

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Maria Vares

**HPV detekteerimine kliinilistest proovidest reaalaaja PCR meetodil
GP5+/GP6+ praimeritega**

Magistritöö

Juhendaja Prof. Andres Metspalu, M.D., Ph.D.

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Inimese papilloomiviirus	7
1.2. Inimese papilloomiviiruse klassifikatsioon	8
1.3. Emakakaelavähk	9
1.4. HPV levimus	9
1.5. HPV elutsükel	10
1.6. HPV poolt kodeeritud valgud	11
1.6.1. E1	11
1.6.2. E2	12
1.6.3. E4	12
1.6.4. E5	12
1.6.5. E6	13
1.6.6. E7	14
1.6.7. L1	15
1.6.8. L2	15
1.7. HPV testimise ajalugu	16
1.8. HPV DNA detekteerimine	17
1.8.1. HPV DNA analüüsimiseks kasutatav proovimaterjal	17
1.8.2. Signaali amplifikatsioonil põhinevad meetodid	18
1.8.3. Sihtmärgi amplifikatsioonil põhinevad meetodid	19
1.9. Tsütoloogia	20
1.10. Reaalaja PCR	21

1.11. HPV detekteerimine Eestis	22
1.12. Kõrge riski HPV-ga nakatunud patsientide ravimine	22
2. EKSPERIMENTAALOSA	24
2.1. Töö eesmärgid.....	24
2.2. Materjal ja meetodika	24
2.2.1. Kliinilised proovid.....	24
2.2.2. Plasmiidsed kontrollid.....	25
2.2.3. Kasutatud praimerid	25
2.2.4. Reaalaja PCR.....	27
2.2.5. Reaalaja PCR-i tingimuste optimeerimine	27
2.2.6. Konventsionaalne PCR	28
2.3. Tulemused.....	30
2.3.1. DNA proovide kontsentratsioon ja kvaliteet.....	30
2.3.2. Lääne-Tallinna Keskhaiplast ja Pärnu Haiplast pärit proovide reaalaja PCR-i tulemused	31
2.3.3. Reaalaja PCR-i tingimuste optimeerimise tulemused.....	34
2.3.4. Konventsionaalse PCR-i tulemused.....	35
2.4. Arutelu	42
KOKKUVÕTE	46
SUMMARY	47
TÄNUAVALDUSED.....	48
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU	49
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	65
LIHTLITSENTS.....	66

KASUTATUD LÜHENDID

ASCUS – kindlaks määramata tähendusega atüüpilised lameepiteeli rakud (*atypical squamous cells of undetermined significance*)

CDK – tsükliinist sõltuv kinaas (*cyclin-dependent kinase*)

CFS – kõrge genoomse ebastabiilsusega regioon (*common fragile site*)

CIN – emakakaela intraepiteliaalne neoplaasia (*cervical intraepithelial neoplasia*)

CR – konserveerunud regioon (*conserved region*)

EIA – ensüümne immunoanalüüs (*enzyme immunoassay*)

FDA – Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Ravimiamet (*United States Food and Drug Administration*)

HC2 – *Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test*

HPV – inimese papilloomiviirus (*human papillomavirus*)

hrHPV – kõrge riski inimese papilloomiviirus (*high-risk human papillomavirus*)

hTERT – inimese telomeraasi pöördtranskriptaas (*human telomerase reverse transcriptase*)

ISH – *in situ* hübridisatsioon (*in situ hybridization*)

LCR – pikk kontrollpiirkond (*long control region*)

LEEP – diatermiline ekstsisioon linguga (*loop electrosurgical excision procedure*)

LXCXE motiiv – retinoblastoomi valke siduv motiiv (Leu-X-Cys-X-Glu)

ORF – avatud lugemisraam (*open reading frame*)

RFLP – restriksioonifragmentide pikkuspolümorfism (*restriction fragment length polymorphism*)

T_m – kaheaahelalise nukleiinhappe dissotsiatsiooni- ehk sulamistemperatuur

URR – „ülespoole“ paiknev regulatsiooniala (*upstream regulatory region*)

VLP – viirusesarnane osake (*virus-like particle*)

SISSEJUHATUS

Inimese papilloomiviirus (HPV) on enamlevinud suguelundkonna viirusnakkus. Enamik seksuaalselt aktiivseid mehi ja naisi nakatuvad HPV-ga mingil eluhetkel. On tuvastatud ligikaudu 40 erinevat HPV tüüpi, mis nakatavad emakakaela piirkonda¹. Vastavalt HPV tüüpide võimele tekitada emakakaelavähki, jagatakse need kõrge ja madala riski HPV genotüüpideks. Madala riski HPV genotüübid võivad põhjustada kondüloome ning väikesi rakulisi muutusi emakakaelas. Kõrge riski HPV genotüübid on emakakaelavähi peamiseks põhjustajaks².

Emakakaelavähk on neljas kõige enam levinud vähktõbi naiste seas üle maailma³. Igal aastal diagnoositakse emakakaelavähk ligikaudu 500 000 naisel üle maailma (Haie-Meder jt., 2010). Peaaegu kõikide emakakaelavähi juhtude korral on selle põhjustajaks HPV infektsioon³. Seetõttu on HPV testimine ning nakkuse õigeaegne avastamine väga oluline.

Üheks enamkasutatavaks HPV tuvastamise meetodiks on konsensuspraimeritel põhinev PCR reaktsioon. Konsensuspraimerid võimaldavad ühe PCR reaktsiooniga tuvastada paljusid erinevaid HPV tüüpe, kuid ei ole võimelised neid genotüpiseerima. Sageli kasutatakse PCR-i läbiviimisel konsensuspraimerite paari GP5+/GP6+ (Hubbard, 2003). Pärast konsensuspraimeritega teostatud PCR reaktsiooni abil HPV olemasolu tuvastamist, on võimalik HPV genotüüpe identifitseerida erinevate meetoditega, näiteks kasutades genotüübispetsiifilisi praimereid (Coser jt., 2011).

Mitmetes haiglates tarvitatakse HPV tuvastamiseks kommertsiaalseid teste. Lääne-Tallinna Keskhaiglas kasutatakse HPV genotüpiseerimiseks *HPV High Risk Typing Real-TM Kit*-i (Sacace Biotechnologies). Kuna haiglas testitavate proovide hulgas leidub palju negatiivseid proove, on kõikide proovide testimine antud *kit*-iga kulukas. Seetõttu tekkis Lääne-Tallinna Keskhaiglal huvi testi järele, mis võimaldaks proovidest mittekulukalt ning vähetöömahukalt tuvastada HPV olemasolu, kasutades reaalaja PCR-i meetodit. Seejärel kasutatakse kommertsiaalset *kit*-i vaid eelnevas testis HPV suhtes positiivse tulemuse andnud proovide genotüpiseerimiseks.

Käesolev töö keskendub HPV tuvastamisele kliinilistest proovidest reaalaja PCR meetodil, kasutades GP5+/GP6+ konsensuspraimereid.

¹ <http://www.cdc.gov/std/hpv/stdfact-hpv.htm>

² http://www.cdc.gov/cancer/hpv/basic_info/

³ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>

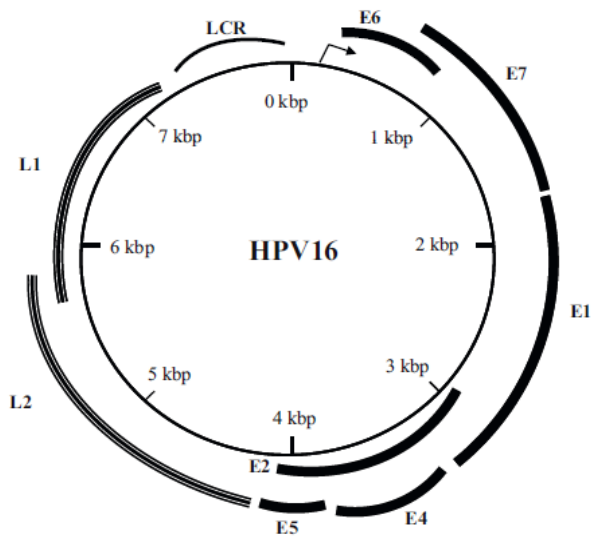
Märksõnad: inimese papilloomiviirus, emakakaelavähk, kliinilised proovid, konsensuspraimerid, reaalaaja PCR

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Inimese papilloomiviirus

Inimese papilloomiviirus (HPV) kuulub *Papillomaviridae* sugukonda. *Papillomaviridae* sugukond koosneb 29 perekonnast, kuhu kuulub 189 papilloomiviiruse tüüpi, mis on isoleeritud nii inimesest (120 tüüpi), teistest imetajatest, lindudest kui ka roomajatest (vastavalt 64, 3 ja 2 tüüpi) (Bernard jt., 2010).

HPV on kestata viirus, mille kaksikahelaline tsirkulaarne DNA paikneb 72 kapsomeerist koosnevas ikosaeedrilises kapsiidis (Jo ja Kim, 2005). Kõikide HPV tüüpide ülesehitus on üldiselt ühesugune. HPV kapsiidi läbimõõt on 45 - 55 nm. Genoom koosneb ühest kaksikahelalisest tsirkulaarsest 7200 – 8000 aluspaari suurusest DNA molekulist. Genoomi saab jagada kolmeks piirkonnaks (Castro jt., 2006). Esimene regioon on 400 - 1000 aluspaari suurune mittekodeeriv ala (*upstream regulatory region* – URR, ka *long control region* – LCR). See piirkond sisaldab p97 promootorit koos võimendaja- ja vaigistajajärjestustega, mis reguleerivad DNA replikatsiooni (Apt jt., 1996). Teine piirkond on varajane (*early* - E) regioon, mis sisaldab varajasi lugemisraame (ORF), mis kodeerivad mittestruktuuralseid regulaatorvalke E1, E2, E4, E5, E6 ja E7. Need valgud osalevad viiruse replikatsioonis, transkriptsioonis, transformatsioonis, adaptatsioonis ja onkogeneesis. Kolmas ala on hiline (*late* - L) piirkond, mis kodeerib peamist kapsiidivalku L1 ja väikest kapsiidivalku L2. Need valgud on struktuuralsed valgud, mis moodustavad ikosaeedrilise viirusekapsiidi (Baker jt., 1991; Sapp jt., 1995). URR piirkond asub varajase ja hilise regiooni vahel (joonis 1) (Longworth ja Laimins, 2004).



Joonis 1. HPV-16 kaksikahelaline tsirkulaarne genoom (Ganguly ja Parihar, 2009).

1.2. Inimese papilloomiviiruse klassifikatsioon

On avastatud umbes 200 erinevat HPV tüüpi, millest üle 40 nakatavad emakakaela piirkonda⁴. Iga HPV genotüüp käitub kui iseseisev infektsioon erinevate kartsinogeensete riskidega. Toetudes epidemioloogilisele klassifikatsioonile, mis põhineb HPV riskil põhjustada emakakaelavähki, jagatakse HPV-d madala ja kõrge riski genotüüpideks (Burd, 2003). Kõrge ja madala riski HPV tüübid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Inimese papilloomiviiruse genotüüpide klassifikatsioon kartsinogeensuse alusel.

Kõrge risk	HPV tüübid
Kartsinogeenne	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Tõenäoline kartsinogeensus	68
Võimalik kartsinogeensus	26, 53, 66, 67, 70, 73, 82
Madal risk	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 89

(Erickson jt., 2013)

⁴ <https://www.nsu.govt.nz/national-cervical-screening-programme/hpv-and-cervical-cancer>

1.3. Emakakaelavähk

Emakakaelavähk on neljandal kohal kõige sagedamatest vähktõvedest naiste seas üle maailma. Hinnanguliselt sureb emakakaelavähi tagajärjel igal aastal üle 270 000 naise. Surmadest enam kui 85% leiab aset vähem arenenud piirkondades³. 2012. aastal diagnoositi emakakaelavähk 528 000 naisel üle maailma⁵. Eestis diagnoositakse igal aastal emakakaelavähk umbes 200 naisel⁶.

Nagu eespool kirjeldatud, on emakakaelavähi tekke peamiseks põhjustajaks nakatumine kõrge riski HPV-ga. HPV-16 ja -18 on kaks kõige enam levinud kõrge riski genotüüpi, põhjustades üle maailma ligi 70% kõikidest emakakaelavähkidest (Mammas jt., 2014). HPV-16 on kõige kartsinogeensem HPV genotüüp, mis põhjustab peamiselt lamerakk-kartsinoomi. HPV-18 on peamiselt adenokartsinoomi põhjustajaks. Adenokartsinoom on vähk, mis saab alguse emakakaelakanali limaskestast ning mida avastatakse harvemini, kuid on agressiivsem (Bosch jt., 2008). HPV tüübid 31, 33, 45, 52 ja 58 on umbes 20% emakakaelavähkide põhjustajaks⁷. Emakakaela kartsinogenees võib tekkida ka infektsioonist mitme kõrge riski tüübiga, mis toimivad sünergiliselt (Trottier jt., 2006).

Tänapäeval on kommertsiaalselt saadaval kolm HPV vaktsiini: kahevalentne Cervarix (HPV tüübid 16 ja 18), neljavalentne Gardasil (HPV tüübid 6, 11, 16 ja 18) ning üheksavalentne Gardasil 9 (HPV tüübid 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 ja 58)⁷ (Forinash jt., 2011). Vaktsineerimine HPV-16 ja HPV-18 vastu võib potentsiaalselt ära hoida rohkem kui kaks kolmandikku emakakaelavähkidest üle maailma (Abreu jt., 2012).

Lisaks emakakaelavähile võib HPV olla ka tupe-, häbeme-, peenise-, anal-, keelepõhja-, mandli- ja suuneeluvähi põhjustajaks². Peale selle on HPV olemasolu tuvastatud ka rinna- ja kopsuvähi korral (Mammas jt., 2011).

1.4. HPV levimus

HPV on kõige levinum suguteede viiruslik infektsioon. Enamik seksuaalselt aktiivseid naisi ja mehi nakatub HPV-ga mingil eluhetkel ning mõned võivad nakatuda korduvalt. HPV edasikandumiseks pole vaja penetratiivset vahekorda, vaid viirus kandub üle ka nahk - naha kontakti teel³. Kuna HPV-ga nakatumine toimub kõige sagedamini genitaalsete kontakti tagajärjel, kasvab nakatumise risk naise või tema partneri seksuaalpartnerite arvuga (McGraw ja Ferrante,

⁵ <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/cervical-cancer-statistics>

⁶ <http://www.tai.ee/tegevused/registrid/vahiregister/>

⁷ <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm426485.htm>

2014). Genitaalsel HPV infektsioonil pole sageli sümptomeid (Parkin jt., 2002). Nakatumise tippaeg nii meeste kui naiste puhul on peagi pärast seksuaalelu alustamist³. HPV infektsiooni püsivuse ja kulgemise üks potentsiaalne riskifaktor võib olla seotud HPV-de genoomse mitmekesisusega. Erinevad HPV variandid on mitmekesised oma bioloogiliste, molekulaarsete ja keemiliste omaduste poolest ning seetõttu võib see põhjustada olulisi erinevusi haiguse kulus ja patogeensuses. Vähem kui 10% uutest infektsioonidest kujuneb 5 – 10 aasta jooksul välja püsiv HPV infektsioon ja intraepiteliaalne neoplaasia (*cervical intraepithelial neoplasia* – CIN). Umbes 90% kõrge riski HPV infektsioonidest kõrvaldatakse naise immuunsüsteemi poolt 16 kuu jooksul (Belinson ja Belsinson, 2010). Invasiivne vähk tekib mitmete aastate, isegi aastakümnete jooksul ainult väikesel osal naistest, kellel on intraepiteliaalne neoplaasia, mille riski kõrgpunkt on vanuses 35-55 aastat (Burd, 2003; Castellsagué, 2008).

1.5. HPV elutsükkel

HPV elutsükkel on tihedalt seotud epiteeliale diferentseerumisega. Normaalses inimese lamerakulistest epiteelides on ainult basaalkihtides olevad rakud võimelised aktiivselt jagunema. Pärast basaalkihtides jagunemist migreerub üks tütarakkudest ülespoole ning läbib diferentseerumise, samas kui teine tütarakk jääb basaalkihti. Pärast basaalkihist lahkumist väljuvad normaalsed rakud rakutsüklist, alustavad diferentseerumist ning kõrge molekulmassiga keratiinide sünteesimist (Watt, 1998). Diferentseerumise arenedes akumulerevad keratiinid rakus ning tuumaümbris laguneb nii, et diferentseerunud epiteeli kõrgemates kihtides lõpetavad rakud funktsioneerimise ning eksisteerivad kui keratiiniga täidetud kotikesed (Stubenrauch ja Laimins, 1999).

Kõige tõenäolisemalt siseneb HPV epiteeli basaalkihti mikrohaavade kaudu ning nakatab esmalt basaalkihi rakke. Pärast tuuma sisenemist aktiveeritakse varajane HPV promootor ning algab varajaste geenide ekspressioon. Nakatunud rakkudes toimub vähesel tasemel viiruse DNA süntees, mille tulemusena tõuseb viirusgenoomide arv umbes 50 - 100 episomaalse koopiani raku kohta. Kui basaalarakud jagunevad, replitseeruvad HPV episoomid ning jaotuvad ühtlaselt tütarakkude vahel. Üks infekteerunud tütarakkudest migreerub epiteeli ülemistesse kihtidesse ning alustab diferentseerumist, kuid jätkab ka rakutsükli läbimist. Kui HPV-ga nakatunud rakud diferentseeruvad, aktiveeritakse hiline promootor ning hakatakse tootma hiliste geenideprodukte. See initsieerib HPV elutsükli vegetatiivse faasi, mis viib viiruse genoomi kõrgetasemelise

amplifikatsioonini. Epiteeli kõige ülemistes kihtides pakitakse viiruse DNA kapsiididesse ning virioonid vabanevad rakust. Kuna HPV replikatsioon on suuresti sõltuv peremeesraku replikatsioonisüsteemist, peab ülemistes epiteelikihtides säilima puutumatus nakatunud rakkude suutlikkus sünteesida DNA-d. Seepärast, peamiselt tänu E6 ja E7 valkudele, ei välju HPV-ga nakatunud rakud rakutsüklist (Hebner ja Laimins, 2006).

Valkudel E6 ja E7 on suur roll HPV poolt indutseeritud emakakaela kartsinoomi tekkimises. Viiruse normaalse elutsükli jooksul reguleerib E6 ja E7 ekspressiooni transkriptsionaalselt valk E2 (Bouvard, 1994). Vähi korral aga integreerub viiruse genoom sageli peremeesraku genoomselle DNA-sse (Corden, 1999; Jeon jt., 1995). Tõenäoliselt toimub integratsioon peremees-DNA juhuslikesse saitidesse, kuid integratsioon võib sagedamini aset leida ka *common fragile site*'ides (CFS), mis on kõrge genoomse ebastabiilsusega regioonid, mida on seostatud mitmete pahaloomuliste kasvajatega (Thorland jt., 2003). Integratsiooni kutsub tavaliselt esile see, et E2 avatud lugemisraam on viiruse genoomis häiritud ning seetõttu elimineeritakse E2-vahendatud varajase promootori transkriptsionaalne kontroll, mille tulemuseks on E6 ja E7 onkovalkude suurenenud produktsioon (Howley, 1996; Hebner ja Laimins, 2006).

1.6. HPV poolt kodeeritud valgud

Varajaste ja hiliste geenide transkriptsiooni kontrollib mittekodeeriv ala. Viirusvalke transleeritakse polütsistronselt mRNA-lt, mis sisaldab kattuvaid lugemisraame (Jo ja Kim, 2005).

1.6.1. E1

Pärast peremeesrakku sisenemist ekspresseeritakse esmalt E1 ja E2 geene ning kodeeritakse valke, mis on vajalikud viiruse DNA replikatsiooniks (Motoyama jt., 2004). E1 toimib kui ATP-sõltuv helikaas, mis katalüüsib DNA lahtiharutamist (Masterson jt., 1998). E1 initsieerib viiruse DNA replikatsiooni seondudes AT-rikkale järjestusele viiruse replikatsiooni alguspunktil (*origin*) varajase transkriptsiooni stardisaidi lähedal. E1 seondumine DNA-ga on väga nõrk. (Frattini ja Laimins, 1994; Frattini ja Laimins, 1994; Kuo jt., 1994; Lusky jt., 1993; Mohr jt., 1990; Sanders ja Stenlund, 2000; Sedman jt., 1997). E1 ja E2 valgud moodustavad kompleksi, mis seondub viiruse replikatsiooni alguspunktile ning kasutab replikatsiooniks peremehe polümeraase (Longworth ja Laimins, 2004).

1.6.2. E2

E2 valk reguleerib viiruse promootori abiga varajaste geenide transkriptsiooni. Kui E2 tase on madal, seondub see promootoriga ja indutseerib transkriptsiooni. Kui E2 tase on kõrge, siis repressseerib see varajaste geenide, kaasa arvatud geenide E6 ja E7, transkriptsiooni, blokeerides peremehe faktorite seondumise viiruspromootoriga (Longworth ja Laimins, 2004). E2 ekspressiooni kadumine põhjustab rakulise proliferatsiooni suurenemist, mida indutseerivad valgud E6 ja E7, ning mis viib emakakaela kartsinoomi tekkeni (Pett jt., 2004).

1.6.3. E4

Papilloomiviiruse E4 avatud lugemisraam paikneb E2 lugemisraamis. E4 valke ekspresseeritakse enne kapsiidivalke L1 ja L2 (Doorbar, 2013).

Kuigi erinevate HPV tüüpide E4 valgud erinevad oma primaarse aminohappelise järjestuse poolest, jagavad nad äratuntavat modulaarset organisatsiooni ning ekspressioonimustrit, mis võivad olla konserveerunud funktsioonide ja regulatsioonide aluseks. Kokkupanek kõrgema astme multimeerideks ja raku proliferatsiooni mahasurumine on omased kõigile uuritud E4 valkudele. Arvatakse, et E4 võime katkestada rakulist keratiinivõrgustikku ning sarvestunud kesta moodustumist võib aidata kaasa viiruse vabanemisele ja/või transmissioonile (Bryan ja Brown, 2000, 2001). On näidatud, et mitmete HPV tüüpide E4 valgud inhibeerivad raku proliferatsiooni G2 faasis (Davy ja Doorbar, 2007). Samuti aitavad E4 valgud kaasa genoomi amplifikatsioonile ning võimalik, et selle tagajärjel ka viiruse sünteesile (Peh jt., 2004; Nakahara jt., 2005; Wilson jt., 2005).

1.6.4. E5

Kõik HPV tüübid ei kodeeri E5 valku. Mitmed avatud lugemisraamid erinevates HPV tüüpides, mis peaksid kodeerima E5 valku, on tõenäoliselt mittetoimivad (Bravo ja Alonso, 2004).

Kõrge riski HPV E5 valgud on konserveerunud ~80 aminohappe suurused hüdrofoobsed valgud, millel on transformeerimisaktiivsus nakatatud rakukultuurides ja loomades. HPV-16 E5 valguga on läbi viidud laialdasi analüüse, kuid selle bioloogilise aktiivsuse molekulaarsed alused pole veel hästi mõistetud (Bravo ja Alonso, 2004).

Madala riski HPV-d kodeerivad kahte E5 valku - E5A ja E5B. Need E5 valgud on HPV-16 E5 valguga ainult kaudselt seotud ning mõndades uuringutes on näidatud E5A nõrka

transformeerimisaktiivsust. Toetudes konserveerunud E5 geeni olemasolule mitmetes HPV tüüpides, on tõenäoline, et valgul E5 on märkimisväärne roll viiruse replikatiivses elutsüklis. Kuna HPV E5 geenid on evolutsioneerunud koos peamiste HPV onkogeenidega E6 ja E7, võivad E5 valgud anda panuse inimese kartsinogeneesile (Bravo ja Alonso, 2004; Schiffman jt., 2005).

1.6.5. E6

Kõrge riski HPV E6 valgud koosnevad umbes 150 aminohappest ning sisaldavad kahte tsinksõrme motiivi (Cole ja Danos, 1987; Barbosa jt., 1989). Kõrge riski HPV-16 E6 valgul on võime indutseerida tuumorsupressorvalgu p53 degradatsiooni läbi ubikvintiinraja. p53 on transkriptsioonifaktor, mis reguleerib rakutsükli regulaatoreid, DNA parandusmehhanisme ja apoptoosi kodeerivate geenide ekspressiooni. Rakulise stressi korral, nagu hüpoksia või DNA kahjustus, viib p53 läbi rakutsükli peatamise või apoptoosi, et tagada raku genoomi terviklikkus. Blokeerides rakutsükli, hoiab p53 ära kahjustunud DNA replikatsiooni ning võimaldab rakul kahjustuse enne S-faasi parandada. Kui DNA kahjustus on liiga suur, võib p53 suunata raku apoptoosi, hoides sellega ära potentsiaalselt transformeerunud järglaskonna teket (Huibregtse jt., 1991; Scheffner jt., 1990; Scheffner jt., 1993). Kõrge riski HPV E6 seondub valgule p53 ning moodustab trimeerse kompleksi rakulise ubikvintiinligaasiga E6AP (Werness jt., 1990; Huibregtse jt., 1991; Scheffner jt., 1990). E6/E6AP kompleks seondub p53 tsentraalse regiooniga, mis ubikvineeritakse ja sihtmärgistatakse proteasoomidele (Huibregtse jt., 1991; Scheffner jt., 1990; Scheffner jt., 1993). p53 inaktivatsioon seab ohtu replitseeritava DNA terviklikkuse ja põhjustab DNA-s kahjustusi ning kromosomaalset ebastabiilsust (Havre jt., 1995; Kessis jt., 1996; Schaeffer jt., 2004; Thomas ja Laimins, 1998). Nende abnormaalsuste tagajärjeks võib olla raku proliferatsioon ning kasvaja areng (Foster jt., 1994; Cheng jt., 2007; Hebner jt., 2007; Cooper jt., 2007). Madala riski HPV E6 onkovalgud võivad samuti seonduda valguga p53, kuid väga väikese afiinsusega ning nad ei põhjusta valgu p53 degradeerimist (Slebos jt., 1995).

Kõrge riski E6 valgu oluline funktsioon on ka telomeraasi aktivatsioon nakatunud rakkudes. Normaalses rakkudes põhjustab DNA replikatsiooni korduv läbiviimine telomeeride lühenemist, mis lõpuks viib kromosomaalse ebastabiilsuseni ja rakulise vananemiseni. Kõrge riski HPV E6 valgud suurendavad telomeeride pikkust epiteelirakkudes, aktiveerides telomeraasi ensüümi katalüütilise subühiku hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) (Klingelutz jt., 1996; Stoppler jt., 1997; Veldman jt., 2001; Gewin ja Galloway, 2001; Oh jt., 2001). Kõrge riski HPV tüübid kasutavad enam kui ühte mehhanismi hTERT transkriptsiooni aktiveerimiseks (Veldman

jt., 2003). On tõenäoline, et see HPV-vahendatud hTERT transkriptsionaalne aktivatsioon ei sõltu E6/E6AP interaktsioonist. Selle mudeli kinnitamiseks on näidatud, et HPV-16 E6 mutandid, mis on puuduliku E6AP seondumise võimega, on siiski võimelised stimuleerima hTERT ekspressiooni (Sekaric jt., 2008). Lisaks epiteelirakkude elu pikendamisele, mis on vajalik viiruse järglaskonna tootmiseks, mõjutab see efekt ka HPV-indutseeritud kartsinogeneesi, kuna hTERT üleekspressioon koos E7 ekspressiooniga on piisav, et immortaliseerida inimese primaarseid keratinotsüüte (Kiyono jt., 1998).

1.6.6. E7

E7 on umbes 100 aminohappe suurune happeline fosfoproteiin, mis sarnaselt valgule E6 sisaldab tsinki siduvaid motiive. E7 on struktuurselt ja funktsionaalselt seotud adenoviiruse E1A onkovaaluga ning sellele põhinedes jagatakse E7 kolmeks konserveerunud regiooniks (CR1-3). Mitmete E7 valkude CR2 regioon sisaldab fosforüleerimissaiti kaseiinkinaas II jaoks. Sama regioon sisaldab ka LXCXE motiivi, mis vahendab interaktsiooni kasvaja supressorgeeni produkti retinoblastoomi (pRb1) ja sellega seotud valkude, p107 ja p130, vahel. Kõik kolm rakuvalku on seotud rakutsükli kontrollimisega (Huh jt., 2007). pRb valk on aktiivne hüpofosforüleeritud olekus ning seondub E2F transkriptsioonifaktoritega, et hoida ära raku sisenemist S-faasi. Normaalse rakutsükli jooksul pRb fosforüleeritakse, mis põhjustab pRb dissotsiatsiooni E2F küljest, lubades seega normaalset S-faasi kulgemist (Munger ja Howley, 2002; Jo ja Kim, 2005). HPV E7 seondub hüpofosforüleeritud pRb-le, takistades selle interaktsiooni E2F-ga. Seega rakkudes, mis üleekspressivad HPV E7 valku, puudub kontrollpunkt G1/S üleminekul ning rakud jätkavad rakutsükli läbimist, mis viib kontrollimatu rakulise proliferatsioonini (Dyson, 1998; Jo ja Kim, 2005). Kõrge riski HPV E7 valgu seondumine valguga pRb viib pRb proteasoomse degradatsioonini (Huh jt., 2007).

E7 võime seonduda pRb-le ja seda lagundada on vahendatud kahe erineva regiooni poolt. LXCXE motiiv, mis on vajalik pRb sidumiseks asub E7 CR2 regioonis ning pRb lagundamiseks vajalikud faktorid asuvad N-terminuses (Jones jt., 1997; Huang jt., 1993; Gonzalez jt., 2001; Phelps jt., 1992). pRb degradatsioon on iseloomulik peamiselt kõrge riski HPV E7 valkudele, viidates sellele, et sellel võib olla roll emakakaela kartsinogeneesis (Schmitt jt., 1994).

Teised kaks pRb-ga seotud valku, p107 ja p130, on osa korepressorkompleksidest, mis sisaldavad E2F perekonna teisi liikmeid ja histooni deatsetülaas-ensüüme (Cobrinik, 2005; Dimova ja Dyson, 2005). Need kompleksid seonduvad spetsiifilistele E2F elementidele, põhjustades

geeniekspressiooni inhibitsiooni. On näidatud, et HPV-16 E7 destabiliseerib p130, tõenäoliselt muutes E2F komplekside inhibitoorseid funktsioone (Zhang jt., 2006; Dimova ja Dyson, 2005). Lisaks võimele sihtmärgistada E2F komplekse, dereguleerib E7 rakutsükli CDK inhibiitorite p21WAF1/CIP1 ja p27KIP1 otsese seondumisega, neutraliseerides nende inhibitoorset mõju rakutsüklile (Funk jt., 1997; Jones jt., 1997; Zerfaß-Thome jt., 1996).

1.6.7. L1

Papilloomiviiruse viriooni ikosaeedrilise pinna moodustavad 360 L1 valgu molekuli, mis on organiseeritud 72 pentameeriks (Baker jt., 1991). Papilloomiviiruse peamine kapsiidivalk L1 on umbes 500 aminohappe suurune valk, millel on võime ennast iseseisvalt kokkupakkida viirusesarnasteks partikliteks (*virus-like particle* – VLP). VLP-d on morfoloogiliselt sarnased ehtsate HPV virioonidega, kuid ei sisalda viiruse DNA-d (Schiller ja Lowy, 2012). Kokkupandud VLP-d on tugevad immunogeenid (Bachmann jt., 1993).

Kapsiidivalke ekspresseeritakse nakatunud epiteelkoe ülemistes kihtides ja sellega kaasneb viiruse DNA aktiivne sünteesimine, mis tagab vastmoodustunud nakatumisvõimelise viiruse levimise väliskeskkonda keratiniseerunud rakkude loomuliku eraldumise tõttu epidermise kihilt (Doorbar, 2005).

Valgu L1 lugemisraam on kõige enam konserveerunud regioon HPV genoomis ning seetõttu leidnud kasutust uute papilloomiviiruse tüüpide identifitseerimisel⁸. Kapsiidivalke L1 ja L2 ekspresseeritakse viiruse elutsükli hilisemas faasis kõrgelt diferentseerunud suprabasaalsetes rakkudes (Ozbun ja Meyers, 1997).

1.6.8. L2

Valk L2 on umbes 500 aminohappe suurune (Subramanian ja Bonen, 2006). L2 on kapsiidivalk, millel on suur roll nii papilloomiviiruse kokkupanekul kui ka infektsiooniprotsessis. Kui L1 moodustab peamise osa kapsiidist ning on võimeline end ise VLP-deks kokkupakkima, siis L2 on väike kapsiidikomponent, millel puudub võime iseseisvalt VLP-sid moodustada. L2 pakib end koos L1 kokku VLP-ks, et kapsiidi agregaat tugevdada (Wang ja Roden, 2013).

Valgu L2 funktsiooniks on ka viiruse genoomi pakkimine kapsiidi. L2 võib seonduda DNA-ga ja lokaliseeruda tuumas ND10 domeenidele (Zhou jt., 1994; Day jt., 2004). ND10 domeenid on

⁸ <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/mono90.pdf>

tuumakehakesed, mis on peamisteks DNA replikatsiooni saitideks. Kuigi ND10 täpne roll DNA replikatsioonis pole teada, on näidatud, et L2 olemasolu rakkudes viib ND10 domeenide reorganiseerimiseni (Florin jt., 2002). L2 võib nendes domeenides seonduda vastreplitseerunud viiruse DNA-ga ja suunata L1 looma uusi virioone (Hebner ja Laimins, 2006).

1.7. HPV testimise ajalugu

HPV-1 on stabiilne kaksikahelaline DNA genoom, mida on kerge analüüsida. Varajaste molekulaarsete nukleiinhapete testide väljatöötamiseks kasutati nakkusliku viiruse looduslikke allikaid, nagu tüükakaabet (Unger jt., 1986; Cubie ja Norval, 1989). HPV testimiseks kasutati kommertsiaalseid teste, mis põhinesid radioaktiivse fosforiga (³²P) märgistatud nukleiinhappe proovide kasutamisel *slot-blot* hübriidisatsiooni formaadis. Need varased HPV testid (*ViraPap* ja *ViraType*) töötas esmalt välja ja turustas Life Technologies, kuid seejärel müüdi need firmale Digene Corporation. Antud testid ei saavutanud laialdast kasutust, suures osas seetõttu, et need ei detekteerinud kõiki onkogeenseid HPV genotüüpe ning test oli madala tundlikkusega (Hubbard, 2003).

Lisaks meetoditele, mis kasutasid ³²P-ga märgistatud nukleiinhappe proove, oli kommertsiaalselt saadaval ka valik teste, mis kaasasid nukleiinhappe *in situ* hübriidisatsiooni (*in situ hybridization* - ISH) koos kloonitud või sünteetiliste oligonukleotiidproovidega (Unger jt., 1986; Cubie ja Norval, 1989). Nende eeliseks oli rakulise struktuuri ja lokaliseerimise säilitamine, kuid nad polnud rutiinseks kasutamiseks piisavalt tundlikud (Hesselink jt., 2004). Neid *kit*-e tootsid Enzo Diagnostics ja Life Technologies (Hubbard, 2003).

Kõige varasemad lahuse hübriidisatsiooni (*solution hybridization*) testid sisaldasid *southern blotting*'ut hübriidide detekteerimiseks, kuid tulemused olid muutlikud ning polnud kliiniliseks diagnoosiks piisavalt robustsed. Esimene usaldusväärne standardiseeritud kvaliteediga HPV DNA test töötati välja Digene Corporation'i poolt ning sai 1999. aastal USA Toidu- ja Raviameti (*United States Food and Drug Administration* – FDA) heakskiidu kindlaks määramata tähendusega atüüpiliste lameepiteeli rakkudega (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance* – ASCUS) patsientide testimiseks⁹ (Cubie ja Cuschieri, 2013). See test oli *Hybrid Capture* test, mis

⁹http://www.cap.org/apps/cap.portal?_nfpb=true&cntvwrPtlActionOverride=%2Fportlet%2FcontentViewer%2Fshow&cntvwrPtl{actionForm.contentReference}=committees%2Ftechnology%2FHpv.html&_pageLabel=cntvwr

põhineb ühe matriits-DNA ahela hübridisatsioonil lahuses 13 erineva HPV tüübi RNA proovi hulgast komplementaarsetele.

2003. aastal sai *Hybrid Capture 2 High-Risk HPV DNA Test* (HC2) FDA heakskiidu kasutamiseks rutiinse Pap-testi kõrval üle 30-aastaste naiste testimisel¹⁰ (Cubie ja Cuschieri, 2013). HC2 testi kasutatakse laialdaselt veel tänapäevalgi (Castle jt., 2008).

1.8. HPV DNA detekteerimine

Kõrge riski inimese papilloomiviirus (*high-risk human papillomavirus*, hrHPV) põhjustab emakakaela intraepiteliaalset neoplaasiat ning seda peetakse emakakaelavähi prekursoriks (Nobbenhuis jt., 1999).

Paljud tänapäeval kasutatavad HPV testid ei tööta mitte genotüübitasemel, vaid detekteerivad tervet erinevate hrHPV-de rühma. Kõige ulatuslikumalt kasutatakse HPV detekteerimiseks peamiselt kahte meetodit: signaali amplifikatsioonil põhinevat meetodit (*Hybrid Capture 2* (HC2)) ja sihtmärgi amplifikatsioonil põhinevat meetodit (PCR) (Schmitz jt., 2009).

1.8.1. HPV DNA analüüsimiseks kasutatav proovimaterjal

Inimese papilloomiviirust ei saa rakukultuuris isoleerida, kuna HPV vajab raku diferentseerumist, et viia lõpule oma replikatsioonitsükkel (Stanley, 2010). Seetõttu põhineb HPV diagnostika molekulaarsetel tehnoloogiatel.

HPV DNA testi võib läbi viia kasutades sama proovimaterjali, mida kasutatakse tsütoloogilises testimises. Siiski on emakakaelakaabe ainult väike valik emakakaela epiteeli rakkudest ning proovivõtu vead võivad mõjutada tsütoloogilist hinnangut. DNA isoleerimiseks kasutatakse ainult osa emakaela rakkude suspensioonist ning ainult murdosa isoleeritud DNA-st kasutatakse spetsiifiliseks DNA detekteerimiseks. Kui proovimaterjal sisaldab ainult piiratud arvu HPV DNA koopiaid, võivad proovivõtu vead põhjustada ebajärjepidevust ka tundlikus testis. HPV DNA testi tulemused võivad varieeruda sõltudes ka menstruaaltsüklist (van Ham jt., 2002; Harper jt., 2003). Proovivõtu vead võivad mõjutada nii HPV DNA olemasolu või selle puudumise kindlaksmääramist, kui ka HPV detekteerimise täpsust, eriti siis, kui proovis leidub mitu erinevat

¹⁰<http://www.fda.gov/medicaldevices/productsandmedicalprocedures/deviceapprovalsandclearances/recently-approveddevices/ucm082556.htm>

HPV genotüüpi, mis on erinevate kontsentratsioonidega. Seetõttu tuleb võimalikke proovivõtu vigu alati arvesse võtta (Quint jt., 2001).

DNA eraldamiseks on saadaval lai valik erinevaid meetodeid. Millist meetoditest kasutada, sõltub testitava kliinilise materjali kvaliteedist ja päritolust ning sellest, millist diagnostilist testi kasutatakse (Molijn jt., 2005).

Oluline on ka proovi stabiilsus transpordi ja hoiustamise ajal. Viiruse nukleiinhappe säilitamise korral tuleb vältida nukleiinhappe degradatsiooni endogeensete endonukleaaside poolt. Nukleiinhappe degradeerimine põhjustab HPV detekteerimisel valenegatiivseid tulemusi. Et hinnata genoomse DNA terviklikkust proovimaterjalis ning selle sobivust molekulaarseks analüüsiks, kasutatakse selleks otstarbeks sobivaid kontrole, nagu β -globiini geeni amplifikatsiooni või proovi spaikimist teadaoleva positiivse materjaliga (Sherman jt., 1997).

1.8.2. Signaali amplifikatsioonil põhinevad meetodid

Hybrid Capture 2 süsteem (Digene Corporation) on mitteradioaktiivne signaali amplifikatsiooni meetod, mis põhineb sihtmärk-HPV DNA hübridisatsioonil lahuses olevate märgistatud RNA järjestuste külge (Bozzetti jt., 2000; Lorincz, 1996). Tulemusena saadavad RNA-DNA hübriidid liiguvad mikrotiiterkaevukestesse ning detekteeritakse spetsiifilise monoklonaalse antikeha ja kemiluminesentssubstraadi poolt, mis annab poolkvantitatiivse HPV DNA mõõtmistulemuse. Kasutatakse kahte erinevat proovide kokteili: esimene sisaldab viie madala riski genotüüpide (6, 11, 42, 43 ja 44) proove ning teine sisaldab 13 kõrge riski genotüüpide (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ja 68) proove. Antud test on standardtest paljudes riikides ning seda kasutatakse laialdaselt kliinilistes uuringutes. *Hybrid Capture 2* süsteemil on ka piiranguid. Test teeb vahet kõrge ja madala riski rühmadel, kuid ei võimalda spetsiifiliste HPV genotüüpide identifitseerimist. Testi detekteerimispiiriks on umbes 5000 genoomi ekvivalenti, mistõttu on see vähem tundlik kui PCR (Cope jt., 1997; Smits jt., 1995). Kahe proovide kokteili ristreaktiivsus võib reductseerida positiivse tulemuse kliinilist relevantsust (Castle jt., 2002; Poljak jt., 2002). *Hybrid Capture 2* süsteemil pole ka sisemist rakulist kontrolli, mis oleks abiks valenegatiivsete tulemuste määramisel (Castle jt., 2008).

Veel üks signaali amplifikatsioonil põhinev meetod HPV detekteerimiseks on *Cervista® HPV HR* (Hologic, Inc.). Antud test võimaldab detekteerida 14 kõrge riski HPV tüüpi ning põhineb firmale Hologic kuuluval patenteeritud tehnoloogial *Invader Chemistry®*, mis detekteerib spetsiifilisi nukleiinhappejärjestusi, kasutades samaaegselt kahte isotermilist reaktsiooni (Hwang ja Shroyer,

2012; Torres jt., 2012). *Cervista® HPV HR* test võimaldab vähendada valepositiivseid tulemusi, mis on seotud ristreaktiivsusega madala riski HPV-dega. Samuti sisaldab *Cervista® HPV HR* unikaalset sisemist kontrolli, mis võimaldab teha kindlaks, kas proovis leidub testimiseks piisavas koguses DNA-d¹¹.

1.8.3. Sihtmärgi amplifikatsioonil põhinevad meetodid

Sihtmärgi amplifikatsioon on kõige paindlikum ja tundlikum kõikidest hetkel kasutusel olevatest DNA analüüsimise meetoditest. Seda meetodikat võib kasutada viiruse detekteerimiseks, kvantifitseerimiseks, DNA sekveneerimiseks ja mutatsioonianalüüsiks (Hubbard, 2003). Neid teste võib läbi viia multipleks-PCR-ina, kus saab üheaegselt analüüsida mitmeid sihtmärk-DNA järjestusi. Sihtmärgi amplifikatsioonil põhinevad meetodid suurendavad tundlikkust spetsiifilise sihtmärk-DNA järjestuste *in vitro* sünteesiga (Burd, 2003).

Kõige laiemalt levinud sihtmärgi amplifikatsiooni meetodiks on PCR. PCR kasutab termotsükleerimise protsessi ning selle läbiviimiseks on vajalikud oligonukleotiidpraimereid, mis seonduvad huvipakkuvale regioonile ning võimaldavad DNA-d termostabiilse DNA polümeraasi juuresolekul amplifitseerida. Kasutatakse peamiselt kahte erinevat lähenemist: tüübispetsiifilist PCR-i ja konsensus-PCR-i (Molijn jt., 2005).

Konsensuspraimerite sihtmärkideks on HPV enim konserveerunud regioonid (Molijn jt., 2005). Kuna L1 regioon on kõige konserveerunud ala HPV genoomist, siis on see mitmete konsensus-PCR praimerikomplektide sihtmärk (Hildesheim jt., 1994). Sihtmärgiks võib olla ka E1 regioon (Tieben jt., 1993). HPV määramiseks on mitmeid konsensuspraimerite komplekte. Kõige sagedamini kasutatakse GP5+/GP6+ PCR süsteemi, Roche Amplicor[®], PGMY praimerite komplekti ning SPF¹⁰ praimerite komplekti. Need PCR praimerite komplektid erinevad oma disainilt ning ülesamplifitseeritava PCR produkti suuruse poolest (Gravitt jt., 2000; van Hamont jt., 2008).

Pärast amplifikatsiooni saab HPV genotüüpe määrata eraldi, kasutades restriksioonifragmentide pikkuspolüformismi (RFLP), lineaarse sondeerimise testi (*linear probe assay*), otsest sekveneerimist või genotüübispetsiifilisi praimereid (Coser jt., 2011).

Kasutatakse ka tüübispetsiifilist PCR-i praimeritega, mis amplifitseerivad pikka kontrollregiooni L1 ja E6/E7 geenide vahel (Carvalho jt., 2010). Tüübispetsiifilised PCR testid põhinevad HPV

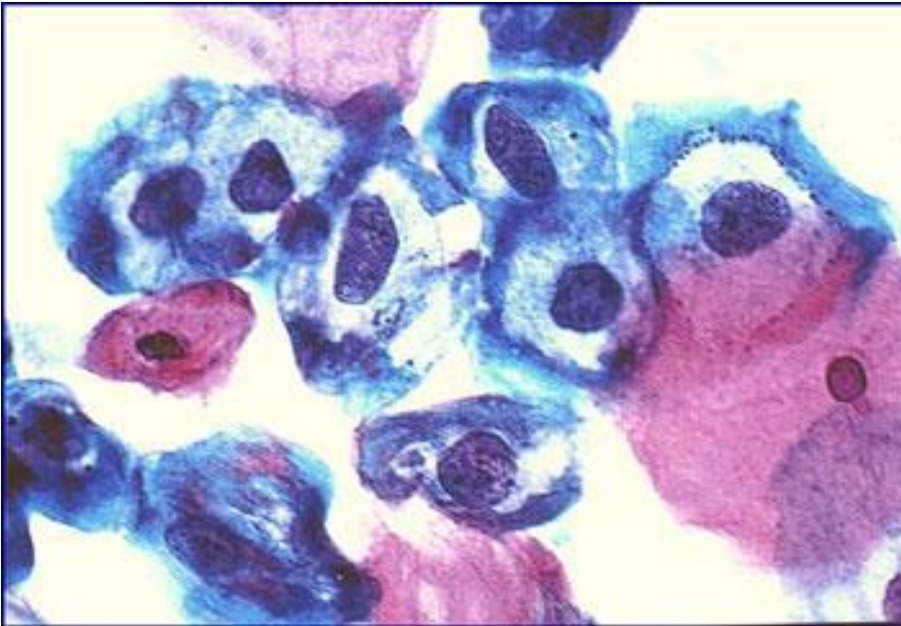
¹¹ <http://www.hologic.com/products/physicians-office-testing/cervical-health/cervista-hpv-tests>

tüüpide E6 ja E7 geenides leiduvate järjestuse variatsioonidel. Välja on töötatud 14 tüübispetsiifilist PCR-i kõrge riski HPV tüüpide jaoks, mille sihtmärgiks on umbes 100 aluspaari suurune lõik E7 ORF-is (Walboomers jt., 1999). Tüübispetsiifilise PCR-i korral tuleb hoolikalt disainida primereid, et nad ei reageeriks hästi konserveerunud regioonides teiste tüüpidega. Tüübispetsiifilise PCR-i spetsiifilisuse kinnitamist saab läbi viia filterhübridisatsiooniga, ensüümse immunoanalüüsiga (EIA) ning reaalaaja PCR-ga (Josefsson jt., 1999; Hesselink jt., 2005; Moberg jt., 2003). Testid hõlmavad ka sisemise kontrolli primereid. Nende testide analüütiline tundlikkus on sõltuvalt HPV tüübist vahemikus 10 kuni 200 HPV koopiat proovi kohta (Burd, 2003).

1.9. Tsütoloogia

Kõige väljakujunenud meetodiks HPV detekteerimisel on emakakaela rakkude (*exfoliated squamous cervical cells*) Papanicolaou meetodil värvimine ehk Pap-test. Emakakaelarakke kogutakse kogumisseadmesse, värvitakse ning uuritakse mikroskoobi all. HPV-ga nakatunud rakud on äratuntava „koilotsüüdi“ välimusega: nende tuum on suurenenud ning ümbritsetud läbipaistvate ringidega (joonis 2). Proovi võtmise ajal on tervishoiuteenuse osutajal võimalik emakakaela ka visuaalselt hinnata. Kaugelearenenud HPV infektsioone, mis on võtnud suuna vähi arengule, on võimalik näha düsplaasiana. Ebanormaalseid Pap-testi ja/või visuaalse vaatluse tulemusi nimetatakse emakakaela intraepiteliaalseks neoplaasiaks või lamerakuliseks intraepiteliaalseks kahjustuseks. Neile võib järgneda kolposkoopia ja biopsia ning kui vajalik, siis ebanormaalse rakkude eemaldamine laseri, veeldatud lämmastiku või skalpelli abiga (Greenblatt, 2005).

Pap-testi puhul võib aset leida mittekorrektseid tõlgendamisi (Derchain jt., 2005; Pinto jt., 2012). Paljudes riikides on Pap-testide kõrval võetud kasutusele ka HPV DNA testimine, et saada emakakaelavähi uuringutes rohkem informatsiooni (Hausen, 2000; Saslow jt., 2012).



Joonis 2. HPV-ga nakatunud rakud ehk „koilocüüdi“ välimusega rakud. Rakkude tuumad on suurenenud ning neid võib olla ka mitu. Tuumad on ümbritsetud läbipaistvate ringidega¹².

1.10. Reaalaja PCR

Reaalaja kvantitatiivne PCR on kõige tundlikum sihtmärgi amplifikatsiooni meetod (Hubbard, 2003). Reaalaja PCR testid annavad proovides oleva sihtmärk-DNA algse koopiaarvu kohta täpse mõõtmistulemuse, mõõtes pidevalt fluorestsentsi juurdekasvu, mis vabaneb amplifikatsioonireaktsiooni käigus. Kuna PCR reaktsiooni esimestes etappides on keskkonnas kaheaheelalist DNA-d vähe, on ka fluorestsents nõrgem. Mida rohkem kaheaheelalist DNA-d aga tekib, seda tugevamaks muutub ka fluorestsentsisignaal. Fluorestsentsisignaal võib tekkida ka praimerite mittespetsiifilise seondumise tagajärjel. Reaalaja amplifikatsiooni ja HPV DNA detektsiooni läbiviimiseks on mitmeid formaate. On testid, mis põhinevad proovide hüdrolüüsil, testid, mis põhinevad fluorestsentsi resonantsenergia ülekandel (*fluorescence resonance energy transfer*), ning testid, mis kasutavad molekulaarseid majakaid (*molecular beacon*) (Swan jt., 1999). Reaalaja PCR-i saab kasutada ka konsensuspraimeritega.

¹² <http://www.uib.no/en/rg/molpat/81100/research-area>

1.11. HPV detekteerimine Eestis

Eestis sooritatakse Pap-test korralise günekoloogivisiidi käigus. Samuti teostatakse emakakaelavähi sõeluuringut, mida viib läbi SA Vähi Sõeluuringud koostöös Eesti Haigekassaga ning sinna oodatakse 30 - 59-aastaseid naisi iga viie aasta järel sooritama Pap-testi¹³. Kui Pap-test on positiivne ehk avastatakse ebanormaalseid rakke, teostatakse HPV test. HPV test viiakse läbi ka üle 35 aasta vanustel naistel. Osa haiglaid kasutab HPV tüpeerimiseks kommertsiaalseid *kit*-e, kuid peamiselt sooritab Eestis HPV tüpeerimisteste Quattromed HTI labor Tartus¹⁴. HPV genotüüpiseerimiseks kasutab Quattromed HTI PCR + Luminex xMap tehnoloogiat. Tuvastatakse järgmisi kõrge riski HPV tüüpe: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 ja 82. Kõik tuvastatavad HPV genotüübid määratakse korraga ühest proovimaterjalist¹⁵. Luminex xMap süsteem on paindlik analüsaator, mis põhineb läbivoolutsütomeetria põhimõttel. Polüstüreenikerakesed värvitakse kahe spektriliselt erineva fluorokroomiga. Iga kerakeste kompleks on tavaliselt ühendatud ühe oligonukleotiidiga, mis on spetsiifiline ühele HPV tüübile. Genotüüpiseerimine teostatakse ümberpööratud hübridisatsiooni teel kasutades biotinüleeritud PCR amplikone. Pärast sihtmärk-HPV järjestuste denatureerimist ja hübridisatsiooni kerakestega seotud oligonukleotiidide külge, märgistatakse hübridiseeritud biotinüleeritud amplikonid R-fükoerütriiniga märgistatud streptavidiiniga, mis toimib kui reporter-fluorofoor. Seejärel loetakse ja analüüsitakse kerakeste komplekte Luminex analüsaatoris (Poljak ja Kocjan, 2010).

1.12. Kõrge riski HPV-ga nakatunud patsientide ravimine

Inimese papilloomiviiruse spetsiifiline ravi puudub, kuid on ravimeetodeid, millega on võimalik eemaldada HPV avaldumisvormid¹⁶.

Kui Pap-testi tulemusena leitakse abnormaalseid rakke ning HPV testi tulemusena detekteeritakse kõrge riski HPV tüüp, viiakse läbi kolposkoopiline uuring. Kolposkoopia käigus eemaldatakse piirkonnast, kus esineb rakulisi muutusi, väike koetükk ehk biopsia, millega viiakse läbi histoloogilisi uuringuid.

¹³ <http://cancer.ee/info-vahist/vahipaikmed/emakakaelavahk/>

¹⁴ <https://www.arst.ee/et/Valdkonnad/d/11148/hpv/t/77>

¹⁵ <http://www.quattromed.ee/arstile/laboriteatmik/tulemusteinterpretatsioonid/nakkushaiguste-diagnostika/inimese-papilloomiviiruse-dna-genotuup-hpv-dna-genot/>

¹⁶ <http://www.cdc.gov/hpv/treatment.html>

Kui biopsia analüüsi järel ilmneb, et rakkudel esineb CIN-2 ehk mõõdukas düsplaasia või veel raskem abnormaalsus, on vaja läbi viia edasine ravi. Ravist loobumise tagajärjeks võib olla rakkude arenemine vähiks.

Ravivõimalused on järgmised:

- LEEP (*loop electrosurgical excision procedure*) ehk diatermiline ekstsisioon linguga, mille korral eemaldatakse emakakaela epiteelimuutused kuuma traatlingu abil, mida läbib elektrivool.
- Krüoteraapia, mille korral ebanormaalne kude hävitatakse selle külmutamise teel.
- Laserteraapia, mille korral kasutatakse intensiivse valguse peenikest kiirt, et hävitada või eemaldada ebanormaalseid rakke.
- Konisatsioon, mille käigus eemaldatakse emakakaela välimine osa, kasutades nuga, laserit või LEEP tehnoloogiat. Eemaldatav koetükk on koonusekujuline¹⁷.

Eestis soovitatakse naistel CIN-i ravi järgselt korrata Pap- ja HPV testi 6 ja 24 kuud pärast ravi saamist. Kui testid annavad negatiivse tulemuse, tuleks mõlemat testi korrata kolme aasta pärast. Kui testi tulemused on ka siis negatiivsed, peaks jätkama tavapärasest jälgimist vähemalt 20 aastat¹⁸.

¹⁷ <http://www.cancer.gov/types/cervical/pap-hpv-testing-fact-sheet#q8>

¹⁸ http://emakakaelajuhis.weebly.com/uploads/2/5/9/4/25941097/emakakaela_vhieselsete_muutuste_juhis.pdf

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Lääne-Tallinna Keskhaiglas kasutatakse HPV määramiseks ning genotüüpiseerimiseks kommertsiaalsed testi *HPV High Risk Typing Real-TM kit* (Sacace Biotechnologies). Kuna haiglas testitavate proovide seas leidub palju selliseid, mis on HPV suhtes negatiivsed, on kommertsiaalse testi kasutamine kõikide proovide puhul kulukas. Seetõttu tekkis haiglal soov võtta kasutusele test, mis võimaldaks, kasutades reaalaja PCR meetodit, määrata proovidest mittekulukalt ja vähetöömahukalt HPV üldist olemasolu.

Esitatud kriteeriumitele vastas kõige paremini konsensuspraimeritega läbiviidav reaalaja PCR. Käesolevas töös kasutati GP5+/GP6+ konsensuspraimereid, kuna need on ühed enamkasutatavad praimerid HPV tuvastamiseks kliinilistest proovidest.

Käesoleva töö eesmärgiks on tuvastada HPV-d kliinilistest proovidest reaalaja PCR-i meetodil, kasutatades GP5+/GP6+ konsensuspraimereid.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Kliinilised proovid

Käesolevas töös kasutati Lääne-Tallinna Keskhaiglast ja Pärnu Haiglast pärinevate anonüümsete kliiniliste proovide ülejääke. DNA oli eelnevalt algsest proovimaterjalist eraldatud ning HPV suhtes testitud. Piisava proovikoguse saamiseks oli haiglate laborites, laborijuhatajate selgituste kohaselt, segatud sageli kokku eri inimeste positiivsed proovid ja vastavalt ka negatiivsed proovid. Kuna käesoleva töö eesmärgiks on HPV üldise olemasolu detekteerimine proovidest, kuid mitte individuaalsete HPV genotüüpide määramine, ei ole proovides leiduvad HPV genotüübid antud töö seisukohalt olulised ning sellised segatud proovid sobivad käesolevasse töösse.

Lääne-Tallinna Keskhaiglast saabunud proovidest olid 50 HPV suhtes positiivsed ja 18 negatiivsed, ning Pärnu Haiglast pärit proovidest olid 37 positiivsed ja 15 negatiivsed.

Diagnostilistesse testidesse, mida haiglad HPV detekteerimiseks kasutavad, on tulemuste õigsuse kontrollimiseks kaasatud sisemisi kontrolle amplifitseerivaid praimereid. Sisemisteks kontrollideks on antud testides inimese koduhoidja geenid (*housekeeping genes*), nagu β -globiin. Sisemisi kontrolle kasutatakse selleks, et kontrollida, kas katsetes kasutatavad proovid on

analüüsimiseks sobivad ning kas PCR reaktsioonis leidub inhibiitoreid, mis võivad põhjustada valenegatiivseid tulemusi. Lisaks sisemistele kontrollidele on antud testidesse kaasatud ka positiivseid kontrolle, mis sisaldavad mõnda HPV genotüüpi. Positiivsed kontrollid võimaldavad veenduda, et PCR reaktsioonisegu ja reagensid töötavad korrektselt ning võimaldavad sihtmärkjärjestuse veatut amplifitseerimist.

Proovide DNA kontsentratsiooni mõõdeti Qubit fluoromeetriga (Life Technologies) ning seejärel need lahjendati 10 ng/μl juurde, kasutades TE puhvrit (10mM Tris-Cl (pH8), 0,1 mM EDTA).

Proovide, mille algkontsentratsioon oli alla 10 ng/μl, kontsentratsiooni ei muudetud.

Proovide kvaliteeti kontrolliti 1,5% agarosgeelil 0,5% TBE puhvris (45 mM Tris-boraat, 1mM EDTA). Vedelale agarosgeelile lisati UV valguses DNA visualiseerimiseks etiidumbromiidi.

Segati 5 μl proovi ja 3 μl laadimispuhvrit (Thermo Scientific 6× Orange DNA Loading Dye) ning kanti geeli hambasse. Elektroforees viidi läbi 270 V juures, geeli pildistati UV valguses, kasutades BDA Live aparatuuri (Biometra).

Proove säilitati temperatuuril -20°C.

2.2.2. Plasmiidsed kontrollid

Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudist saadi 7 erineva HPV tüve (HPV-5, -8, -11, -16, -18, -38, -66) proovid pMC.BESPX plasmiidides. Proovide kontsentratsioonid varieerusid vahemikus 200 - 1000 ng/μl. Proovid lahjendati kontsentratsioonini 10 ng/μl. Kõik plasmiiidsed kontrollid andsid nii reaalaja PCR-i kui ka konventsionaalse PCR-i järel selged positiivsed tulemused. Edaspidistes katsetes kasutati valikuliselt mõnda plasmiidset kontrolli, et veenduda PCR reaktsiooni korrektses toimimises.

Plasmiidseid kontrolle säilitati -20°C juures.

2.2.3. Kasutatud praimerid

Käesolevas töös kasutati PCR-i läbiviimiseks GP5+/GP6+ (GP5+ 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3 ja GP6+ 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3') konsensuspraimerite süsteemi. GP5+/GP6+ konsensuspraimeritel põhinev PCR test on üks enim hinnatud HPV teste kliinilistes uuringutes. Nimetatud praimerite sihtmärgiks on 150 aluspaari suurune fragment viiruse L1 regioonis. Praimerite sihtmärkjärjestus on erinevate HPV tüüpide seas üsna hästi konserveerunud, mistõttu on GP5+/GP6+ praimerid HPV tuvastamiseks hinnatud ning

laialdaselt kasutusel. Siiski esineb olenevalt HPV genotüübist mitmeid lahkevusi HPV järjestuse ja praimerite järjestuse vahel (joonis 3) (de Roda Husman jt., 1995).

a)

GP5+	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATAC	TAC-3'
HPV-6B	C.. ACGC
HPV-11	C..
HPV-13A..T.....
HPV-16T..T.....
HPV-18	C.. T...
HPV-30T..G..C..	C.. TA.G
HPV-31	C.. ...T
HPV-32	...C.A...T..G.....	... C..T
HPV-33	C.. T...
HPV-34	...T.A...T.....	... TA.A
HPV-35A..T.....	A.. C..T
HPV-39	...C.....T..G..C..	... C..T
HPV-40A..T.....C..	C.. T..T
HPV-42	...T.A...T.....	... C..T
HPV-45A..G..C..	... C...
HPV-51	...A...CTGT..T.....	... CA.A
HPV-52	...C..A..T..G.....	C.. T..T
HPV-53	...A...T..G.....	C.. CA.G
HPV-56A.....	... TA.A
HPV-58C...T.....	C.. T..T
HPV-61	...A..C..T..G.....	C.. C...
HPV-66T..G.....	... CA.A
ME180	...C.....T..G.....	C.. T...

b)

GP6+	3'-CTTAT ACTAAATGTCAAATAAAAAG-5'
HPV-6B	CTT ..C..
HPV-11	..C ..C.A
HPV-13A
HPV-16	..C
HPV-18	..C
HPV-30	..C
HPV-31	..C ..A
HPV-32	..C
HPV-33G.....C.....
HPV-34C.. ..GG.C.....C.C....
HPV-35
HPV-39	..C ..C..
HPV-40	..C ..C.A
HPV-42C.C..T.....T.....
HPV-45	..C
HPV-51C.. ..T..C..T.....
HPV-52	..C ..A
HPV-53	..C
HPV-56	..C
HPV-58G.....C.....
HPV-61	..C ..C.A
HPV-66	..C
ME180	..C

Joonis 3. a) GP5+ ja b) GP6+ järjestused ning 23 HPV genotüübi L1 regiooni vastavad järjestused. Punktid tähistavad identseid aluspaare ning tähemärgid aluspaare, kus esineb lahknevus (de Roda Husman jt., 1995).

2.2.4. Reaalaja PCR

Käesolevas töös kasutati reaalaja PCR-i läbiviimiseks *Thermo Scientific Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2X)*-i järgides tootjaprotokollit. Reaalaja PCR-i teostamiseks kasutati instrumenti 7900HT Fast Real-Time PCR System (PE Applied Biosystems) ning saadud tulemuste analüüsimiseks rakendati tarkvara SDS 2.4 (Applied Biosystems).

Reaalaja PCR-i reaktsioonisegu sisaldas:

- 12,5 µl *Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2X)* (Thermo Scientific)
- 0,1 µl GP5+ praimer (lõppkontsentratsioon 0,4 µM)
- 0,1 µl GP6+ praimer (lõppkontsentratsioon 0,4 µM)
- 5 µl *template* DNA
- 7,3 µl nukleasivaba H₂O

Reaktsioonimaht igas PCR plaadi süvendis oli 25 µl ning iga reaktsioon viidi läbi kahes korduses.

Reaalaja PCR programm teostati järgmistel tingimustel:

Esmalt viidi läbi DNA algne denaturatsioon kümne minuti jooksul 95°C juures.

Järgnevaid kolme etappi korrati 40 tsükli:

1. Denaturatsioon 1 minuti jooksul 95°C juures
2. Praimeri seondumine 1 minuti jooksul 43°C juures
3. DNA süntees 1 minuti jooksul 72°C juures

Lõppinkubeerimine teostati 72°C juures 10 minuti jooksul.

Käesolevas töös viidi pärast iga reaalaja PCR reaktsiooni läbi dissotsiatsioonianalüüs, mis määrab kindlaks reaktsiooniproduktide dissotsiatsiooni- ehk sulamistemperatuuri (T_m).

Dissotsiatsioonikõverate analüüs viidi igas eksperimendis läbi vahemikus 50 - 90 °C.

2.2.5. Reaalaja PCR-i tingimuste optimeerimine

Täpsemate ja selgemate reaalaja PCR-i tulemuste saamiseks katsetati erinevate PCR-i tingimustega. Muudeti praimerite seondumise temperatuuri, mille korral PCR viidi läbi eespool kirjeldatud tingimustel, langetades või tõstes vaid praimerite seondumise temperatuuri 40°C, 45°C või 46°C juurde.

Katseid viidi läbi ka vähendatud praimerikogusega, mille puhul reaktsioonisegu koostis ühtis eespool kirjeldatuga, välja arvatud praimerite lõppkontsentratsioon, mis 0,4 µM asemel langetati kontsentratsioonini 0,26 µM. Praimerite kontsentratsiooni langetati selleks, et kontrollida liigsete praimerite mõju reaktsiooni toimumisele ning praimerite dimeeride võimalikku moodustumist.

Viidi läbi ka *touchdown* reaalaja PCR, kus praimerite seondumistemperatuuri alandati 21 tsükli jooksul 0,5 °C tsükli kohta. *Touchdown* PCR programm oli järgmine:

Algne denaturatsioon 10 minuti jooksul 95°C juures

Järgnevat kolme etappi korrati 21 tsükli:

1. Denaturatsioon 1 minuti jooksul 95°C juures
2. Praimerite seondumine 2 minuti jooksul 50°C juures
3. DNA süntees 1,5 minuti jooksul 72°C juures

Järgnevaid etappe korrati 19 tsükli:

1. Denaturatsioon 1 minuti jooksul 95°C juures
2. Praimerite seondumine 2 minuti jooksul 40°C juures
3. DNA süntees 1,5 minuti jooksul 72°C juures

Sellele järgnes lõppinkubeerimine 72°C juures 10 minuti jooksul.

2.2.6. Konventsionaalne PCR

Praimerite töökindluse kontrollimiseks kasutati ka konventsionaalset PCR-i. PCR reaktsioonisegu lõppmahuga 20 µl sisaldas:

- 2 µl 10x HOT FIREPol® PCR reaktsioonipuhver (Solis BioDyne)
- 1,2 µl HOT FIREPol® MgCl₂ (25 mM) (Solis BioDyne)
- 3 µl dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (2 mM)
- 1 µl GP5+ praimer (5 µM)
- 1 µl GP6+ praimer (5 µM)
- 0,3 µl HOT FIREPol® DNA polümeraas (5 U/µl) (Solis BioDyne)
- 6,5 µl deioniseeritud H₂O
- 5 µl DNA

PCR programm viidi läbi termotsükleris Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler samadel tingimustel, mis reaalaja PCR, välja arvatud DNA algne denaturatsioon, mis toimus 10 minuti asemel 15 minutit.

PCR produkte kontrolliti elektroforeesi meetodil 1,5% agarosgeelis 0,5% TBE puhvris. Vedelale agarosgeelile lisati UV valguses DNA visualiseerimiseks etiidiumbromiidi. Segati 5 µl proovi ja 3 µl laadimispuhvrit (Thermo Scientific 6× Orange DNA Loading Dye) ning kanti geeli hambasse. Produktide võrdlemiseks kasutati suurusmarkerina *GeneRuler*™ 100bp DNA markerit (Thermo Scientific). Elektroforees viidi läbi 270 V juures, geeli pildistati UV valguses, kasutades *BDA Live* instrumenti (Biometra).

2.3. Tulemused

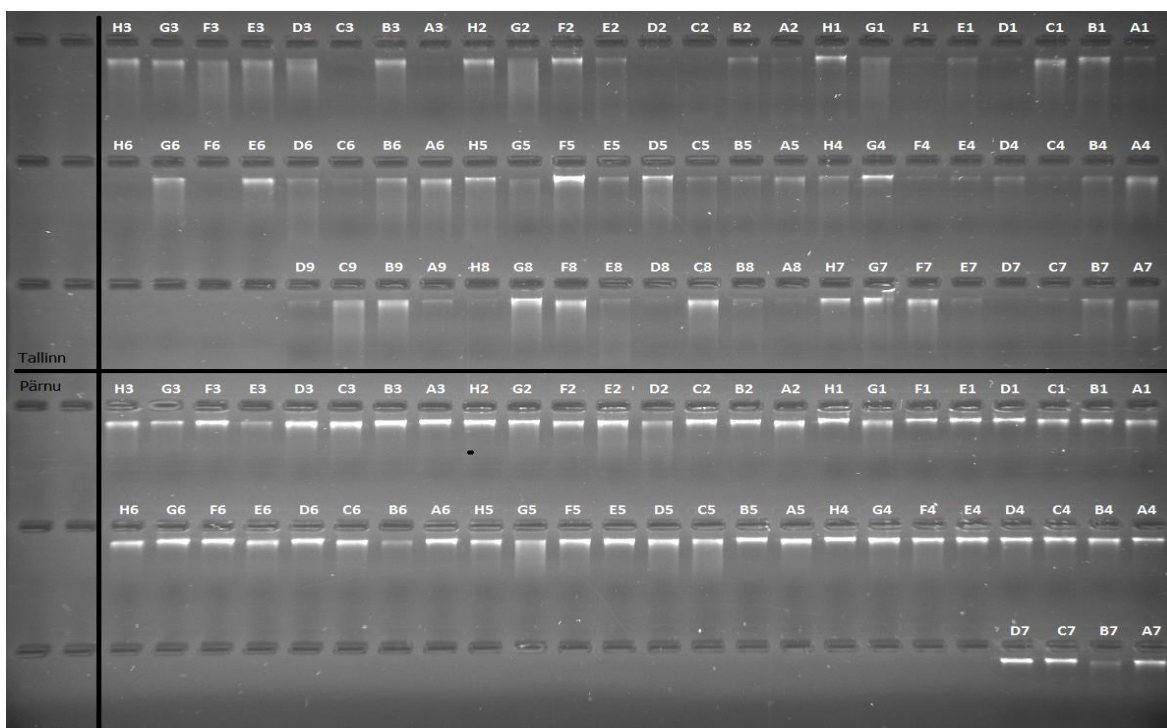
2.3.1. DNA proovide kontsentratsioon ja kvaliteet

Lääne-Tallinna Keskhaiglas kasutatakse HPV tuvastamiseks proovidest *HPV High Risk Typing Real-TM Kit*-i (Sacace Biotechnologies), mis, kasutades reaalaja PCR-i meetodit, võimaldab detekteerida ja genotüpiseerida 14 kõrge riski HPV tüüpi (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59). Lääne-Tallinna Keskhaiglast saadi katsete läbiviimiseks 68 proovi, millest 50 olid HPV suhtes positiivsed ja 18 negatiivsed.

Pärnu Haiglas kasutati 2014. aasta lõpuni *Anyplex™ II HPV28* (Seegene) testsüsteemi 28 HPV tüüpi tuvastamiseks, mis lisaks 16 kõrge riski HPV tüübile (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73, 82), on võimeline tuvastama ka 9 madala riski HPV genotüüpi (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70). 2015. aastal hakati kasutama *kit*-i *Anyplex™ II HPV HR Detection* (Seegene), mis võimaldab tuvastada 14 erinevat kõrge riski HPV tüüpi (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). Pärnu Haiglast saadeti 52 proovi, millest 37 olid HPV suhtes positiivsed ning 15 negatiivsed.

Mõlemast haiglast saadud DNA-de kontsentratsioonid mõõdeti Qubit fluoromeetriga. Lääne-Tallinna Keskhaiglast pärinevate DNA-de kontsentratsioon varieerus vahemikus 0 – 49,8 ng/μl (tabel 2) ning Pärnu Haiglast saadud DNA-de kontsentratsioon vahemikus 3,05 – 318 ng/μl (tabel 3). Et vähendada kontsentratsioonide erinevusest tingitud signaalide varieeruvust, normaliseeriti need kontsentratsioonini 10 ng/μl, välja arvatud proovid, mille algkontsentratsioon oli alla 10 ng/μl.

Pärast proovide normaliseerimist teostati geelelektroforees 1,5% agarosgeelis 0,5% TBE puhvril, et kontrollida DNA kvaliteeti (joonis 4). Geelelektroforeesi pildil on näha, et Lääne-Tallinna Keskhaigla proovide kvaliteet on üpriski kõikumine, samas kui Pärnu Haigla proovid tunduvad olevat ühtlaselt hea kvaliteediga. Kvaliteedierinevused võivad olla tingitud paljudest faktoritest – proovide kogumise viisist, nendest DNA eraldamise meetodikast või ka proovide hoiustamistingimustest. Paljude proovide korral, millel on geelelektroforeesi pildil näha nõrka signaali, on ka mõõdetud DNA kontsentratsioon null või nullilähedane, mis viitab sellele, et antud proovides leiduv DNA kogus on väga väike. DNA piisav olemasolu proovides ei taga aga selgeid ja korrektseid katsete tulemusi, kuna ei ole teada, kui suure osa kogu DNA-st moodustab HPV DNA. HPV DNA kogus proovis sõltub suuresti proovi võtmisest ning sellest, kui palju on proovi sattunud HPV-ga nakatunud rakke.



Joonis 4. Lääne-Tallinna Keskhaiglast ja Pärnu Haiglast pärinevate DNA-de geelelektroforeesi pilt. Lääne-Tallinna Keskhaigla proovide korral on positsioonidel A1 kuni B7 HPV suhtes positiivsed proovid ning positsioonidel C7 kuni D9 negatiivsed proovid. Pärnu Haigla proovide korral on HPV positiivsed proovid positsioonidel A1 kuni E5 ning negatiivsed proovid positsioonidel F5 kuni D7.

2.3.2. Lääne-Tallinna Keskhaiglast ja Pärnu Haiglast pärit proovide reaalaja PCR-i tulemused

Järgnevalt viidi Lääne-Tallinna Keskhaigla proovidega läbi reaalaja PCR. Katset korrati Pärnu Haiglast pärit proovidega. Reaalaja PCR teostati eespool kirjeldatud viisil, kasutades GP5+/GP6+ konsensuspraimereid. Reaalaja PCR-i korrektse toimimise kontrollimiseks kasutati positiivseid kontrole. Negatiivsete kontrollidena kasutati nukleaasivaba vett. Negatiivsed kontrollid on vajalikud kontaminatsiooni kontrollimiseks. Iga reaktsioon viidi läbi kahes korduses. Tulemusi analüüsiti dissotsiatsioonikõverate alusel, mis sisaldavad dissotsiatsiooni- ehk sulamistemperatuuri (T_m). T_m sõltub peamiselt konkreetsete PCR produktide omadustest ning mingil määral ka reaktsioonikeskkonnast. T_m järgi on võimalik kontrollida saadud amplikonide spetsiifilisust.

HPV suhtes positiivsete proovide T_m oli vahemikus 70 - 76°C. Paljude proovide korral ilmses ka teine piik vahemikus 65 - 66°C. Kuna see piik esines ka osa negatiivsete proovide korral, siis on võimalik, et tegemist on praimerite dimeriseerumisega ning seetõttu ei loetud antud piiki oluliseks.

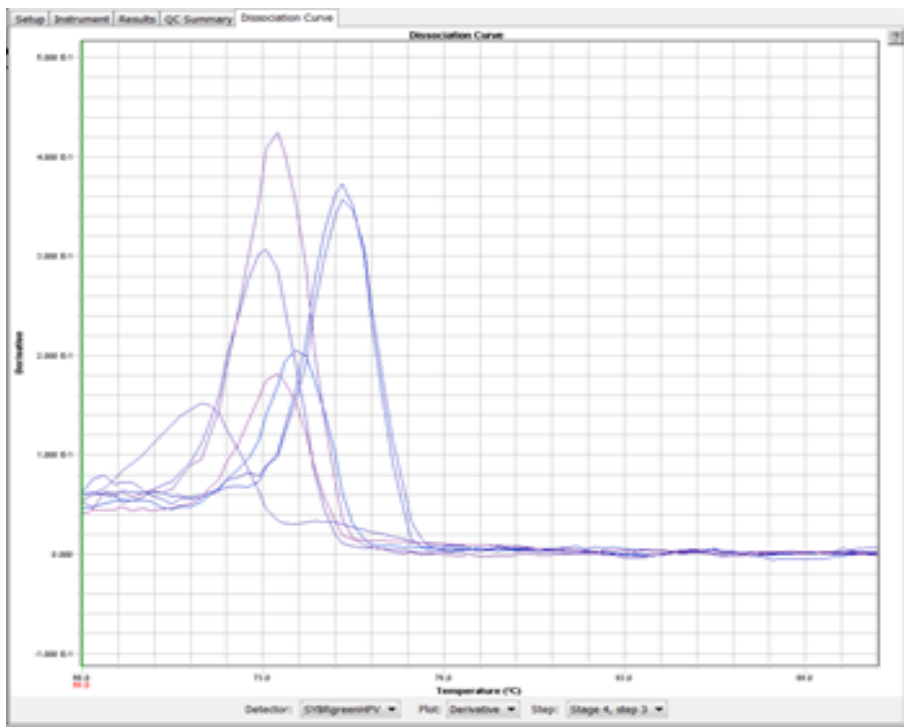
Seetõttu kasutati dissotsiatsioonikõverate selgemaks ja paremaks analüüsimiseks dissotsiatsioonikõvera temperatuurivahemikku 68 - 90°C. Seejärel hinnati piigi olemasolu. Proov loeti positiivseks, kui 70 - 76°C vahemikus olev piik ületas graafiku Y-teljel oleva negatiivse tuletise väärtust 0,1. Kui piik jäi alla seda väärtust, kuid oli siiski tuvastatav, loeti signaal nõrgaks, ning kui piik üldse puudus, hinnati proov negatiivseks. Kuna nõrkade signaalide korral oli piik liiga väike, et vastavaid proove identifitseerida kui positiivseid, loeti selgemate tulemuste saamise huvides need proovid negatiivseteks.

T_m väärtust kontrolliti ka rakendusega uMeltSM. uMeltSM on internetipõhine rakendus, mis prognoosib PCR produktide dissotsiatsioonikõveraid ning võimaldab määrata ka ligikaudset T_m -i. uMelt-i rakenduses kasutati T_m prognoosimiseks HPV genotüüpi 16. uMelt ennustuste kohaselt asub HPV-16 reaktsiooniproducti T_m vahemikus 75 - 80°C, mis vastab ligikaudselt katsete tulemusena saadud T_m -i vahemikuga.

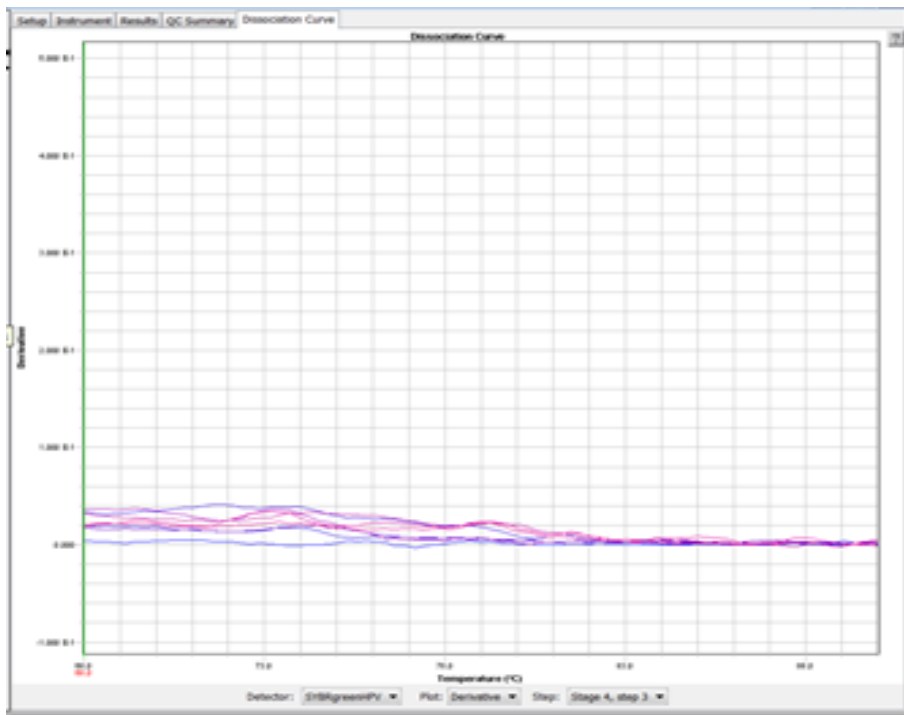
Lääne-Tallinna Keskhaigla proovidest oli antud katse järel võimalik positiivseks hinnata 33 proovi 50 positiivsest proovist. Negatiivseks loeti 27 proovi, samas kui haiglas sooritatud testi tulemusena saadi 18 negatiivset proovi (tabel 2).

Pärnu Haigla proovidest osutusid katse järel positiivseteks 24 proovi 37 positiivsest proovist. Negatiivseks hinnati 21 proovi, samas kui haiglas andsid negatiivse signaali 15 proovi (tabel 3). Joonisel 5 on näited reaalaaja PCR-il saadud positiivsetest, nõrkadest ning negatiivsetest signaalidest.

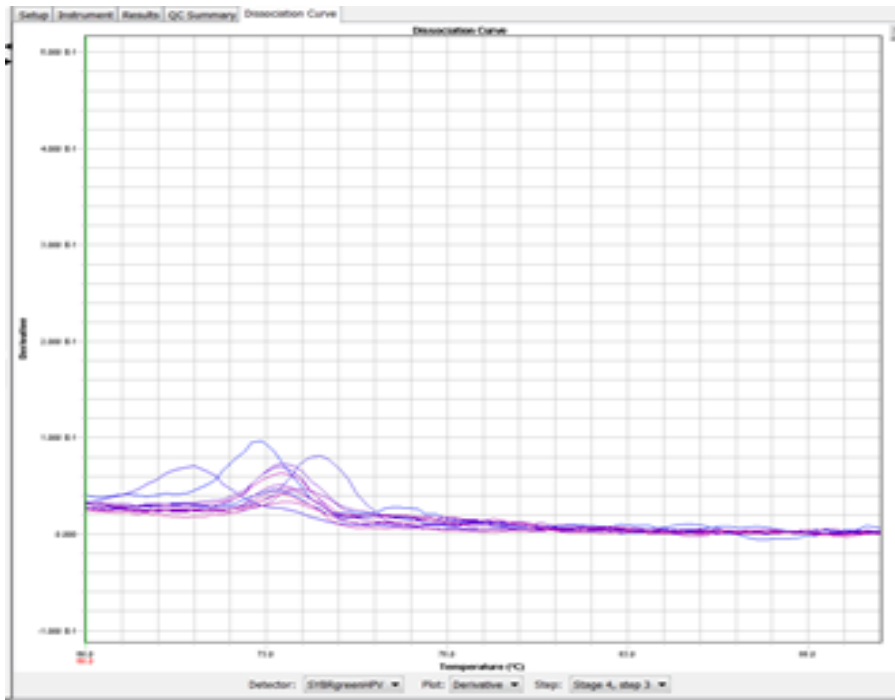
a)



b)



c)



Joonis 5. Näide reaallaja PCR-il saadud a) positiivsetest, b) negatiivsetest ning c) nõrkadest signaalidest. Positiivsete proovide T_m varieerub 70 - 76°C vahemikus. Negatiivsete proovide korral produkti ei tekkinud. Nõrkade proovide korral on näha väga nõrka signaali 70 - 76°C vahemikus. X-teljel on temperatuur (°C), Y-teljel on negatiivne tuletis (-dF/dT).

Ilmnes ka proove, mis olid eelnevalt haiglas testides osutunud positiivseteks, kuid antud katse järel andsid selge negatiivse tulemuse. Lääne-Tallinna Keskhaigla DNA-dest leidis kaheksa sellist proovi (713, 586, 715, 633, 784, 576, 628, 419) ning Pärnu Haigla proovide korral oli niisuguseid proove viis (407, 403, 446, 871, 216).

Pärnu Haigla proovide seas leidis kaks proovi (381, A381), mis olid eelnevalt detekteeritud kui negatiivsed, kuid andsid nüüd positiivse tulemuse.

2.3.3. Reaalaja PCR-i tingimuste optimeerimise tulemused

Eesmärgiga muuta reaallaja PCR-i tulemusi selgemateks ning vabaneda võimalikest praimerite dimeeridest, kasutati reaallaja PCR-i tulemuste optimeerimist. Optimeeritud reaallaja PCR-i tulemuste analüüsimiseks kasutati reaktsioonijärgset dissotsiatsioonikõverat.

Katsetati praimerite kontsentratsiooni langetamisega kontsentratsioonilt 0,4 µM kontsentratsioonini 0,26 µM, eesmärgiga vabaneda paljude proovide korral esinevast piigist 65 -

66°C vahemikus. Tulemused praimerite kontsentratsiooni langetamise järel aga ei paranenud ning nimetatud piik esines endiselt mitmete proovide puhul.

Optimeeriti ka praimerite seondumistemperatuuri. Madalamal temperatuuril seonduvad praimerid vähempetsiifiliselt ning võib esineda mittespetsiifilisiprodukte. Kui praimerite seondumistemperatuur on aga liiga kõrge, ei ole praimerid võimelised oma sihtmärgiga tõhusalt seonduma. Katseid viidi läbi praimerite seondumistemperatuuriga 40°C, 43°C, 45°C kui ka 46°C. Optimaalseks loeti temperatuur, kus reaktsiooni saagis oli kõige suurem. Optimaalseks osutus temperatuur 43°C.

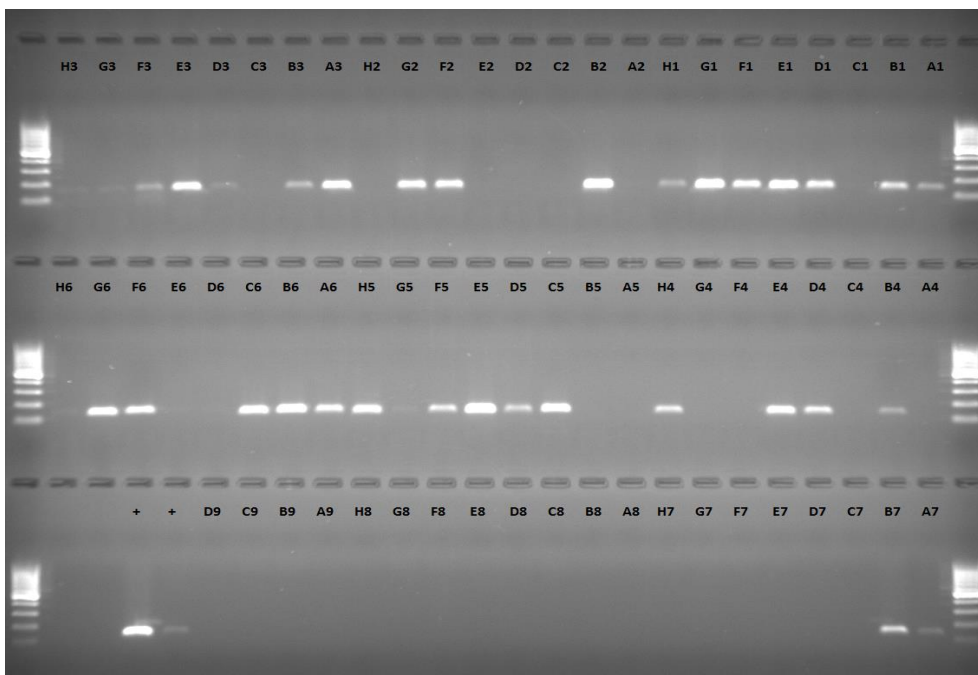
Katsetati ka *touchdown* PCR-ga. *Touchdown* PCR-i korral sooritatakse spetsiifilisuse tõstmiseks esimesed tsüklid kõrgemal praimerite seondumistemperatuuril ning seejärel praimerite seondumise temperatuuri alandatakse ning järgmised tsüklid viiakse läbi madalamal temperatuuril. Antud töös kasutatud *touchdown* PCR programm on kirjeldatud punktis 2.2.5. *Touchdown* PCR-i rakendamine antud testi korral tulemusi ei parandanud ning spetsiifilisust ei suurendanud.

2.3.4. Konventsionaalse PCR-i tulemused

Reaalaja PCR-i tulemuste täiendavaks kontrollimiseks viidi nii Lääne-Tallinna Keskhaigla kui Pärnu Haigla proovidega läbi konventsionaalne PCR eespool kirjeldatud tingimustes. PCR-i järgselt kontrolliti produkti olemasolu ning suurust geelelektroforeesil. Positiivseks loeti proovid, mille korral oli geelil eristatav ligikaudu 150 aluspaari suurune fragment. Kui fragment puudus, hinnati proov negatiivseks. Kui fragment oli õrn, loeti signaal nõrgaks. Tulemuste selgemaks interpreteerimiseks arvestati nõrkasid signaale kui negatiivseid signaale.

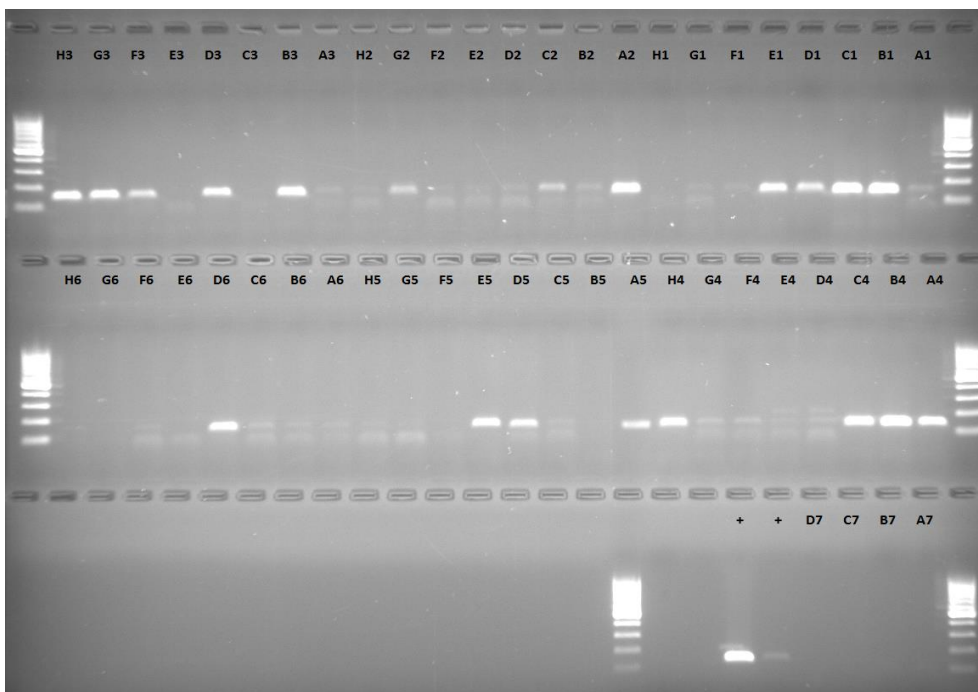
Lääne-Tallinna Keskhaigla proovide korral on näha, et negatiivsed proovid on selgelt ilma produktita. Paljude Pärnu Haigla proovide korral on aga märgatavad väga õrnad fragmendid, mis esinevad ka negatiivsete proovide korral. Võimalik, et tegemist on praimerite dimeeridega, mida tuvastati ka reaalaja PCR-i tulemusi analüüsides.

Lääne-Tallinna Keskhaigla 50 positiivseks määratud proovi hulgast osutus käesoleva meetodiga hindamisel positiivseks 30 proovi. Negatiivseid proove saadi aga 22, samas kui diagnostilise testiga oli negatiivseks määratud 18 proovi (tabel 2, joonis 6).



Joonis 6. Lääne-Tallinna Keskhaigla proovidega läbi viidud elektroforees. Radadel A1 kuni B7 on proovid, mis haigla poolt on eelnevalt määratud positiivseteks, ning radadel C7 kuni D9 paiknevad proovid, mis on haigla poolt loetud negatiivseteks. Tähisega + märgitud radadel on positiivsed kontrollid.

Pärnu Haigla proovidest osutusid positiivseteks 18 proovi 37 positiivsest proovist. Negatiivseteks hinnati 30 proovi, ent haiglas tuvastati 15 negatiivset proovi (tabel 3, joonis 7).



Joonis 7. Pärnu Haigla proovidega läbi viidud elektroforees. Radadel A1 kuni E5 on proovid, mis haigla poolt on eelnevalt määratud positiivseteks, ning radadel F5 kuni D7 paiknevad proovid, mis on haigla poolt loetud negatiivseteks. Tähistega + märgitud radadel on positiivsed kontrollid.

Lääne-Tallinna Keskhaigla proovidest ilmnes 16 proovi (591, 1016, 696, 801, 949, 713, 586, 17, 715, 633, 784, 576, 628, 10, 419, 798), mis olid haigla poolt määratud positiivseteks, kuid foreesil andsid selge negatiivse tulemuse. Pärnu Haigla proovide korral oli selliseid proove vaid kolm (863, 871, 216).

Pärnu Haigla proovide seas leidis ka proov (A381), mis oli hinnatud negatiivseks, kuid foreesil andis positiivse tulemuse. Antud proov andis positiivse tulemuse ka reaallaja PCR-il.

Tabel 2 ja tabel 3 annavad kokkuvõtva ülevaate vastavalt Lääne-Tallinna Keskhaigla ja Pärnu Haigla proovide kontsentratsioonidest, reaallaja PCR-i ning konventsionaalse PCR-i järgse geelelektroforeesi tulemustest.

Tabel 2. Lääne-Tallinna Kesksaiglast pärit proovid, nende HPV genotüüp, Qubit-ga mõõdetud kontsentratsioon, reaalaja PCR-i läbiviimisel saadud tulemus ning konventsionaalse PCR-i läbiviimisel saadud tulemus.

Proovi ID	Positsioon	HPV tüüp	Mõõdetud kontsentratsioon (ng/μl)	Reaalaja PCR-i tulemus	Elektroforeesi tulemus
2	A1	HPV 16	3,2	Positiivne	Positiivne
42	B1	HPV 16	9,83	Positiivne	Positiivne
591	C1	HPV 16	10	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
653	D1	HPV 16	1,19	Positiivne	Positiivne
746	E1	HPV 16	4,29	Positiivne	Positiivne
842	F1	HPV 16	1,46	Positiivne	Positiivne
862	G1	HPV 16	10	Positiivne	Positiivne
984	H1	HPV 16	10	Positiivne	Positiivne
1016	A2	HPV 16	2,26	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
1031	B2	HPV 16	3,9	Positiivne	Positiivne
696	C2	HPV 31	1,02	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
801	D2	HPV 31	0	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
949	E2	HPV 31	3,73	Positiivne	Negatiivne
12	F2	HPV 33	10	Positiivne	Positiivne
1001	G2	HPV 33	10	Positiivne	Positiivne
713	H2	HPV 39	10	Negatiivne	Negatiivne
924	A3	HPV 39	0	Positiivne	Positiivne
558	B3	HPV 45	9,58	Positiivne	Positiivne
586	C3	HPV 45	0	Negatiivne	Negatiivne
666	D3	HPV 45	10	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
753	E3	HPV 45	10	Positiivne	Positiivne
854	F3	HPV 45	10	Positiivne	Positiivne
21	G3	HPV 51	7,41	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
114	H3	HPV 51	10	Positiivne	Nõrk/Negatiivne
17	A4	HPV 52	10	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
104	B4	HPV 52	4,42	Positiivne	Positiivne
715	C4	HPV 52	0	Negatiivne	Negatiivne
106	D4	HPV 58	2,19	Positiivne	Positiivne
559	E4	HPV 58	1,63	Positiivne	Positiivne

633	F4	HPV 58	10	Negatiivne	Negatiivne
784	G4	HPV 58	7,08	Negatiivne	Negatiivne
861	H4	HPV 66	3,95	Positiivne	Positiivne
576	A5	HPV 68	8,39	Negatiivne	Negatiivne
628	B5	HPV 68	10	Negatiivne	Negatiivne
964	C5	HPV 16 ja 18	2,72	Positiivne	Positiivne
948	D5	HPV 16 ja 33	10	Positiivne	Positiivne
771	E5	HPV 16 ja 35	2,82	Positiivne	Positiivne
986	F5	HPV 16 ja 35	2,71	Positiivne	Positiivne
968	G5	HPV 16 ja 35	10	Positiivne	Nõrk/Negatiivne
783	H5	HPV 16, 31 ja 33	8,53	Positiivne	Positiivne
689	A6	HPV 16, 31 ja 59	10	Positiivne	Positiivne
562	B6	HPV 18 ja 52	6,64	Positiivne	Positiivne
75	C6	HPV 31 ja 56	1,35	Positiivne	Positiivne
10	D6	HPV 33, 52 ja 68	4,91	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
419	E6	HPV 39 ja 45	10	Negatiivne	Negatiivne
563	F6	HPV 45 ja 52	0	Positiivne	Positiivne
985	G6	HPV 45 ja 52	9,32	Positiivne	Positiivne
798	H6	HPV 56 ja 58	0	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
874	A7	HPV 56 ja 68	10	Positiivne	Positiivne
945	B7	HPV 58 ja 59	5,27	Positiivne	Positiivne
332	C7	Negatiivne	0	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
335	D7	Negatiivne	0	Negatiivne	Negatiivne
340	E7	Negatiivne	2,12	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
341	F7	Negatiivne	10	Negatiivne	Negatiivne
342	G7	Negatiivne	10	Negatiivne	Negatiivne
343	H7	Negatiivne	7,28	Negatiivne	Negatiivne
344	A8	Negatiivne	0	Negatiivne	Negatiivne
345	B8	Negatiivne	2,91	Negatiivne	Negatiivne
346	C8	Negatiivne	10	Negatiivne	Negatiivne
347	D8	Negatiivne	0	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
362	E8	Negatiivne	3,95	Negatiivne	Negatiivne
373	F8	Negatiivne	9,11	Negatiivne	Negatiivne
376	G8	Negatiivne	10	Negatiivne	Negatiivne

381	H8	Negatiivne	0	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
383	A9	Negatiivne	1,68	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
387	B9	Negatiivne	10	Negatiivne	Negatiivne
411	C9	Negatiivne	9,97	Negatiivne	Negatiivne
414	D9	Negatiivne	1,63	Negatiivne	Negatiivne

Tabel 3. Pärnu Haiglast pärit proovid, nende HPV genotüüp, Qubit-ga mõõdetud kontsentratsioon, reaalaja PCR-i läbiviimisel saadud tulemus ning konventsionaalse PCR-i läbiviimisel saadud tulemus.

Proovi ID	Positsioon	HPV tüüp	Mõõdetud kontsentratsioon (ng/μl)	Reaalaja PCR-i tulemus	Elektroforeesi tulemus
407	A1	HPV 6	10	Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
26	B1	HPV 16	10	Positiivne	Positiivne
430	C1	HPV 16	10	Positiivne	Positiivne
587	D1	HPV 16	10	Positiivne	Positiivne
671	E1	HPV 16	10	Positiivne	Positiivne
896	F1	HPV 16	10	Positiivne	Nõrk/Negatiivne
763	G1	HPV 31	10	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
863	H1	HPV 31	10	Positiivne	Negatiivne
A281	A2	HPV 33	10	Positiivne	Positiivne
814	B2	HPV 33	10	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
28	C2	HPV 45	10	Positiivne	Nõrk/Negatiivne
289	D2	HPV 53	6,18	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
378	E2	HPV 53	10	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
403	F2	HPV 56	7,34	Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
930	G2	HPV 58	10	Positiivne	Positiivne
446	H2	HPV 66	10	Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
537	A3	HPV 66	10	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
795	B3	HPV 66	10	Positiivne	Positiivne
871	C3	HPV 68	10	Negatiivne	Negatiivne
423	D3	HPV 69	10	Positiivne	Positiivne
216	E3	HPV 82	3,33	Negatiivne	Negatiivne

468	F3	HPV 6, 51 ja 58	9,46	Positiivne	Positiivne
287	G3	HPV 16 ja 18	5,34	Positiivne	Positiivne
41	H3	HPV 16 ja 52	10	Positiivne	Positiivne
347	A4	HPV 16, 44 ja 51	10	Positiivne	Positiivne
317	B4	HPV 16, 45 ja 68	10	Positiivne	Positiivne
A373	C4	HPV 18, 33 ja 66	10	Positiivne	Positiivne
293	D4	HPV 18, 42 ja 52	10	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
850	E4	HPV 31 ja 51	10	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
318	F4	HPV 31, 42 ja 70	10	Positiivne	Nõrk/Negatiivne
961	G4	HPV 31, 51 ja 68	10	Positiivne	Nõrk/Negatiivne
74	H4	HPV 33 ja 68	10	Positiivne	Positiivne
479	A5	HPV 33 ja 70	10	Positiivne	Positiivne
525	B5	HPV 39 ja 42	10	Positiivne	Nõrk/Negatiivne
366	C5	HPV 45 ja 54	10	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
255	D5	HPV 51 ja 6	10	Positiivne	Positiivne
483	E5	HPV 58 ja 70	9,3	Positiivne	Positiivne
211	F5	Negatiivne	10	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
212	G5	Negatiivne	9,94	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
319	H5	Negatiivne	7,62	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
339	A6	Negatiivne	10	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
349	B6	Negatiivne	3,05	Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
381	C6	Negatiivne	10	Positiivne	Nõrk/Negatiivne
A381	D6	Negatiivne	10	Positiivne	Positiivne
510	E6	Negatiivne	10	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
535	F6	Negatiivne	10	Nõrk/Negatiivne	Nõrk/Negatiivne
544	G6	Negatiivne	10	Negatiivne	Negatiivne
593	H6	Negatiivne	10	Negatiivne	Negatiivne
815	A7	Negatiivne	10	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
851	B7	Negatiivne	3,55	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
864	C7	Negatiivne	10	Nõrk/Negatiivne	Negatiivne
895	D7	Negatiivne	10	Negatiivne	Negatiivne

2.4. Arutelu

Reaalaja PCR meetodil läbiviidud katsete järel saadi 87 positiivsest proovist positiivne tulemus vaid 57 proovi korral. Reaalaja PCR-i tulemuste kontrollimiseks läbiviidud konventsionaalse PCR-i ja geelelektroforeesi järel saadud positiivsete tulemuste arv oli veelgi väiksem – positiivse signaali andsid 48 proovi. Plasmiidsete kontrollide korral test aga töötas ning andis selgeid ja korrektseid tulemusi.

Üks põhjuseid, miks käesolevas töös kasutatud test iga proovi korral korrektseid tulemusi ei andud, võib peituda kliinilistes proovides. DNA-de geelipildilt ilmnes, et DNA-d olid enamjaolt hea kvaliteediga. Paraku puudub informatsioon selle kohta, kui suure osa kogu DNA-st moodustas HPV DNA. HPV DNA kogus proovides sõltub ilmselt proovi võtmisest ning sellest, kui palju HPV-ga nakatunud rakke proovi satub. Seega on võimalik, et mõnesse proovi võis sattuda HPV-ga nakatunud rakke rohkem ning need võisid seega anda ka paremaid ja selgemaid tulemusi PCR-il. Seevastu need proovid, kus võis leida vähem HPV DNA-d, võisid anda nii nõrga signaali, et seda ei õnnestunud detekteerida. Plasmiidsetes kontrollides leidis aga katsete edukaks teostamiseks piisavas koguses HPV DNA-d ning need andsid selgeid positiivseid tulemusi.

Põhjus, miks kõik proovid antud katsete korral korrektseid tulemusi ei andnud, võib peituda ka universaalsetes praimerites. HPV L1 regioonis paiknev sihtmärkjärjestus ning GP5+/GP6+ praimerite järjestused pole kõigi HPV tüüpide korral täielikult komplementaarsed. Järjestusi võrreldes võib, vastavalt HPV genotüübile, leida mitmetes positsioonides aluspaarilisi erinevusi. Jooniselt 3 on näha, et HPV-16 vastava piirkonna ning GP5+ praimeri järjestustes leidub vaid kaks erinevust ning GP6+ praimer on vastava järjestusega täiesti komplementaarne. Samas HPV-39 ja -51 korral ilmneb praimerite ja HPV tüüpide järjestuste vahel vastvalt 8 ja 10 aluspaarilist erinevust. Seega on võimalik, et GP5+/GP6+ konsensuspraimeereid kasutav test suudab paremini tuvastada neid HPV genotüüpe, mille korral leidub järjestuste vahel vähem erinevusi. Paraku ei saa seda aga käesolevas töös läbi viidud katsete põhjal kinnitada, kuna enamik HPV suhtes positiivseid proove sisaldas kahte või enam HPV tüüpi. Selleks, et kinnitada, et GP5+/GP6+ praimerid detekteerivad mõnda HPV genotüüpi halvemini, peaks viima läbi katsed, kus kasutatakse proove, mis sisaldavad vaid ühte HPV genotüüpi.

Haiglas kasutatavad diagnostilised testid sisaldavad aga tüübispetsiifilisi praimeereid, mis vastavad kindlale HPV genotüübile ning ühtivad vastava järjestusega täielikult. Seetõttu on võimalik, et tüübispetsiifilised praimerid suudavad ka väiksemast kogusest HPV DNA-st sihtmärki

amplifitseerida, samas kui universaalsed praimerid vajaksid suuremat HPV DNA kogust, et detekteeritavaid tulemusi anda.

Tulemusi analüüsidest ilmnes proov, mis oli eelnevalt diagnostilise testiga määratud negatiivseks, kuid andis nüüd nii reaalaja kui konventsionaalse PCR-i käigus positiivse tulemuse. Nagu eespool kirjeldatud, kasutatakse kommertsiaalsetes *kit*-ides tüübispetsiifilisi primereid. Need praimerid on spetsiifilised vaid nendele konkreetsetele HPV tüüpidele, mille detekteerimisele vastav *kit* suunatud on. Kui proovis leidub selline HPV genotüüp, millele vastavaid primereid *kit* ei sisalda, siis ei ole antud *kit* võimeline seda tüüpi detekteerima ning tulemuseks saadakse, et proov on HPV suhtes negatiivne. Käesolevas töös sooritatud katsetes kasutatakse aga universaalseid primereid, mis on võimelised tuvastama paljusid erinevaid HPV genotüüpe. Seega võimaldab antud test tuvastada ka HPV tüüpe, mida kommertsiaalsed *kit*-id tuvastada ei suuda. Seetõttu ongi võimalik, et antud proov andis käesolevas töös positiivse signaali, kuid kommertsiaalse *kit*-iga negatiivse tulemuse.

Küsimusi tekitas ka paljude proovide korral esinenud lisapiik dissotsiatsioonigraafikul 65 - 66°C juures. Kuna antud piik asetseb 70 - 76°C juures paikneva piigiga võrreldes madalamal temperatuuril ning oli ka esimesest piigist lamedam, arvati, et tegemist võib olla primerite dimeeriga. Üllatuslikult ei esinenud piik aga kõikide proovide korral. Konventsionaalse PCR-i järgsel geelelektroforeesil oli paljude proovide puhul detekteeritav umbes 100 aluspaari suurune nõrk fragment. Antud fragment ilmnes ka mõndade negatiivsete proovide korral. On tõenäoline, et need fragmendid vastavad PCR produktidele, mis avaldusid dissotsiatsioonigraafikul teise piigina. Arvestades, et primerite pikkused on 23 ja 25 aluspaari, on need fragmendid tunduvalt suuremad, kui primerite dimeeridest võiks oodata. Seetõttu ei saa välistada võimalust, et tegemist võib olla mittespetsiifiliste produktidega. Kuna ei ole kindlalt teada, mis on kirjeldatud piigi ja fragmendi põhjustajaks, loeti need HPV olemasolu detekteerimise seisukohast ebaolulisteks ning tulemusi analüüsidest neid ei arvestatud.

Kuigi käesolevas töös ei õnnestunud GP5+/GP6+ primeritega proovidest HPV-d edukalt tuvastada, on välja töötatud kommertsiaalseid *kit*-e, kus HPV DNA amplifitseerimiseks rakendatakse GP5+/GP6+ konsensusprimereid. Selline *kit* on näiteks *EIA kit HPV GP HR* (Diassay), mis on leidnud laialdast kasutust.

Ühtlasi on teostatud mitmeid töid, kus katsed HPV tuvastamiseks GP5+/GP6+ primeritega on olnud edukamad. de Araujo ja kolleegide poolt läbi viidud reaalaja PCR-i katses kasutati 153 eelnevalt HPV suhtes testitud DNA-d, millest 104 olid HPV suhtes positiivsed ja 49 HPV suhtes

negatiivsed. Positiivsete kontrollidena kasutati HPV-16 sisaldavatest SiHa ja CaSki emakakaela kartsinoomi rakuliinidest pärit DNA-d.

Iga reaktsioon viidi läbi kahes korduses. Reaktsiooni lõppmahuks oli 25 µl ning DNA-d lisati reaktsioonisegusse vaid 1 µl. DNA visualiseerimiseks kasutati ühendit *SYBR Green*. Reaalaja PCR-i protokoll oli aga järgmine: algne denaturatsioon 90 sekundi jooksul 95°C juures, millele järgnes denaturatsioon 15 sekundi jooksul 94°C juures ja praimerite seondumine 30 sekundi jooksul 48°C juures. Kahte viimast etappi viidi läbi 50 tsükli. Pärast amplifikatsiooni koostati dissotsiatsioonikõver, mille analüüs viidi igas eksperimendis läbi vahemikus 65 - 95°C. Et kontrollida reaalaja PCR-il saadud tulemusi, viidi läbi ka geelelektroforees 2% agarosgeelil.

Positiivseks loeti proovid, mille T_m oli vahemikus 77 - 82°C ning kõik amplikonid, mille T_m paiknes selles vahemikus omasid geelil 150 aluspaari suurust selget fragmenti. Proovid, mille T_m oli 70°C juures viitasid, kas mittespetsiifilistele PCR produktidele või praimerite dimeeridele. Seda kinnitas ka elektroforees. HPV suhtes negatiivseteks loeti proovid, millel piigid puudusid, mille piigid olid lamedad või mille T_m oli väljaspool 77 - 82°C vahemikku. 104 HPV suhtes positiivsest proovist, andsid antud katses positiivse tulemuse 100 proovi ning kõik 49 HPV negatiivset proovi, andsid negatiivse signaali.

de Araujo ja kolleegide poolt läbi viidud katsetes saadi võrreldes käesolevas töös teostatud katsetega tunduvalt paremad tulemused. Saadi vaid 4 valenegatiivset tulemust, samas kui käesolevas töös saadi reaalaja PCR-i järgselt 30 valenegatiivset tulemust. Valenegatiivsete tulemuste võimalikuks põhjuseks pidasid artikli autorid vähest HPV DNA kogust proovis, mis võis olla ka üheks põhjuseks, miks käesolevas töös kõik katsed ei õnnestunud.

Ka reaktsioonitingimustes leidis mitmeid erinevusi. Artiklis kirjeldatud töös oli praimerite seondumistemperatuuriks 48°C ning viidi läbi 50 PCR-i tsükli. Seevastu käesolevas töös andis kõige paremaid tulemusi seondumistemperatuur 43°C, seondumistemperatuuri tõstmine tulemusi ei parandanud. Viidi läbi 40 PCR tsükli selgemate tulemuste saamiseks ja mittespetsiifiliste produktide akumulatsioonide vältimiseks. Ühtlasi erinesid veidi ka proovide T_m -id, kuid see on tõenäoliselt seotud reaktsioonikeskkondade erinevustega (de Araujo jt., 2009).

Võttes arvesse katsetes saadud tulemusi ning de Araujo ja kolleegide artiklit, võib oletada, et põhjus, miks ei suudetud paljudest HPV suhtes positiivsetest proovidest HPV olemasolu tuvastada, ei seisne tõenäoliselt ebasobivates reaktsioonitingimustes. Seda mõtet toetab asjaolu, et positiivsete kontrollidega töötas test veatult ning andis korrektseid tulemusi. Pigem võib probleemiks olla HPV DNA vähene kogus proovides ning praimerite suutmatuse sihtmärki piisavalt amplifitseerida.

Sellest võib kokkuvõtvalt järeldada, et GP5+/GP6+ praimerid ei sobi HPV tuvastamiseks kliinilistest proovidest.

Tulevikus võiks tõenäoliselt katsetada nested-PCR-i läbiviimist. Nested-PCR hõlmab kahte järjestikust PCR reaktsiooni, milles kasutatakse kahte erinevat praimeripaari. Esimeses reaktsioonis amplifitseeritakse kindlat DNA regiooni. Seejärel teostatakse teine reaktsioon, kus amplifitseeritakse sihtmärki, mis paikneb esimese PCR reaktsiooni produkti sees. Esimeses reaktsioonis oleks võimalik kasutada konsensuspraimerite paari MY09/MY11, mille ampliconi suurus on umbes 450 aluspaari. Teises reaktsioonis võiks kasutada GP5+/GP6+ praimereid, mille ampliconi suurus on umbes 150 aluspaari. Seejärel oleks võimalik saadud tulemusi võrrelda käesolevas töös saadud tulemustega ning otsustada, kas suudeti suurendada testi tundlikkust.

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö teoreetilises osas anti ülevaade inimese papilloomiviirusest, keskendudes selle elutsüklile, detekteerimisvõimalustele ning seotusele emakakaelavähiga.

Eksperimentaalses osas keskenduti HPV tuvastamisele kliinilistest proovidest reaallaja PCR-i meetodil, kasutades GP5+/GP6+ konsensuspraimereid. Kliinilised DNA proovid pärinesid Lääne-Tallinna Keskhaiglast ning Pärnu Haiglast. Töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas GP5+/GP6+ praimeritega on võimalik kliinilistest proovidest HPV-d usaldusväärset tuvastada. Katsete käigus optimeeriti mitmeid reaktsioonitingimusi. Reaallaja PCR-i tulemuste kontrollimiseks viidi läbi konventsionaalne PCR ning agaros-geelelektroforees.

Reaallaja PCR-i meetodil teostatud katsete tulemusena saadi 87 HPV suhtes positiivsest proovist positiivne tulemus 57 korral. Konventsionaalse PCR-i järel saadi positiivseid tulemusi veelgi vähem – positiivse signaali andsid vaid 48 proovi. Positiivsete kontrollide puhul töötas test aga alati veatult ning andis selgeid tulemusi.

Põhjused, miks katsed kõikide proovide korral ei õnnestunud, võivad tõenäoliselt seisneda ebapiisavas HPV DNA koguses proovides või GP5+/GP6+ konsensuspraimerites. GP5+/GP6+ praimerite järjestused ning erinevate HPV genotüüpide vastavad järjestused pole täiesti komplementaarsed. Seega võis PCR reaktsioon paremini õnnestuda nende proovide korral, mis sisaldasid genotüüpi, mille vastava järjestuse ja konsensuspraimerite vahel leidub vähem erinevusi. Tuvastati ka proov, mis oli eelnevalt diagnostilise testiga määratud negatiivseks, kuid käesoleva töö käigus sooritatud katsetes andis positiivse tulemuse. Selle põhjuseks võib olla asjaolu, et antud proov võis sisaldada HPV genotüüpi, mille detekteerimiseks pole haiglas kasutatav diagnostiline *kit* disainitud ning seega ei suuda *kit* antud proovist HPV-d ka tuvastada.

Saadud tulemuste põhjal võib järeldada, et GP5+/GP6+ konsensuspraimereid üksi ei sobi HPV detekteerimiseks kliinilistest proovidest. Tulevikus võiks tõenäoliselt katsetada nested-PCR-i teostamist, kasutades lisaks GP5+/GP6+ praimeripaarile ka teist konsensuspraimerite paari MY09+/MY11+. Seejärel võiks saadud tulemusi võrrelda käesolevas töös saadud tulemustega ning selgitada, kas testi tundlikkus suurenes.

The detection of HPV in clinical samples using real-time PCR with GP5+/GP6+ primers

Maria Vares

SUMMARY

Human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted infection. There are more than 40 types of HPV that infect the genital areas. HPV viruses can be divided into low-risk and high-risk types based on their potential to cause cervical cancer. Almost all cases of cervical cancer are caused by HPV infection. Early detection of high-risk HPV types could decrease the incidence of cervical cancer and save lives.

The purpose of this study was to detect HPV in clinical samples using real-time PCR with GP5+/GP6+ consensus primers. In addition to real-time PCR, conventional PCR and agarose gel electrophoresis were performed. Clinical samples used in this study were obtained from West-Tallinn Central Hospital and Pärnu Hospital. All samples had previously been tested for HPV positivity by using diagnostic kits.

The results showed that out of 87 HPV samples classified as positive by diagnostic kit, 57 samples were also determined to be positive by real-time PCR and 48 samples determined to be positive by conventional PCR. This test worked faultlessly with positive controls and gave clear positive results.

The reason why this test failed to work correctly in all samples may be due to a low HPV DNA amount in samples. It could also be due to GP5+/GP6+ primers because there is a possibility that these primers are able to amplify some HPV genotypes better than other genotypes.

Also a sample that was proven to be negative by diagnostic test but in this test gave positive results, was detected. This discrepancy may occur due to a possibility that this sample might have contained HPV genotypes that particular diagnostic kit was not designed to detect and therefore couldn't determine HPV from this sample.

Based on the results obtained in this study, it can be concluded that GP5+/GP6+ primers alone are not suitable for HPV detection in clinical samples. In the future, nested-PCR which uses a second primer pair MY09+/MY11+ in addition to GP5+/GP6+ primers, should probably be performed. The results could be compared with the results obtained from this work and determine whether the sensitivity of the test has increased.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajat professor Andres Metspalu magistritöö juhendamise eest. Samuti soovin tänada Steven Smiti igakülgse abi, väärtuslike nõuannete ja kommentaaride eest, ning Kristina Lokotari abi eest katsete läbiviimisel. Ühtlasi tahan tänada Helen Uibopuud Lääne-Tallinna Keskhaiglast ning Elve Raukast Pärnu Haiglast käesolevas töös kasutatud kliiniliste proovide eest.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Abreu, A. L. P., Souza, R. P., Gimenes, F., Consolaro, M. E. L. (2012). A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Viol. J.* 9: 262.

Apt, D., Watts, R.M., Suske, G., Bernard, U. (1996). High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transcription correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology* 224: 281–291.

Bachmann, M. F., Rohrer, U. H., Kundig, T. M., Burki, K., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. (1993). The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 262: 1448–1451.

Baker, T.S., Newcomb, W.W., Olson, N.H., Cowser, L.M., Olson, C., Brown, J.C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.* 60: 1445–1456.

Barbosa, M. S., Lowy, D. R., Schiller, J. T. (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J. Virol.* 63: 1404–1407.

Belinson, S. E., Belinson, J. L. (2010). Human Papillomavirus DNA Testing for Cervical Cancer Screening. *Mol. Diagn. Ther.* 14: 215-222.

Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., de Villiers, E. M. (2010). Classification of Papillomaviruses (PVs) based on 189 types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401: 70–79.

Bosch, F. X., Burchell, A. N., Schiffman, M., Giuliano, A. R., de Sanjose, S., Bruni, L., Tortolero-Luna, G., Kjaer, S. K., Muñoz, N. (2008). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine*, 26: 1–16.

Bozzetti, M., Nonnenmacher, B., Mielzinska, I., Villa, L., Lorincz, A., Breitenbach, V., Prolla, J. (2000). Comparison between Hybrid Capture II and polymerase chain reaction results among women at low-risk for cervical cancer. *Ann. Epidemiol.* 10: 466.

Bouvard, V. (1994). Characterization of the human papillomavirus E2 protein: evidence of transactivation and trans-repression in cervical keratinocytes. *EMBO J.* 13: 5451–5459.

Bravo, I. G., Alonso, A. (2004). Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth. *J. Virol.* 78: 13613–13626.

Burd, E.M. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 1-17.

Bryan, J. T., Brown, D. R. (2000). Association of the human papillomavirus type 11 E1/E4 protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. *Virology* 277: 262–269.

Bryan, J. T., Brown, D. R. (2001). Transmission of human papilloma virus type 11 infection by desquamated cornified cells. *Virology* 281: 35–42.

Carvalho, N. O., del Castillo, D. M., Perone, C., Januário, J. N., Melo, V. H., Brasileiro Filho, G. (2010). Comparison of HPV genotyping by type-specific PCR and sequencing. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105: 73–78.

Castellsagué, X. (2008). Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 110: S4–7.

Castle, P. E., Schiffman, M., Burk, R. D., Wacholder, S., Hildesheim, A., Herrero, R., Bratti, M. C., Sherman, M. E., Lorincz, A. (2002). Restricted cross-reactivity of Hybrid Capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11: 1394–1399.

Castle, P. E., Solomon, D., Wheeler, C. M., Wheeler, C. M., Gravitt, P. E., Wacholder, S., Schiffman, M. (2008). Human papillomavirus genotype specificity of Hybrid capture 2. *J. Clin. Microbiol.*, 46: 2595–2604.

Castro, T. P., Busolotti, I. (2006). Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral and oropharynx. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2: 1–14.

Cheng, Y. W, Wu, M. F., Wang, J., Yeh, K. T., Goan, Y. G., Chiou, H. L., Chen, C. Y., Lee, H. (2007). Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation. *Cancer Res.* 67: 10686–10693.

Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24: 2796–2809.

Cole, S. T., Danos, O. (1987). Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome: phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J. Mol. Biol.* 193: 599–608.

Cooper, B., Brimer, N., Vande Pol, S. B. (2007). Human papillomavirus E6 regulates the cytoskeleton dynamics of keratinocytes through targeted degradation of p53. *J. Virol.* 81: 12675–12679.

Cope, J. U., Hildesheim, A., Schiffman, M. H., Manos, M. M., Lorincz, A. T., Burk, R. D., Glass, A. G., Greer, C., Buckland, J., Helgesed, K., Scott, D. R., Sherman, M. E., Kurman, R. J., Liaw, K. L. (1997). Comparison of the Hybrid Capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 35: 262–265.

Corden, S. (1999). The integration of HPV-18 DNA in cervical carcinoma. *Mol. Pathol.* 52: 275–282.

Coser, J., Boeira, T. R., Fonseca, A. S., Ikuta, N., Lunge, V. R. (2011). Human papillomavirus detection and typing using a nested-PCR-RFLP assay. *Braz. J. Infect. Dis.* 15: 467–472.

Cubie, H. A., Norval, M. (1989). Detection of human papillomaviruses in paraffin wax sections with biotinylated synthetic oligonucleotide probes and immunogold staining. *J. Clin. Pathol.* 42: 988–991.

Cubie, H. A., Cuschieri, K. (2013). Understanding HPV tests and their appropriate applications. *Cytopathology*, 24: 289–308.

Day, P. M., Baker, C. C., Lowy, D. R., Schiller, J. T. (2004). Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. *PNAS*, 101: 14252–14257.

Davy, C., Doorbar, J. (2007). G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology* 368: 219–226.

de Araujo, M. R., De Marco, L., Fisher Rubira-Bullen, I. R., Ronco, G., Pennini, I., Vizzini, L., Merletti, F., Gillio-Tos, A. (2009). GP5+/6+ SYBR Green methodology for simultaneous screening and quantification of human papillomavirus. *J. Clin. Virol.* 45: 90 – 95.

de Roda Husman, A. M., Walboomers, J. M., van den Brule, A. J., Meijer, C. J., Snijders, P. J. (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J. Gen. Virol.* 76: 1057 – 1062.

Derchain, S. F. M., Longatto Filho, A., Syrjanen, K. J. (2005). Neoplasia intra-epitelial cervical: diagnóstico e tratamento. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 27: 425–433.

Dimova, D. K., Dyson, N. J. (2005). The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 24: 2810–2826.

Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol.* 32: 7–15.

Doorbar, J. (2013). The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* 445: 80–98.

Dyson, N. (1998), The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12: 2245–2262.

Erickson, B. K., Alvarez, R. D., Huh, W. K. (2013). Human Papillomavirus: What Every Provider Should Know. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 208: 169–175.

Florin, L., Schäfer, F., Sotlar, K., Streeck, R. E., Sapp, M. (2002). Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein I2. *Virology* 295: 97–107.

Forinash, A. B., Yancey, A. M., Pitlick, J. M., Myles, T. D. (2011). Safety of the HPV bivalent and quadrivalent vaccines during pregnancy (February). *Ann. Pharmacother.* 45: 258–262.

Foster, S. A., Demers, G. W., Etscheid, B. G., Galloway, D. A. (1994). The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J. Virol.* 68: 5698–5705.

Frattini, M. G., Laimins, L. A. (1994). Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 12398–12402.

Frattini, M. G., Laimins, L. A. (1994). The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology* 204: 799–804.

Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., Espling, E., Stillman, B., Galloway, D. A. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by inter-action with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes. Dev.* 11: 2090–2100.

Ganguly, N., Parihar, S. P. (2009). Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J. Biosci.* 34: 113–123.

Gewin, L., Galloway, D. A. (2001). E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J. Virol.* 75: 7198–7201.

Gonzalez, S. L., Stremlau, M., He, X., Basile, J. R., Münger, K. (2001). Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J. Virol.* 75: 7583–7591.

Gravitt, P. E., Peyton, C. L., Alessi, T. Q., Wheeler, C. M., Coutlée, F., Hildesheim, A., Schiffman, M. H., Scott, D. R., Apple, R. J. (2000). Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 38: 357–361.

Greenblatt, R. J. (2005). Human papillomaviruses: diseases, diagnosis, and a possible vaccine. *Clin. Microbiol. Newsletter* 27: 139–145.

Haie-Meder, C., Morice, P., Castiglione, M. (2010). Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.*, 21: 37–40.

Hausen, H. Z. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 690–698.

Harper, D. M., Longacre, M. R., Noll, W. W., Belloni, D. R., Cole, B. F. (2003). Factors affecting the detection rate of human papillomavirus. *Ann Fam Med* 1: 221–227.

Havre, P. A., Yuan, J., Hedrick, L., Cho, K. R., Glazer, P. M. (1995). p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res.* 55: 4420–4424.

Hebner, C. M., Laimins, L. A. (2006). Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev. Med. Virol.* 16: 83–97.

Hebner, C., Beglin, M., Laimins, L. A. (2007). Human papillomavirus E6 proteins mediate resistance to interferon-induced growth arrest through inhibition of p53 acetylation. *J. Virol.* 81: 12740–12747.

Hesselink, A. T., van den Brule, A. J., Brink, A. A., Berkhof, J., van Kemenade, F. J., Verheijen, R. H., Snijders, P. J. (2004). Comparison of hybrid capture 2 with in situ hybridization for the detection of high-risk human papillomavirus in liquid-based cervical samples. *Cancer* 102: 11–18.

Hesselink, A. T., van den Brule, A. J., Groothuismink, Z. M., Molani, M., Berkhof, J., Meijer, C. J., Snijders, P. J. (2005). Comparison of three different PCR methods for quantifying human papillomavirus type 16 DNA in cervical scrape specimens. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4868–4871.

Hildesheim, A., Schiffman, M. H., Gravitt, P. E., Glass, A. G., Greer, C. E., Zhang, T., Scott, D. R., Rush, B. R., Lawler, P., Sherman, M. E., Kurman, R. J., Manos, M. M. (1994). Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J. Infect. Dis.* 169: 235–240.

Howley, P. M. 1996. Papillomaviridae: the viruses and their replication, p. 947-978. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.

Huang, P. S., Patrick, D. R., Edwards, G., Goodhart, P. J., Huber, H. E., Miles, L., Garsky, V. M., Oliff, A., Heimbrook, D. C. (1993). Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Mol. Cell Biol.* 13: 953–960.

Hubbard, R. A. (2003). Human Papillomavirus Testing Methods. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 127: 940–945.

Huh, K., Zhou, X., Hayakawa, H., Cho, J. Y., Libermann, T. A., Jin, J. (2007). Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J. Virol.* 81: 9737–9747.

Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Howley, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* 10: 4129–4136.

Hwang, S. J., Shroyer, K. R. (2012). Biomarkers of cervical dysplasia and carcinoma. *J. Oncol.* 507286.

Jeon, S., Allen-Hoffmann, B., Lambert, P. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J. Virol.* 69: 2989–2997.

Jeon, S., Lambert, P. F. (1995). Integration of human papilloma virus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1654–1658.

Jo, H., Kim, J.W. (2005). Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Ther.* 3: 419–434.

Jones, D. L., Alani, R. M., Munger, K. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 11: 2101–2111.

Jones, D. L., Thompson, D.A., Munger, K. (1997). Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology* 239: 97–107.

Josefsson, A., Livak, K., Gyllensten, U. (1999). Detection and quantitation of human papillomavirus by using the fluorescent 5' exonuclease assay. *J. Clin. Microbiol.* 37: 490–496.

Kessis, T. D., Connolly, D. C., Hedrick, L., Cho, K. R. (1996). Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA. *Oncogene* 13: 427–431.

Kiyono, T., Foster, S. A. Koop, J. I., McDougall, J. K., Galloway, D. A. Klingelutz, A. J. (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396: 84–88.

Klingelutz, A. J., Foster, S. A., McDougall, J. K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380: 79–82.

Kuo, S. R., Liu, J. S., Broker, T. R., Chow, L.T. (1994). Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *J. Biol. Chem.* 269: 24058–24065.

Longworth, M. S., Laimins, L.A. (2004). Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 362–372.

Lorincz, A. T. (1996). Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 22: 629–636.

Lusky, M., Hurwitz, J., Seo, Y. S. (1993). Cooperative assembly of the bovine papilloma virus E1 and E2 proteins on the replication origin requires an intact E2 binding site. *J. Biol. Chem.* 268: 15795–15803.

Mammas, I.N., Sourvinos, G., Spandidos, D.A. (2011). Vaccination against human papilloma virus (HPV):epidemiological evidence of HPV in nongenital cancers. *Pathol. Oncol. Res.* 17: 103-119.

Mammas, I.N., Spandidos, D.A., Sourvinos, G. (2014). Genomic diversity of human papillomaviruses (HPV) and clinical implications: An overview in adulthood and childhood. *Infect. Genet. Evol.* 21: 220–226.

Masterson, P. J., Stanley, M. A., Lewis, A. P., Romanos, M. A. (1998). A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit. *J. Virol.* 72: 7407–7419.

McGraw, S. L., Ferrante, J. M. (2014). Update on prevention and screening of cervical cancer. *World J. Clin. Oncol.* 5: 744–752.

Moberg, M., Gustavsson, I., Gyllensten, U. (2003). Real-time PCR-based system for simultaneous quantification of human papillomavirus types associated with high risk of cervical cancer. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3221–3228.

Mohr, I. J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E. J., MacPherson, P., Botchan, M. R. (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250: 1694–1699.

Molijn, A., Kleter, B., Quint, W., van Doorn, L.-J. (2005). Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J. Clin. Virol.* 32: 43–51.

Motoyama, S., Ladines-Llave, C. A., Luis Villanueva, S. and Maruo, T. (2004). The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J. Med. Sci.* 50: 9–19.

Munger, K., Howley, P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 89: 213–228.

Nakahara, T., Peh, W. L., Doorbar, J., Lee, D., Lambert, P. F. (2005). Human papillomavirus type 16 E1/E4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *J. Virol.* 79: 13150–13165.

Nobbenhuis, M. A., Walboomers, J. M., Helmerhorst, T. J., (1999). Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: a prospective study. *Lancet* 354: 20–25.

Oh, S. T., Kyo, S., Laimins, L. A. (2001). Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J. Virol.* 75: 5559–5566.

- Ozbum, M., Meyers, C. (1997). Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J. Virol.* 71: 5161–5172.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* 55: 74-108.
- Peh, W.L., Brandsma, J. L., Christensen, N. D., Cladel, N. M., Wu, X., Doorbar, J. (2004). The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *J. Virol.* 78: 2142–2151.
- Pett, M. R., Alazawi, W. O., Roberts, I., Downen, S., Smith, D. I., Stanley, M. A., Coleman, N. (2004). Acquisition of high-level chromosomal instability is associated with integration of human papillomavirus type 16 in cervical keratinocytes. *Cancer Res.* 64: 1359–1368.
- Phelps, W. C., Münger, K., Yee, C. L., Barnes, J. A., Howley, P. M. (1992). Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J. Virol.* 66: 2418–2427.
- Pinto, A. P., Degen, M., Villa, L. L., Cibas, E. S. (2012). Immunomarkers in gynecologic cytology: the search for the ideal biomolecular Papanicolaou test. *Acta Cytol.* 56: 109–121.
- Poljak, M., Marin, I. J., Seme, K., Vince, A. (2002). Hybrid Capture II HPV test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *J. Clin. Virol.* 25: 89–97.
- Poljak, M., Kocjan, B. J. (2010). Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 8: 1139-1162.
- Quint, W. G. V., Scholte, G., van Doorn, L. J., Kleter, B., Smits, P. H. M., Lindeman, J. (2001). Comparative analysis of human papillomavirus infections in cervical scrapes and biopsy specimens by general SPF10 PCR and HPV genotyping. *J. Pathol.* 194: 154–158.

Sanders, C. M., Stenlund, A. (2000). Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. *J. Biol. Chem.* 275: 3522–3534.

Sapp, M., Volpers, C., Muller, M., Streck, R.E. (1995). Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 76: 2407–2412.

Saslow, D., Solomon D., Lawson, H. W., Killackey, M., Kulasingam, S. L., Cain, J., Garcia, F. A., Moriarty, A. T., Waxman, A. G., Wilbur, D. C., Wentzensen, N., Downs Jr., L. S., Spitzer, M., Moscicki, A. B., Franco, E. L., Stoler, M. H., Schiffman, M., Castle, P. E., Myers, E. R. (2012). ACS-ASCCP-ASCP Cervical Cancer Guideline Committee, American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J. Clin.* 62: 147–172.

Schaeffer, A. J., Nguyen, M., Liem, A., Lee, D., Montagna, C., Lambert, P. F., Ried, T., Difilippantonio, M. J. (2004). E6 and E7 oncoproteins induce distinct patterns of chromosomal aneuploidy in skin tumors from transgenic mice. *Cancer Res.* 64: 538–546.

Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129–1136.

Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75: 495–505.

Schiffman, M., Herrero, R., Desalle, R., Hildesheim, A., Wacholder, S., Rodriguez, A. C., Bratti, M. C., Sherman, M. E., Morales, J., Guillen, D., Alfaro, M., Hutchinson, M., Wright, T. C., Solomon, D., Chen, Z., Schussler, J., Castle, P. E., Burk, R. D. (2005). The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 337: 76–84.

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

Schiller, J. T., Lowy, D. R. (2012). Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nature Rev Microbiol.* 10: 681–692.

Schmitt, A., Harry, J. B., Rapp, B., Wettstein, F. O., Iftner, T. (1994). Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7 protein of the low-risk human papillomavirus type 1. *J. Virol.* 68: 7051–7059.

Schmitz, M., Scheungraber, C., Herrmann, J., Teller, K., Gajda, M., Runnebaum, I. B., Dürst, M. (2009). Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. *J. Clin. Virol.* 44: 302–307.

Sedman, T., Sedman, J., Stenlund, A. (1997). Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. *J. Virol.* 71: 2887–2896.

Sekaric, P., Cherry, J. J., Androphy, E. J. (2008). Binding of human papillomavirus type 16E6 to E6AP is not required for activation of hTERT. *J. Virol.* 82: 71–76.

Sherman, M. E., Schiffman, M. H., Lorincz, A. T., Herrero, R., Hutchinson, M. L., Bratti, C. (1997). Cervical specimens collected in liquid buffer are suitable for both cytologic screening and ancillary human papillomavirus testing. *Cancer* 81: 89–97.

Slebos, R. J., Kesis, T. D., Chen, A. W., Han, S. M., Hedrick, L., Cho, K. R. (1995). Functional consequences of directed mutations in human papillomavirus E6 proteins: abrogation of p53-mediated cell cycle arrest correlates with p53 binding and degradation in vitro. *Virology* 208: 111–120.

Smits, H. L., Bollen, L. J., Tjong-A-Hung, S. P., Vonk, J., van der Velden, J., ten Kate, F. J., Kaan, J. A., Mol, B. W., Ter Schegget, J. (1995). Intermethod variation in detection of human papillomavirus DNA in cervical smears. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2631–2636.

Stanley, M. (2010). HPV-immune response to infection and vaccination. *Infect. Agent. Cancer* 20: 5–19.

Stoppler, H., Hartmann, D. P., Sherman, L., Schlegel R. (1997). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere length. *J. Biol. Chem.* 272: 13332–13337.

Stubenrauch, F., Laimins, L. A. (1999). Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin. Cancer Biol.* 9: 379–386.

Subramanian, S., Bonen, L. (2006). Rapid evolution in sequence and length of the nuclear-located gene for mitochondrial L2 ribosomal protein in cereals. *Genome* 49: 275-281.

Swan, D. C., Tucker, R. A., Tortolero-Luna, G., Mitchell, M. F., Wideroff, L., Unger, E. R., Nisenbaum, R. A., Reeves, W. C., Icenogle, J. P. (1999). Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1030-1034.

Zerfaß-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J., Jansen-Dürr, P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 13: 2323–2330.

Zhang, B., Chen, W., Roman, A. (2006). The E7 proteins of low- and high-risk humanpapillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 fordegradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103: 437–442.

Zhou, J., Sun, X. Y., Louis, K., Frazer, I. H. (1994). Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J. Virol.* 68: 619–625.

Thomas, J. T., Laimins, L. A. (1998). Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *J. Virol.* 72: 1131–1137.

Thorland, E. C., Myers, S. L., Gostout, B. S., Smith, D. I. (2003). Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumours. *Oncogene* 22: 1225–1237.

Tieben, L. M., ter Schegget, J., Minnaar, R. P., Bouwes Bavinck, J., Berkhout, R. J., Vermeer, B. J., Jebbink, M. F., Smits, H. L. (1993). Detection of cutaneous and genital HPV types in clinical samples by PCR using consensus primers. *J. Virol. Methods* 42: 265–279.

Torres, M., Fraile, L., Echevarria, J. M., Hernandez Novoa, B., Ortiz, M. (2012). Human papillomavirus (HPV) genotyping: automation and application in routine laboratory testing. *Open. Virol. J.* 6: 144–150.

Trottier, H., Mahmud, S., Costa, M. C., Sobrinho, J. P., Duarte-Franco, E., Rohan, T. E., Ferenczy, A., Villa, L. L., Franco, E. L. (2006). Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15: 1274–1280.

Unger, E. R., Budgeon, L. R., Myerson, D., Brigati, D. J. (1986). Viral diagnosis by in situ hybridisation. *Am. J. Surg. Pathol.* 10: 1–8.

van Ham, M. A., Melchers, W. J., Hanselaar, A. G., Bekkers, R. L., Boonstra, H., Massuger, L. F. (2002). Fluctuations in prevalence of cervical human papillomavirus in women frequently sampled during a single menstrual cycle. *Br. J. Cancer* 87: 373–376.

van Hamont, D., Bekkers, R. L. M., Massuger L. F. A. G., Melchers W. J. G. (2008). Detection, management, and follow-up of pre-malignant cervical lesions and the role for human papillomavirus. *Rev. Med. Virol.* 18: 117–132.

Veldman, T., Horikawa, I., Barrett, J. C., Schlegel, R. (2001). Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J. Virol.* 75: 4467–4472.

Veldman, T., Liu, X., Yuan, H., Schlegel, R. (2003). Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100: 8211–8216.

Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J. F., Peto, J., Meijer, C. J. L. M., Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189: 12–19.

Wang, J. W., Roden, R. B. S. (2014). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology* 445: 175–186.

Watt, F. M. (1998). Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353: 831–837.

Werness, B. A., Levine, A. J., Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248: 76–79.

Wilson, R., Fehrmann, F., Laimins, L. A. (2005). Role of the E1/E4 protein in the differentiation-dependent life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 79: 6732–6740.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<http://www.cdc.gov/std/hpv/stdfact-hpv.htm>

http://www.cdc.gov/cancer/hpv/basic_info/

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>

<http://www.nsu.govt.nz/national-cervical-screening-programme/hpv-and-cervical-cancer>

<http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/cervical-cancer-statistics>

<http://www.tai.ee/tegevused/registrid/vahiregister/>

<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm426485.htm>

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/mono90.pdf>

http://www.cap.org/apps/cap.portal?_nfpb=true&cntvwrPtl{actionOverride}=%2Fportlets%2FcontentViewer%2Fshow&cntvwrPtl{actionForm.contentReference}=committees%2Ftechnology%2FHPV.html&_pageLabel=cntvwr

<http://www.fda.gov/medicaldevices/productsandmedicalprocedures/deviceapprovalsandclearances/recently-approveddevices/ucm082556.htm>

<http://www.hologic.com/products/physicians-office-testing/cervical-health/cervista-hpv-tests>

<http://www.uib.no/en/rg/molpat/81100/research-area>

<http://cancer.ee/info-vahist/vahipaikmed/emakakaelavahk/>

<https://www.arst.ee/et/Valdkonnad/d/11148/hpv/t/77>

<http://www.quattromed.ee/arstile/laboriteatmik/tulemusteinterpretatsioonid/nakkushaiguste-diagnostika/inimese-papilloomiviiruse-dna-genotuup-hpv-dna-genot/>

<http://www.cdc.gov/hpv/treatment.html>

<http://www.cancer.gov/types/cervical/pap-hpv-testing-fact-sheet#q8>

http://emakakaelajuhis.weebly.com/uploads/2/5/9/4/25941097/emakakaela_vhieelsete_muutuste_juhis.pdf

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Maria Vares (sünnikuupäev: 23.05.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „HPV detekteerimine kliinilistest proovidest reaalaja PCR meetodil GP5+/GP6+ praimeritega“, mille juhendaja on prof. Andres Metspalu, M.D., Ph.D.,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015