**

Vidare koncentrationskvantifiering av dsDNA skedde mha Qubit fluorometer enligt metodbeskrivning (ThermoFisher, 2018). En arbetslösning bereddes med Qubit dsDNA HS Buffer enligt bestämda formeln  $arbetslösning = 199\mu l \times (n + 1 + 2 ST)$ . Därefter tillsattes 1µl Qubit dsDNA HS Reagent per  $(n + 1 + 2 ST)$  till arbetslösningen för 1:200-spädning.

Kalibrering av Qubit fluometer genomfördes först med två standardprov, inräknade i arbetslösningen, i enlighet med metodbeskrivning. Därefter alikvoterades 199µl av arbetslösningen, med 1µl av varje prov ur DNA-extraherad provserie, i 0.5ml Qubit-rör och koncentrationskvantifierades. Erhållna koncentrationvärden beräknades mot önskad mängd dsDNA enligt formeln:  $100ng = 100\mu l \div (n \frac{ng}{\mu l})$ . För prov med låga koncentrationer dsDNA anpassades önskad mängd mot 50ng dsDNA. Därefter späddes beräknade volymer till slutvolym 45µl dsDNA för vidare bisulfitbehandling.

### **Bisulfit-konversion**

Konversion av cytosin till uracil genomfördes med EZ DNA Methylation™ Kit i enlighet med instruktioner från tillverkare (Zymo Research, 2018). 5µl M-Dilution Buffer adderades först till vardera 45µl-provlösning, varpå 100µl CT Conversion Reagent tillfördes och inkuberades vid 50°C i 12 timmar. Vidare följde flera bindande, tvättande, desulfonylerande och eluerande steg med M-Binding Buffer, M-Wash Buffer, M-Desulphonylation Buffer samt M-Elution Buffer respektive, i Zymo-Spin™ IC Column-kolonner i enlighet med metodbeskrivning (Zymo Research, 2018).

### **Metyleteringsspecifik realtids-PCR**

Slutligen analyserades det eluerade provmaterialet med QIASure Methylation Test (QIAGEN). 17.5µl QIASure Master Mix sattes först i 100µl Rotor-Gene® PCR-rör, med 2.5µl QIASure Calibrator som positiv kontroll samt 2.5µl H<sub>2</sub>O som negativ kontroll. Därefter sattes 2.5µl av eluerat, bisulfitkonverterat, DNA i resterande rör och slutligen genomfördes PCR-metoden i en Rotor-Gene Q MDx, i enlighet med metodbeskrivning (QIASure Methylation, 2017).

### **Metyleteringsanalys**

Erhållna resultat analyserades med avseende på positivt respektive negativt resultat för hypermetyletering i markörerna FAM19A4 samt hsa-mir124-2. Resultaten jämfördes även mot provernas HPV-typer.

### **Statistisk Analys**

Statistiska analyser utfördes med Microsoft Excel för att beräkna statistisk signifikans mellan de erhållna kategorierna. Procentuell fördelning inom provkategorierna fastställdes med Fisher's Exakta Test för två eller färre möjligheter, och kalkylerades i 2x2-korstabeller mot varandra (Kim, 2017). Fisher's Exakta Test valdes eftersom det appliceras främst vid mindre provvolymer och bestämdes genom att exakt beräkna signifikansen av nollhypotesens avvikelse, *P*-värdet. Det exakta *P*-värdet för en hypergeometrisk 2x2-korstabell kalkylerades genom att beräkna vilka kolumner och rader avviker mest från nollhypotesen. Därefter jämfördes erhållna *P*-värden mot varandra för identifiering av signifikans. Signifikansnivån valdes till 95% och ett *P*-värde <0.05 ansågs vara signifikant.

## Felkällor

Potentiella avvikelser låg främst i hantering av reagens. Bisulfit-konversionen innefattande en ljuskänslig och därmed lätt nedbrytbar CT Conversion Reagent samt även QIASure Master Mix och QIASure Calibrator.

## RESULTAT

I studien analyserades 61 prov av 280 tillgängliga, varav 20 prov exkluderades för slutlig analys. Utöver cytologiska prover och QIAGENS egna kontrollprov sattes även egna in house-kontrollprov vid varje körning, varav alla blev godkända.

Summering av totalt antal prov och utfall är presenterade i Tabell 1. Den slutliga analysen innefattade 41 cytologiska prov från kvinnor (ålder 15–67). Hypermetylering i FAM19A4 påvisades hos 48.8% (20 av 41) av de cytologiska proverna medan hypermetylering i hsa-mir124-2 påvisades hos 17.1% (7 av 41). Totalt 87.8% (36 av 41) cytologiska prov var HPV-positiva.

**Tabell 1.** Erhållna resultat för positiv eller negativt svar för FAM19A4 och hsa-mir124-2

	<i>FAM19A4 +/-</i>	<i>hsa-mir124-2 +/-</i>	<i>Totalt</i>
<i>Positivt för hypermetylering</i>	20	7	27
<i>Negativt för hypermetylering</i>	21	34	55
<i>Totalt antal prov</i>	41	41	

Cytologiska prov från livmoderhalsbärare som utvecklat skivepitelcancer samt positivt respektive negativt resultat för hypermetylering är angivna i Tabell 2, där även HPV-utfallet finns med. Prov 1–5 är ur kategori A, starkt avvikande dysplasi, och prov 6–13 är ur kategori B, benign cytologi.

**Tabell 2.** Kategori A respektive B. Hypermetylering av FAM19A4 och hsa-mir124-2 samt HPV-diagnos hos cytologiska prov från livmoderhalsbärare som utvecklat skivepitelcancer. Provnummer 1–5 är för kategori A, Stark dysplasi/CIN-III med skivepitelcancer inom 0.3–2 år. Provnummer 6–13 är för kategori B, benign cytologi med skivepitelcancer inom 0.5–7 år

<i>Provnummer</i>	<i>FAM19A4 +/-</i>	<i>hsa-mir124-2 +/-</i>	<i>HPV +/-</i>
1	-	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	-	+
5	+	+	+

6*	+	-	+
7	-	-	***
8	+	-	+
9	+	-	+
10*	+	-	+
11*	-	-	***
12*	+	+	+
13	-	-	-

\*Koncentration Totalt 50ng/μL istället för 100ng/μL tillsatt till bisulfit-konversion.

\*\*Positiv för Cobas, negativ för APTIMA.

\*\*\* Positiv för APTIMA, negativ för Cobas.

I Tabell 3 presenteras prov ur kategori C, benign cytologi, med CIN-III inom 0.3–2 år samt positivt respektive negativt resultat för hypermetylering och HPV-status.

**Tabell 3.** Kategori C. Hypermetylering i *FAM19A4* och *hsa-mir-124-2* samt HPV hos benigna cytologiska prov från livmoderhalsbärare som utvecklat CIN-III inom 0.3–2 år

<i>Provnummer</i>	<i>FAM19A4 +/-</i>	<i>hsa-mir124-2 +/-</i>	<i>HPV +/-</i>
14	-	-	+
15*	-	-	+
16	-	-	+
17	+	+	+
18*	+	-	+
19	-	-	+
20	-	-	***
21	-	-	-
22	-	-	**
23	-	-	+
24*	+	-	+
25	+	-	+
26	-	-	+
27	+	-	**
28*	+	+	+
29	+	-	+
30	+	-	-
31	+	-	+

\*Koncentration Totalt 50ng/μL istället för 100ng/μL tillsatt till bisulfit-konversion.

\*\*Positiv för Cobas, negativ för APTIMA.

\*\*\* Positiv för APTIMA, negativ för Cobas.

Prov ur kategori D, benign cytologi, med CIN-III inom 7–8 år samt positivt respektive negativt resultat för hypermetylering och HPV-status anges i Tabell 4.

