



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## Transforming Growth Factor beta-1 in cervical cancer

Hazelbag, S.

### Citation

Hazelbag, S. (2006, February 2). *Transforming Growth Factor beta-1 in cervical cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4320>

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/1887/4320>

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

# SAMENVATTING

## INTRODUCTIE

De studies beschreven in dit proefschrift hebben betrekking op de wijze waarop kwaadaardige cellen van de baarmoederhals de tumor omgeving kunnen beïnvloeden door de productie van verschillende signaal stoffen (cytokinen). Deze signaal stoffen hebben met name invloed op de immunologische afweer reactie ter plekke, maar ook op het proces van tumoringroei in het omringende gezonde weefsel en op uitzaaiing naar lymfklieren en naar andere organen.

Baarmoederhalskanker is na borstkanker de meest voorkomende kwaadaardige aandoening onder vrouwen wereldwijd. Jaarlijks zullen wereldwijd ongeveer 14 op de 100.000 vrouwen de ziekte ontwikkelen en in totaal zullen jaarlijks ongeveer 190.000 vrouwen aan de ziekte overlijden. In de minder ontwikkelde landen liggen deze cijfers beduidend hoger, met de hoogste incidentie in Zimbabwe van 67 op de 100.000. De gemiddelde leeftijd waarop de diagnose wordt gesteld ligt tussen de 45 en 65 jaar, waarbij vrouwen boven de 55 relatief veel bijdragen aan het aantal patiënten dat overlijdt aan cervix carcinoom, omdat de ziekte vaak in een verder gevorderd stadium wordt vastgesteld.

De baarmoederhals is bekleed met 2 verschillende soorten cellagen (epitheel): de buitenzijde, die grenst aan de vagina, is bekleed met plaveiselcel epitheel, terwijl de binnen zijde bekleed is met klierbuis epitheel. De plek waar deze 2 cellagen in elkaar overgaan, de transformatiezone, is het gebied waar de voorloper stadia van baarmoederhalskanker, de cervicale intraepitheliale neoplasie (CIN) 1,2 en 3, ontstaan. De algemeen aanvaarde gedachte omtrent de ontwikkeling van baarmoederhalskanker wordt samengevat in het model van Richart, waarin CIN 1 (het lichtste voorloper stadium) in regressie kan gaan, kan persisteren of zich verder kan ontwikkelen via CIN 2 en CIN 3, naar uiteindelijk baarmoederhalskanker. De ontwikkeling van CIN 1 naar kanker is een langdurig proces dat gemiddeld 13 jaar in beslag neemt. Om deze voorloper stadia in een voortijdig stadium op te sporen en te behandelen, is het bevolkingsonderzoek ontwikkeld, waarin elke vrouw tussen de 30 en 65 jaar in Nederland 5-jaarlijks wordt opgeroepen voor het laten maken van een uitstrijkje van de baarmoedermond. Mede hierdoor is de incidentie en mortaliteit van baarmoederhalskanker de laatste 50 jaar sterk teruggedrongen, in tegenstelling tot de landen waar een dergelijke bevolkings screening niet wordt uitgevoerd. Tegenwoordig zijn er echter ook mensen die denken dat de ontwikkeling van invasief carcinoom niet altijd via deze drie voorloperstadia hoeft te gaan, maar dat infectie met bepaalde hoog-risico humaan papillomavirus (HPV) typen soms in korte tijd direct kwaadaardige cellen en invasieve groei kan veroorzaken.

Histologisch zijn er verschillende typen baarmoederhalskanker, waarvan het pla-

veiselcelcarcinoom verreweg het meeste, en het adenocarcinoom op de tweede plaats voorkomt.

Meerdere risico factoren worden genoemd met betrekking tot het ontwikkelen van baarmoederhalskanker waaronder een vroege sexarchie, het aantal mannelijke partners, roken, langdurig gebruik van de orale anticonceptie pil, een lage socio-economische status en een niet functioneel immuunsysteem. Veel van deze risico factoren hebben te maken met sexueel gedrag en het blootstaan aan sexueel overdraagbare aandoeningen. De reden dat personen met een verminderde afweer een verhoogde kans op baarmoederhalskanker hebben, heeft te maken met het feit dat deze ziekte een virus geïnduceerde aandoening betreft. Persisterende infectie van de baarmoederhals epitheelcellen met het HPV wordt als de cruciale stap gezien in de aanloop tot de ziekte en momenteel kan HPV in meer dan 99% van alle tumoren en in de meerderheid van de CIN worden aangetoond. Grofweg worden 2 typen HPV onderscheiden, de 'laag-risico' en 'hoog-risico' groep, afhankelijk van hun vermogen om de epitheliale cellen aan te zetten tot ongecontroleerde groei. De hoog-risico groepen, waaronder HPV 16, 18, 45 en 31, worden in de CIN en carcinen aangetroffen, terwijl de laag-risico groepen, te weten HPV 6, 11, 42 en 44, vooral in genitale en andere wratten worden gevonden. Bij de ontwikkeling van baarmoederhalskanker wordt het HPV DNA vaak opgenomen in het DNA van de baarmoederhals epitheelcellen, waardoor daarin genetische veranderingen optreden. Deze genetische veranderingen, maar ook andere zoals het verlies van tumor suppressor genen of expressie van proto-oncogenen, worden van belang geacht in het ontstaan van baarmoederhalskanker. Daarnaast speelt het tekort schieten van het immuunsysteem in het vernietigen van virus-geïnfecteerde en kwaadaardig veranderde cellen een belangrijke rol. Het feit dat het immuunsysteem een rol kan spelen bij baarmoederhals afwijkingen is gebaseerd op de bevinding, dat premaligne aandoeningen spontaan in regressie kunnen gaan. Daarbij wordt op histologisch niveau vaak een uitgebreide ontstekingsreactie gezien rondom en in een baarmoederhals afwijking. Mensen met een gestoord afweersysteem blijken minder goed het virus te kunnen opruimen en vaker en sneller (pre)maligne afwijkingen te ontwikkelen.

Het humane immuunsysteem bestaat uit een aangeboren en een verworven tak. De aangeboren tak werkt als eerste lijn's afweer en bestaat uit de natuurlijke barrières zoals de huid en slijmvliezen, bacterie dodende enzymen, het complement systeem, neutrofiële granulocyten en macrofagen. Aangezien sommige pathogenen het vermogen hebben het eerste lijn's afweer systeem te omzeilen, is het verworven immuunsysteem, de tweede lijn, nodig. Deze tweede lijn bestaat uit de humorale en de cellulaire afweer. De humorale tak wordt geregeld door B lymfocyten, die antilichamen produceren tegen lichaamsvreemd extracellulair antigeen.

Het vervolgens gevormde antigeen-antilichaam complex kan worden opgenomen door een fagocyterende cel.

De cellulaire afweer werkt via de T lymfocyten en richt zich met name op intracellulaire antigenen, zoals ook infecties met HPV. De activiteit van het T cell systeem wordt geregeld door de interactie tussen antigeen gepresenteerd op de celmembraan door de Human Leucocyte Antigen (HLA) klasse I en II moleculen en specifieke T cell receptoren op het oppervlak van T lymfocyten. HLA klasse I bevindt zich op alle kernhoudende cellen, terwijl HLA klasse II zich met name op het oppervlak van professionele antigeen presenterende cellen (APC) bevindt. Virale eiwitten worden intracellulair door APC verkleind tot peptiden, welke vervolgens aan het cel oppervlak via HLA klasse II worden aangeboden aan T cellen. Doordat APC tegelijkertijd ook costimulatoire moleculen tot expressie brengen, kunnen naïve T cellen getraind worden om specifieke (virale) antigenen te herkennen en kan bij een volgende ontmoeting met hetzelfde antigeen de cellulaire afweer versneld in werking worden gesteld. In de afweer tegen HPV spelen zowel de CD4+ T helper als CD8+ cytotoxische T cellen een rol. T helper cellen herkennen peptiden aangeboden via HLA klasse II, waarna afgifte van cytokinen zorgt voor activatie van fagocyterende cellen en de geïnfecteerde cel wordt vernietigd. Cytotoxische T cellen herkennen antigeen aangeboden door HLA klasse I, hetgeen via productie van cytokinen direct zal leiden tot cytolyse van de geïnfecteerde cel.

Deze cytokinen regelen de cellulaire afweer en zorgen voor communicatie tussen APC en effector cellen. Ze worden zowel door ontstekingscellen als door epitheelcellen en tumorcellen aangemaakt. Onderscheiden worden T helper 1 (Th1) en T helper 2 (Th2) cytokinen. Hierbij worden de Th1 cytokinen beschouwd als pro-inflammatoire, welke de cellulaire afweer stimuleren, terwijl de Th2 cytokinen de humorale afweer stimuleren en de cellulaire afweer meer dempen. Onder het pro-inflammatoire type vallen o.a. Interleukine (IL)-2, IL-12, TNF- $\alpha$  en IFN- $\gamma$ , terwijl cytokinen met sterk anti-inflammatoire eigenschappen b.v. IL-10 en TGF- $\beta$ , zijn. Naast pro-of anti-inflammatoire eigenschappen kunnen cytokinen ook als groeifactor werken, terwijl ze op normale epitheelcellen een exact tegengesteld effect kunnen uitoefenen als op dezelfde cel die getransformeerd is tot kankercel. De type 1 cytokinen kunnen sterke anti tumor effecten uitoefenen, b.v. doordat ze presentatie van viraal antigeen via HLA klasse II aan T helper cellen bevorderen of doordat ze de transformatie van natural killer (NK) cellen tot extra agressieve lymphokine activated killer (LAK) cellen stimuleren. Type 2 cytokinen daarentegen onderdrukken vaak de immunrespons jegens de tumor, o.a. doordat ze de presentatie van HLA op tumorcellen onderdrukken waardoor deze in mindere mate als lichaamsvreemd worden herkend of doordat ze de productie van belangrijke pro-inflammatoire cytokinen onderdrukken.

In overeenstemming hiermee is in het bloed van patiënten met verschillende vormen van kanker, waaronder HPV gerelateerde aandoeningen, een verhoogde concentratie type 2 cytokinen of een verlaagde concentratie type 1 cytokinen, of een combinatie van beide, aangetroffen. Deze zijn voor deel afkomstig van cellen van het immuunsysteem, maar waarschijnlijk deels ook van carcinoomcellen. Ook in tumor biopsieën, die over het algemeen zowel tumor- als ontstekingscellen bevatten, zijn dergelijke veranderingen in cytokine productie wel beschreven. Een karakteristiek aspect van baarmoederhalskanker is het begeleidende ontstekingsinfiltraat. De uitgebreidheid en de samenstelling van dit ontstekingsinfiltraat verschillen bij carcinomen onderling, maar in ieder geval vormen T lymfocyten en macrofagen een belangrijk onderdeel ervan. De betekenis van het ontstekingsinfiltraat lijkt tweeledig te zijn; enerzijds weerspiegelt het mogelijk de afweerreactie van het lichaam om de tumorcellen op te ruimen, terwijl anderzijds het ontstekingsinfiltraat juist in het voordeel van de tumor kan werken door de productie van proteases en angiogene groeifactoren, die met name door de macrofagen geproduceerd worden. Een van de gedachten die ten grondslag lag aan de studies beschreven in dit proefschrift was, dat de epitheelcellen van de baarmoederhals nadat zij kwaadaardig zijn veranderd, mogelijk een verandering in cytokine productie laten zien, waardoor zij ter plekke van de tumor de immunorespons zouden kunnen verzwakken. Dit zou een manier kunnen zijn die door tumorcellen wordt aangewend om aan vernietiging door het immuunsysteem te ontkomen. Zo kunnen HPV positieve tumorcellen bijvoorbeeld ook T cel tolerantie voor HPV induceren of gestoorde HLA expressie op tumorcellen teweeg brengen, beide mechanismen die een verminderde immunoreactie jegens HPV geïnfecteerde/maligne getransformeerde cellen teweeg kunnen brengen. Gezien het immunogene karakter van baarmoederhalskanker wordt al langere tijd getracht immunologische strategieën te ontwikkelen om te ziekte te behandelen. Deze bestaan voornamelijk uit preventieve en therapeutische vaccins, welke momenteel nog vooral in experimentele setting plaats vinden. Kennis van mechanismen die tumorcellen en ontstekingscellen gebruiken om de lokale, maar ook de systemische afweer te ondermijnen, is van belang zowel om het ontstaan van deze ziekte beter te begrijpen, als om immunologische strategieën meer gericht en met meer slagingskansen voor therapeutische doeleinden in te kunnen zetten.

Naast de immunologische kant van baarmoederhalskanker, hebben we in de studies gepresenteerd in dit proefschrift ook gekeken naar de rol van tumorstroma en stroma inducerende factoren. Wanneer men een plaveiselcelcarcinoom van de baarmoederhals onder de microscoop bekijkt valt op, dat deze bestaat uit groepjes tumorcellen omringd door sterk wisselende hoeveelheden bindweefsel. Dit zogenaamde tumorstroma bestaat voornamelijk uit fibroblasten, extracellulaire matrix

eiwitten, bloedvaten, lymfvaten en ontstekingscellen. Vooral in solide carcinomen, waartoe baarmoederhalskanker behoort, wordt de aanwezigheid van stroma in de tumor noodzakelijk geacht voor het overleven van de tumorcellen, aangezien de bloedvaten in het stroma de tumor voorzien van zuurstof en voedingsstoffen en afvalstoffen wegvoeren. Daarbij suggereren recente onderzoeken dat fibroblasten in het tumorstroma, via de productie van paracrine groeifactoren, overleving en proliferatie van tumor cellen ondersteunen, waarmee de rol van het tumor stroma in solide tumoren mogelijk niet alleen ondersteunend maar misschien zelfs wel bepalend is in het ontstaan van dit soort tumoren.

In hoofdstuk 2 beschrijven we de productie van een breed scala van cytokinen die we hebben onderzocht in zowel een aantal carcinoomcellijnen, d.w.z. tumorcellen die al eerder uit het lichaam zijn verwijderd bij een operatie en vervolgens in het laboratorium lang artificiëel kunnen worden door gekweekt, als in normale epitheelcellen van de baarmoederhals. Om de productie door carcinoomcellen te kunnen vergelijken met die van de immuuncellen van het ontstekingsinfiltraat, hebben we tevens de productie in een aantal tumorcelsuspensies bekeken. Deze laatste bevatten naast tumorcellen een flinke hoeveelheid ontstekingscellen. De cytokine expressie werd gemeten d.m.v. RT-PCR en de authenticiteit van de verkregen mRNA producten werd bevestigd met Southern blotting. Hieruit bleek, dat de baarmoederhals epitheelcellen na maligne verandering zowel de type 1 cytokinen TNF- $\alpha$  en GM-CSF als de type 2 cytokinen IL-10 en IL-5 verminderd of geheel niet meer tot expressie brengen. De afgenomen expressie van de eerste 2 zou de immuunrespons ter plaatse van de tumor inderdaad negatief kunnen beïnvloeden, omdat deze betrokken zijn bij het presenteren van antigeen, de rijping en de cytotoxiciteit van APC. Daarbij stimuleert GM-CSF normaal gesproken de productie van een andere pro-inflammatoire cytokine, IL-12, welke van belang is bij het ontwikkelen van virus specifieke afweer reacties door de T cellen. Daarnaast bleek, dat tumorcellen het verhoogd tot expressie brengen van specifieke anti-inflammatoire cytokinen blijkbaar niet gebruiken als ontsnappingsmechanisme. Alleen MCP-1 (CCL2), een chemoattractant voor monocyt en macrofagen, werd meer door tumorcellen dan door normale epitheelcellen geproduceerd. Het MCP-1, hoewel niet geschaard onder de anti-inflammatoire cytokinen, is in baarmoederhalskanker wel gerelateerd aan prognostisch ongunstige factoren, zo bleek uit nog ongepubliceerde data, evenals in carcinomen van andere origine. Waarschijnlijk heeft dat te maken met het aantrekken van deels inactieve macrofagen naar het ontstekingsinfiltraat rond de tumor, die minder efficiënt zijn in het opruimen van de HPV geïnfecteerde getransformeerde cellen. Daarnaast blijken deze tumor geassocieerde macrofagen (TAM), wel ruimschoots IL-6, een groeifactor voor tumoren,

en proteases en angiogene groeifactoren te produceren, waardoor tumorcel invasie vergemakkelijkt wordt. Daarnaast viel op dat TGF- $\beta_1$ , een multifunctioneel cytokine met o.a. sterk anti-inflammatoire eigenschappen, zowel door normale cellen als door carcinoomcellijnen sterk tot expressie werd gebracht. Overexpressie van dit cytokine is in verschillende vormen van kanker gerelateerd aan een verminderde overleving. