



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Biomolecular and epidemiological aspects of human papillomavirus induced cervical carcinogenesis**

Vermeulen, C.F.W.

### **Citation**

Vermeulen, C. F. W. (2007, October 16). *Biomolecular and epidemiological aspects of human papillomavirus induced cervical carcinogenesis*. Departments of Pathology and Gynaecology, Medicine / Leiden University Medical Center (LUMC), Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12378>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12378>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

A faded, light-colored anatomical drawing of a human torso and arms, showing the skeletal structure and major muscle groups. The drawing is centered on the page and serves as a background for the text.

## Chapter 9

---

### **Samenvatting**



In **CHAPTER 1** wordt een introductie gegeven in verschillende aspecten van cervix carcinoom, HPV en hun relatie met immunologie. De tijd tussen de vermelding van een mogelijk verband tussen seksueel verkeer en baarmoederhalskanker en het epidemiologisch bewijs dat het seksueel overdraagbare HPV de centrale risico factor voor cervix carcinoom is, beslaat bijna anderhalve eeuw. Het tumorproces begint in de cervicale transformatiezone en ontwikkelt zich via verschillende stadia tot cervix carcinoom. Behandeling van patiënten met premaligne en vroege stadia is vaak succesvol, maar patiënten met gevorderde stadia zijn moeilijker te genezen. Door het introduceren van georganiseerde bevolkingsonderzoeken hebben ontwikkelde landen de cervix carcinoom incidentie en mortaliteit effectief gereduceerd. Ontwikkelingslanden blijven gebieden met een hoge incidentie en prevalentie van cervix carcinoom patiënten met gevorderde stadia. Geschat wordt dat ongeveer 80% van alle vrouwen minimaal eenmaal een HPV infectie doormaakt, van wie de overgrote meerderheid in staat is het virus te klaren. HPV en HPV-geïnduceerde laesies worden door het cellulaire immuunsysteem geëlimineerd als ze tenminste correct worden gepresenteerd op HLA moleculen. HLA defecten van genetische oorsprong kunnen dit proces verstoren.

Vervolgens wordt de opzet van dit proefschrift gepresenteerd, dat epidemiologische, immunogenetische en virale aspecten van cervix carcinoom en zijn voorstadia bespreekt.

In **CHAPTER 2** beschreven we de prevalentie van cytologische afwijkingen in cervix uitstrijkjes, afkomstig van vrouwen die deel hebben genomen aan het eerste georganiseerde bevolkingsonderzoek in Suriname en vergeleken we de prevalenties van vier Surinaamse etniciteiten met een verschillende cervix carcinoom incidentie. Papanicolaou kleuring en cytologische screening worden uitgevoerd op 807 cervix uitstrijkjes afgenomen bij Marrons, Amerindianen, Javanen en Hindustanen. Cervicale cytologische afwijkingen werden vastgesteld in 13.4% van de beoordeelbare smears. Hiervan was 2.6% matige tot ernstige dysplasia. De prevalentie van cytologische afwijkingen varieerde tussen de etniciteiten. In de uitstrijkjes van de Marrons worden significant meer cytologische afwijkingen aangetoond. We stelden een hoge prevalentie van matige en ernstige dysplasie vast in alle etniciteiten, hetgeen correleert met de hoge cervix carcinoom incidentie in Suriname. Bij de Marrons werd een significant hogere prevalentie van milde afwijkingen gezien, hetgeen niet correspondeert met de relatief lage cervix carcinoom incidentie bij deze etniciteit. Dit zou wel kunnen passen bij een mogelijke andere seksuele levensstijl van deze vrouwen, hetgeen zou kunnen leiden tot een hogere prevalentie van voorbijgaande HPV infecties.

Incidentiecijfers van (voorstadia van) cervix carcinoom variëren aanzienlijk. Dit wordt beïnvloed door endogene en exogene factoren. In **CHAPTER 3** vergeleken we incidenties van cytologische afwijkingen van een hoog-risico populatie in het oorspronkelijke gebied met die van vrouwen van deze hoog-risico populatie die zijn geïmmigreerd naar

een laag-risico gebied om inzicht in het belang van deze factoren te krijgen. Uitstrijkjes afkomstig van Surinaamse vrouwen die deelnamen aan het Surinaamse bevolkingsonderzoek en uitstrijkjes afkomstig van vrouwelijke Surinaamse immigranten in Nederland werden cytologisch geanalyseerd, gebruikmakend van het Nederlandse microscopische coderingssysteem KOPAC. De leeftijdsspecifieke odds op het hebben van dysplasie waren hoger voor Surinaamse vrouwen die in Suriname wonen dan voor de naar Nederlands geïmmigreerde Surinaamse vrouwen en stegen met hogere stadia van atypie. Wij concludeerden dat er minder gevallen met dysplasie vóórkomen in een hoog-risico populatie die is geïmmigreerd naar een laag-risico gebied voor cervix carcinoom dan in een hoog-risico populatie die is blijven wonen in het hoog-risico gebied. Dit benadrukt het belang van omgevingsfactoren.

Verlies op chromosoom 6p21.3, het gebied van het humane leukocyten antigeen (HLA), is de hoofdoorzaak van HLA downregulatie, hetgeen bij het merendeel van de cervix carcinomen vóórkomt. In **CHAPTER 4** onderzochten we timing, frequentie en mechanisme van HLA klasse I downregulatie in de cervicale carcinogenese. Om het tumorstadium waarin de HLA klasse I aberraties optreden te identificeren, selecteerden we 12 patiënten met cervix carcinoom en aangrenzende cervicale intraepitheliale neoplasie (CIN). Het includeren van voorstadia in onze studie gaf ons de mogelijkheid om iets toe te voegen aan de actuele kennis van HLA aberraties in invasieve cervix carcinoom. Gebruik makend van immunohistochemie onderzochten we HLA klasse I en  $\beta_2$ -microglobuline expressie in tumor en aangrenzende CIN. Verlies van heterozygositeit (LOH) werd onderzocht met microsatellite markers die het HLA gebied besloegen. Fluorescent in situ hybridisatie (FISH) met HLA klasse I probes werd uitgevoerd om het mechanisme achter het HLA verlies te ontrafelen. In 11 van de 12 gevallen liet immunohistochemie afwezige of zwakke HLA klasse I expressie zien. In 10 van deze 11 gevallen kwam downregulatie in tumor en aangrenzende CIN voor. In 9 van de 12 gevallen werd LOH gezien met tenminste één marker in tumor en CIN, in één geval werd alleen LOH in de CIN laesie gedetecteerd en in één geval werd retentie van heterozygositeit voor alle markers in zowel tumor als CIN gezien. We concludeerden dat HLA klasse I aberraties vroeg en vaak in de cervicale carcinogenese optreden. Dit zou premaligne CIN laesies een mogelijkheid kunnen geven om aan immuunsurveillance te ontsnappen en te ontwikkelen tot cervix carcinoom.

Verlies van expressie van de “transporter associated with antigen processing” (TAP) kan de HLA membraan expressie beïnvloeden, die frequent is down gereguleerd in (de voorstadia van) cervix carcinoom. HLA klasse I moleculen activeren T-cellen door antigeen presentatie en zijn derhalve van belang voor de immunologische surveillance. Om bij te dragen aan de tot nog toe beperkte kennis over de onderliggende moleculaire mechanismen van TAP verlies in cervix carcinoom hebben we TAP expressie, LOH en mogelijke

TAP mutaties onderzocht (**CHAPTER 5**). Om de timing van TAP expressieverandering te kunnen bepalen werden 23 cervix carcinomen en naastliggende premaligne laesies gekleurd met HLA-A-, HLA-B/C-,  $\beta_2$ -microglobuline-, TAP1- en TAP2-specifieke monoclonale antilichamen. TAP1 werd niet gedetecteerd in 10 van de 23 cervix carcinomen en 5 van de 10 naastliggende CIN laesies. Alle laesies met lage TAP expressie hadden ook veranderde HLA klasse I expressie. Om tumor- en normale cellen te kunnen onderscheiden werden de cervix carcinoom samples gesorteerd door middel van "flow-cytometry" en vervolgens geanalyseerd voor LOH met markers in het TAP gebied op chromosoom 6p21.3. LOH werd gevonden in 6 van de 10 laesies met TAP verlies. Aansluitend werd een mutatie-analyse op deze monsters uitgevoerd. In 2 gevallen detecteerden we een polymorfisme in de "5'-untranslated region" van het TAP1 gen. Er werden geen mutaties aangetoond. Dit onderzoek laat zien dat er veranderde TAP expressie is in een aanzienlijk deel van de cervix carcinomen. Het onderliggende mechanisme lijkt LOH in het TAP gebied te zijn, hetgeen niet gepaard gaat met een mutatie. In alle gevallen met lage TAP expressie werd ook HLA klasse I verlies geconstateerd, een bevinding die eerdere rapporten over een sterke associatie tussen TAP aberraties en verlies van HLA klasse I onderschrijft.

Humaan papillomavirus (HPV) is een voorwaarde voor de ontwikkeling van cervix carcinoom. Het is gebleken dat multiële HPV infecties vaak vóórkomen in premaligne stadia. Recent werden ook in invasieve cervix tumoren multiële HPV infecties vastgesteld. Derhalve onderzochten we de significantie van multiële HPV infecties door het bestuderen van de prevalenties van deze in cervix carcinoom in een laag-risico (Nederlandse) en een hoog-risico (Surinaamse) populatie en de correlatie van HPV infectie met tumorcel aneuploidie (**CHAPTER 6**). SPF<sub>10</sub> LiPA werd gebruikt voor HPV detectie en typering in 96 Nederlandse en 95 Surinaamse cervix carcinomen. Vervolgens werden laesies met gecombineerde HPV 16/18 infecties met behulp van flow cytometry gescheiden in de diploïde en aneuploïde tumorcel fracties. Deze fracties werden HPV getypeerd door HPV 16- en HPV 18-specifieke PCRs. HPV integratie werd onderzocht op deze gesorteerde cervix carcinoomcellen. Fluorescent in situ hybridisatie (FISH) op paraffine materiaal werd gebruikt voor gelijktijdige detectie van HPV 16 en 18 genotypen en uitgevoerd op de gesorteerde samples.

Multiële HPV infecties waren aanwezig in 13.8% Nederlandse en 22.1% Surinaamse HPV positieve cervix carcinomen. Drie tumoren hadden een HPV 16 en HPV 18 co-infectie: in twee tumoren werden de geïntegreerde HPV copieën van óf HPV 16 óf HPV 18 gedetecteerd in de aneuploïde fractie. In de derde tumor waren zowel HPV 16 als HPV 18 alleen episomaal aanwezig. Deze resultaten tonen aan dat multiële HPV infecties vóórkomen in cervix carcinomen van zowel hoog- als laag-risico populaties. Meerdere HPV typen kunnen in episodale vorm voorkomen in zowel de diploïde als de aneuploïde tumorcellen, maar geïntegreerd HPV DNA werd alleen in aneuploïde tumorcel subpopulaties gedetecteerd.

Chapter 9

Conclusies die werden getrokken en hypothesen die werden geformuleerd zijn in **CHAPTER 7** in het perspectief van recente literatuur geplaatst.