**Tabell 4.** Kategori D. Hypermetylering i FAM19A4 och hsa-mir124-2 samt HPV hos benigna cytologiska prov från kvinnor som utvecklat CIN-III inom 7–8 år

Provnummer	FAM19A4 +/-	hsa-mir124-2 +/-	HPV +/-
32*	+	-	+
33*	-	-	+**
34	+	-	+
35*	-	-	+**
36	-	-	-
37	-	-	+
38*	-	-	+
39	-	-	-
40	-	-	+
41*	-	-	+

\*Koncentration Totalt 50ng/μL istället för 100ng/μL tillsatt till bisulfit-konversion.

\*\*Positiv för Cobas, negativ för APTIMA.

\*\*\* Positiv för APTIMA, negativ för Cobas.

Därefter beräknades koncentrationerna för spädning inför bisulfitbehandling, (Bilaga 1).

Beräkningarna för att få fram 100ng respektive 50ng dsDNA gjordes enligt formeln

$$\text{Önskad volym för spädning } (\mu\text{l}) = \frac{\text{Önskad mängd dsDNA (ng)}}{\text{Qubit-kvantifierad koncentration } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right)}$$

Önskad volym för spädning med H<sub>2</sub>O upp till totalvolym 45μl subtraherades därefter från 45μl för varje prov, enligt formel  $\text{Volym H}_2\text{O } (\mu\text{l}) = 45\mu\text{l inför Bisulfitbehandling } (\mu\text{l}) - \text{Erhållen volym för spädning } (\mu\text{l})$ .

Fisher's Exakta Test resulterade i *P*-värden mellan de olika kategorierna som följer: 0.2308 (kategori A-B), 0.1157 (kategori A-C), 0.0007 (kategori A-D), 0.6828 (kategori B-C), 0.1448 (kategori B-D) och 0.2264 (kategori C-D). Det observerades högre andel metylering (100%) hos kvinnor med starkt avvikande dysplasi (CIN-III) 0.3–2 år före skivepitelcancer jämför med kvinnor som hade benign cytologi (20%) och utvecklat CIN-III inom 7–8 år. Fisher's Exakta Test påvisade signifikant skillnad mellan kategorierna A och D, d.v.s. starkt avvikande dysplasi med skivepitelcancer inom 0.3–2 år och benign cytologi med CIN-III inom 7–8 år.

# DISKUSSION

Tidig upptäckt av cellförändringar, CIN-dysplasier, i screening är viktigt eftersom man då kan förhindra utveckling av allvarliga cellförändringar. Även om immunförsvaret läker ut de flesta av infektionerna så är den övervägande majoriteten av fallen HPV-positiva, vilket ännu en gång understryker vikten av att vaccinera mot HPV (Stratton & Culkim, 2016). Idag genomförs oftast regelbundna cellprovtagningar samt kolposkopi vid uppföljning, och den relativa femårsöverlevnaden hos cervixcancerpatienter är hög, men drabbar ofta en relativt ung population och kan därför leda till många förlorade år (Liu et al., 2018).

Syftet med studien var att undersöka om det fanns en korrelation mellan hypermetylering på promotorregionerna i tumörsuppressorgenerna FAM19A4 och hsa-mir124-2 och utveckling av allvarliga cellförändringar. Förhoppningen var att på sikt bidra till införande av storskalig metyleringsanalys som komplementär indikativt verktyg i framtida screeningprevention av cervixcancer. Provmaterialet bisulfit-konverterades och hypermetyleringsfrekvensen studerades, vilket diskuteras mer ingående nedan.

## Metoddiskussion

I studien analyserades totalt 41 cytologiska prov ur fyra kategorier med olika nivåer av dysplasi och slutdiagnos. Hos de två första kategorierna, A respektive B, analyserades prov från livmoderhalsbärare med stark dysplasi respektive benign dysplasi som sedan utvecklat skivepitelcancer (Tabell 2). Hos de två resterande kategorierna, C respektive D, analyserades prov från livmoderhalsbärare med benign dysplasi som inom tidsintervallet 0.4 – 2 år respektive 7 – 8 år hade utvecklat CIN-III (Tabell 3, Tabell 4).

Projektet genomfördes med i en tidsbegränsad studie vilket reducerade urvalet av prover. De fyra mest intressanta kategorierna valdes ur en prioriteringslista, där livmoderhalsbärarna hade benign eller dysplastisk cytologi före utveckling av cervixcancer eller dess förstadier. Även HPV-status beaktades.

Ett antal potentiella biomarkörer sammankopplade med cervixcancer har tidigare studerats i olika kombinationer. FAM19A4 och hsa-mir124-2 var en intressant kombination som i tidigare forskning (De Strooper et al., 2016) uppvisat koppling till cervixcancer och som kunde analyseras med de tillgängliga metoderna. För vidare forskning hade det varit intressant att kombinera FAM19A4 eller hsa-mir124-2 med andra möjliga biomarkörer i en mer omfattande studie. I studien valdes 20 prov bort av totalt 61 prov till följd av för låg koncentration dsDNA. Resterande test-steg var metodiskt genomförbara, dock något tidskrävande. Projektet hade bara tillgång till Rotor-Gene Q MDx-instrumentet en gång per vecka och andra instrument delades med klinisk verksamhet. En möjlig felkälla med studien var bisulfit-konversionen, då CT Conversion Reagent var väldigt ljuskänslig, värmekänsligt och därmed lätt nedbrytbart.

För att minimera felkällan borde provantalet anpassats till reagensvolymerna, vilket hade minskat ljus- och värmeexponeringen, då de kunde påverka metyleringskonversionen. QIA Sure Master Mix och QIA Sure Calibrator var likaså känsliga för samma exponering, samt ett relativt dyrt steg i metoden, vilket underströk betydelsen av korrekt utförande och krävde därför en tydlig och metodisk genomgång av handledande biomedicinsk analytiker.

Ett gynekologiskt cellprov och efterföljande analys involverar ett flertal medicinskt utbildade yrkeskategorier och provtagningsmetoden kräver en noggrann expertis av provtagning specifikt i området med cellförändringar. Analys av ett cellprov involverar många olika laborativa steg och är en subjektiv granskning som utförs av cytodiagnostiker. Metyleringsanalysen är en objektiv analys och förlitar sig inte på subjektiv bedömning av cellprov, vilket gör metoden både relativt enklare, mindre tidskrävande och på sikt sannolikt applicerbar på storskaligt automatiserad nivå. Det talar positivt för vidare prövning av metoden, åtminstone som ett komplement till nuvarande screening-diagnostik.

## **Resultatdiskussion**

Erhållna resultat visade att 20 (48.8%) respektive 7 (17.1%) av totalt 41 prov kunde bekräftas ha positivt utfall för hypermetylering i FAM19A4 respektive hsa-mir124-2 (Tabell 1). FAM19A4 var en mer lyckosam biomarkör eftersom drygt dubbla antalet prov visade positivt för FAM19A4-hypermetylering än för hsa-mir124-2. Orsaken ligger sannolikt i att FAM19A4 kan vara en känsligare metyleringsbiomarkör, utmärkande för specifikt CIN-III och cancer (Luttmer et al., 2016) än hsa-mir124-2. Sistnämnda biomarkören skulle potentiellt kunna vara känsligare för CIN-II, enligt Babion et al. (2019), vilket understryker vikten av att kombinera hsa-mir124-2 med FAM19A4 för en mer omfattande analys. Ett negativt FAM19A4/hsa-mir124-2-metyleringsprov visar därför sannolikt på en lägre långtids-cancerrisk.

Potentiellt skulle en kombination av andra metyleringsbiomarkörer i konstellation med FAM19A4 och hsa-mir124-2 ha en högre identifieringsfrekvens för HPV-positiva men för FAM19A4/hsa-mir124-2-hypermetyleringsnegativa cytologiska prov, som utvecklade cellförändringar. CADM1 och MAL är två kända biomarkörer som i tidigare studier har prövats med framgång (Meršaková et al., 2018) och skulle därför kunna förenas med FAM19A4 och hsa-mir124-2 i en mer omfattande analys.

Kategori D, benign cytologi med CIN-III inom 7–8 år, hade endast två prov positiva för hypermetylering och dessutom enbart för FAM19A4. Jämförs kategori D mot kategori A - stark dysplasi/CIN-III med skivepitelcancer - eller kategori B - benign cytologi med skivepitelcancer - kan en högre frekvens av identifierade hypermetyleringar i båda biomarkörer uttydas. I jämförelse mot frekvensen av hypermetyleringar i kategori C, benign cytologi med CIN-III inom 0.3–2 år, ses ett lika stort antal prov vara metylerade som icke-metylerade, vilket kan tolkas som att metyleringsfrekvensen ökar med tiden och är därför högre i kategori C än D.



Slutligen hade alla kategorier en ungefär lika jämn frekvens av HPV-positivitet vilket öppnar för tolkning att hypermetylering i tumörsuppressorgenerna, HPV-positivitet samt utveckling av dysplasi i cervix kan indikera ett samband.

Annan potentiell felkälla för de slutgiltigt dubbelt metyleringsnegativa proven var att mjukvaran Rotor-Gene AssayManager visade att endast en markör gav signal hos prov 7, 11, 16, 23, 36 och 40 men gav ändå slutresultat som negativt för hypermetylering. Sannolikt visade internkontrollen för dessa prov för låg signal. Prov 7 samt 16 visade ingen signal för hsa-mir124-2 och prov 11, 16, 23 samt 36 visade ingen signal för FAM19A4, trots att den andra biomarkören gav utslag, vilket då kan diskuteras om specifikt uteblivna biomarkören saknas eller inte ger utslag till följd av för låg frekvens, samt om andra biomarkörer hade gett en positiv signal istället. Annan möjlighet skulle kunna härledas till bisulfit-konversionssteget om buffertlösning blev kvar i filtrena efter centrifugering (QIASure Methylation, 2017) och därmed påverkade avläsning i Rotor-Gene AssayManager.

Nästan en tredjedel av proven (31,7%) hade en lägre DNA-koncentrationsinput, 50ng/μl, istället för 100ng/μl men inget direkt samband kunde identifieras mellan halva önskade DNA-koncentrationen och metyleringsfrekvens. Prov 6, 10, 11, 12, 15, 18, 24, 28, 32, 33, 35, 38 och 41 var antingen dubbelnegativa, varierande enkelpositiva eller dubbelpositiva för tumörsuppressorgenerna. Däremot identifierades att fyra av de fem HPV-negativa proverna, prov 13, 21, 36 och 39, var dubbelnegativa för hypermetylering i båda tumörsuppressorgenerna. Det femte HPV-negativa provet, prov 30, var däremot endast negativt för hsa-mir124-2, vilket sannolikt indikerar att CIN-III-cellförändringarna inte orsakats av en HPV-infektion. Prov 13 var det enda prov med slutdiagnos cancer där patientens ålder vid benign cytologi var högsta i studien, 67 år. Eftersom cytologiprovet var normalt och HPV-negativt samt dubbelnegativt för metylering kan det diskuteras om det har varit ett snabbt förlopp till cancer i detta fall, 6 år från normal cytologi till cancer, alternativt uppkomst av cancer i livmoder först, vilket är något vanligare för äldre och HPV-negativa patienter (Tjalma, 2018). Övervägande majoritet (87.8%) av proven var positiva för HPV medan 21 av de HPV-positiva proven (51.2%) var hypermetylerade.

Ett Fisher's Exakta Test bestämdes genom att exakt beräkna signifikansen av nollhypotesens avvikelse,  $P$ -värdet, och appliceras främst vid mindre provvolym. Signifikansnivån sattes till 95%,  $P$ -värde  $<0.05$  ansågs vara signifikant och erhållna  $P$ -värden kalkylerades och jämfördes mot varandra i korstabeller, varpå enbart kategori A-D ( $P=0.0007$ ) uppvisade statistisk signifikans. Kategori A och D kan i studien anses vara längst ifrån varandra i provtypsklass då de är motsatta i både tidsaspekt, CIN-utveckling och slutdiagnos.

Resterande  $p$ -värden uppfyllde inte statistisk signifikans, sannolikt till följd av för få prov samt för få grupper att jämföra mot varandra. Dessa faktorer till trots, visade studien ändå att metyleringsandelen var 100% hos CIN-III-cytologier som utvecklats till skivepitelcancer, 62.5%

hos benign cytologi som utvecklat skivepitelcancer, 50% hos benign cytologi som utvecklat CIN-III inom 24 månader samt 20% av benign cytologi hos kvinnor som efter 7-8 år utvecklat CIN-III. I en framtida, mer omfattande studie, skulle provantalet vara större för ett säkrare statistiskt resultat samt gärna involvera flera provtypsklasser för att ha fler kategorier och biomarkörer.

## **SLUTSATS**

Studien har lyckats producera resultat som går i linje med relevant metyleringsforskning för upptäckt av cellförändringar och cancer, samt har belyst fördelarna med att använda FAM19A4 och hsa-mir124-2 som användbara biomarkörer i samband med cellförändringar i cervix. Förhoppningen är att hypermetyleringsanalys ska bli ett väsentligt komplement till cytologisk granskning av gynekologisk cellprovtagning i cervixscreeningen i framtida gynekologisk sjukvård.

## REFERENSER

- Bhat, S., Kabekkodu, S., Varghese, V., Chakrabarty, S., Mallya, S., & Rotti, H., Pandey, D., Kushtagi, P., & Satyamoorthy, K. (2017). Aberrant gene-specific DNA methylation signature analysis in cervical cancer. *Tumor Biology*, 39(3), 101042831769457. <https://doi.org/10.1177/1010428317694573>
- Brianti, P., De Flammineis, E., & Mercuri, S.R. (2017). Review of HPV-related diseases and cancers. *The New Microbiologica*, 40(2), 80–85. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28368072/>
- Bu, Q., Wang, S., Ma, J., Zhou, X., Hu, G., & Deng, H., Sun, X., Hong, X., Wu, H., Zhang, L., & Luo, X. (2018). The clinical significance of FAM19A4 methylation in high-risk HPV-positive cervical samples for the detection of cervical (pre)cancer in Chinese women. *BMC Cancer*, 18(1), 1182. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4877-5>
- Chesson, H.W., Dunne, E.F., Hariri, S., & Markowitz, L.E. (2014). The Estimated Lifetime Probability of Acquiring Human Papillomavirus in the United States. *Sexually Transmitted Diseases* 41(11), 660–664. <https://doi.org/10.1097/olq.0000000000000193>
- Chircov, C., Grumezescu, A.M., & Holban, A.M. (2019). Magnetic Particles for Advanced Molecular Diagnosis. *Materials*, 12(13), 2158. <https://doi.org/10.3390/ma12132158>
- De Strooper. L.M.A., Verhoef. V.M.J., Berkhof. J., Hesselink. A.T., de Bruin. H.M.E, van Kemenade. F.J., Bosgraaf, R.P., Bekkersm R.L.M., Massuger, L.F.A.G., Meijer, C.J.L.M., & Heideman, D.A.M. (2016). Validation of the FAM19A4/mir124-2 DNA methylation test for both lavage- and brush-based self-samples to detect cervical (pre)cancer in HPV-positive women. *Gynecol Oncol*. 141(2), 341–347. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.02.012>
- Del Pino, M., Sierra, A., Marimon, L., Delgado, C.M., Rodriguez-Trujillo, A., Barnadas, E., Saco, A., Torné, Aureli., & Ordi, J. (2019). CADM1, MAL, and miR124 Promoter Methylation as Biomarkers of Transforming Cervical Intraepithelial Lesions. *Int J Mol Sci*, 20(9), 2262. <https://doi.org/10.3390/ijms20092262>
- Estécio, M.R.H., & Issa, J.P.J. (2011). Dissecting DNA hypermethylation in cancer. *FEBS letters*, 585(13), 2078–2086. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.001>
- Ge, Y., Christensen, P., Luna, E., Armylagos, D., Schwartz, M.R., & Mody, D.R. (2017). Performance of Aptima and Cobas HPV testing platforms in detecting high-grade cervical dysplasia and cancer. *Cancer Cytopathology*, 125(8), 652-657. <https://doi.org/10.1002/cncy.21875>
- Kim, H-Y. (2017). Statistical notes for clinical researchers: Chi-squared test and Fisher's exact test. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 42(2), 152. <https://doi.org/10.5395/rde.2017.42.2.152>
- Li, N., Franceschi, S., Howell-Jones, R., Snijders, P.J.F., & Clifford, G.M. (2010). Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *International Journal of Cancer*, 128(4), 927–935. <https://doi.org/10.1002/ijc.25396>
- Liu, Y.-M., Ni, L.-Q., Wang, S.-S., Lv, Q.-L., Chen, W.-J., & Ying, S.-P. (2018). Outcome and prognostic factors in cervical cancer patients treated with surgery and concurrent chemoradiotherapy: a retrospective study. *World journal of surgical oncology*, 16(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12957-017-1307-0>

- Lorincz, A.T. (2016). Virtues and Weaknesses of DNA Methylation as a Test for Cervical Cancer Prevention. *Acta cytologica*, 60(6), 501–512. <https://doi.org/10.1159/000450595>
- Luttmer R., De Strooper, L.M.A., Berkhof, J., Snijders, P.J.F., Dijkstra, M.G., Uijterwaal, M.H., Steenbergen, R.D.M., van Kemenade, F.J., Rozendaal, L., Helmerhorst, T.J.M., Verheijen, R.H.M., ter Harmsel, W.A., Van Baal, W.M., Graziosi, P.G.C., Quint, W.G.V., Heideman, D.A.M., & Meijer, C.J.L.M. (2015). Comparing the performance of FAM19A4 methylation analysis, cytology and HPV16/18 genotyping for the detection of cervical (pre)cancer in highrisk HPV-positive women of a gynecologic outpatient population (COMETH study). *Int J Cancer*, 138(4), 992–1002. <https://doi.org/10.1002/ijc.29824>
- Luttmer R., De Strooper, L.M.A., Dijkstra, M.G., Berkhof, J., Snijders, P.J.F., Steenbergen, R.D.M., van Kemenade, F.J., Rozendaal, L., Helmerhorst, T.J.M., Verheijen, R.H.M., ter Harmsel, W.A., Van Baal, W.M., Graziosi, P.G.C., Quint, W.G.V., Spruijt, J.W.M., van Dijken, D.K.E., Heideman, D.A.M., & Meijer, C.J.L.M. (2016). FAM19A4 methylation analysis in self-samples for comparing with cervical scrapes for detecting cervical (pre)cancer in HPV-positive women. *Br J Cancer*, 115(5), 579-87. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.200>
- Mello, V., & Sundstrom, R.K. (2020). *Cancer, Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN)*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544371/>
- Meršaková, S., Holubeková, V., Grendár, M., Višňovský, J., Ňachajová, M., Kalman, M., Kúdela, E., Žúbor, P., Bielik, T., Lasabová, Z., & Danko, J. (2018). Methylation of CADM1 and MAL together with HPV status in cytological cervical specimens serves an important role in the progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Oncology Letters*. 16(6), 7166–7174. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9505>
- Oltra, S.S., Peña-Chilet, M., Vidal-Tomas, V., Flower, K., Martinez, M.T., Alonso, E., Burgues, O., Lluch, A., Flanagan, J.M., & Ribas, G. (2018). Methylation deregulation of miRNA promoters identifies miR124-2 as a survival biomarker in Breast Cancer in very young women. *Sci Rep*, 8(1), 14373. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32393-3>
- PSS. (2018). *MagDEA Dx SV Instructions for use (handbook) Version 1.6 (November 26, 2018)*. Hämtad 2019 November 5 från [https://www.pss.co.jp/product/manual-pdf/MagDEA\\_Dx\\_SV-ifu-sv-v1.6.pdf](https://www.pss.co.jp/product/manual-pdf/MagDEA_Dx_SV-ifu-sv-v1.6.pdf)
- QIAGEN. (2017). *QIASure Methylation Test Instructions for use (handbook) Version 1 (March 2017)*. Hämtad 2019 November 5 från <https://www.qiagen.com/re/resources/resourcedetail?id=d4851ddc-405d-4d93-be9a-a343c8576d64&lang=en/>
- Rai, B., Bansal, A., & Singh, M. (2016). Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 6(2), 84. <https://doi.org/10.4103/2229-516X.179027>
- Socialstyrelsen. (2019) “Statistikdatabasen för cancer”, [Cervix uteri för 2018]. Hämtad 2020 April 30 från <https://www.socialstyrelsen.se/statistik-och-data/statistik/statistikamnen/cancer/>
- Stratton, K.L., & Culkin D.J. (2016). A Contemporary Review of HPV and Penile Cancer. *Cancer Network*, 30(3). Hämtad 2019 November 4 från <https://www.cancernetwork.com/oncology-journal/contemporary-review-hpv-and-penile-cancer/>
- ThermoFisher. (2018). *User Guide: Qubit 4 Fluorometer (C.O April 2018)*. Hämtad 2019 November 7 från

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33226?SID=srch-srp-Q33226#/Q33226?SID=srch-srp-Q33226/>

Tjalma, W.A.A. (2018). HPV negative cervical cancers and primary HPV screening. *Facts Views Vis Obgyn.* (2018), 10:107–13. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6516188/>

Zymo Research. (2018). Protocol: Instruction Manual for EZ DNA Methylation Kit Catalog Nos. D5001 & D5002 (July 2018). Hämtad 2019 November 7 från <https://www.zymoresearch.com/collections/ez-dna-methylation-kits/products/ez-dna-methylation-kit/>

# APPENDIX

*Bilaga 1. DNA-koncentrationsbestämning med Qubit fluorometer.*

<i>Provnummer</i>	<i>Koncentrationskvantifiering (ng/μl)</i>	<i>Koncentration för 100ng dsDNA</i>	<i>Koncentration för 50ng dsDNA</i>
1	4.58	2.50	
2	8.82	21.83	
3	10.7	11.33	
4	11.8	9.34	
5	7.52	8.47	
6*	7.52		25.64
7	32.4	13.29	
8	4.88	3.08	
9	1.61	20.49	
10*	2.01		31.00
11*	1.11		24.87
12*	7.48		45.04
13	40.0	13.36	
14	5.1	19.60	
15*	1.74		28.73
16	8.76	11.41	
17	8.52	11.73	
18*	2.44		20.49
19	4.38	22.83	
20	8.76	11.41	
21	7.16	13.96	
22	9.7	10.30	
23	3.76	26.59	
24*	1.89		26.45
25	7.26	13.77	
26	14.9	6.71	
27	8.08	12.37	
28*	2.40		20.83
29	3.58	27.93	
30	34.8	2.87	
31	30.8	3.24	
32*	1.62		30.86
33*	1.86		26.88
34	8.68	11.52	
35*	1.56		32.05
36	7.2	13.88	
37	10.1	9.90	

38*	2.08		24.03
39	13.9	7.194	
40	14.6	6.84	
41*	2.22		22.52

---

\*Koncentration Totalt 50ng/ $\mu$ L istället för 100ng/ $\mu$ L tillsatt till bisulfit-konversion.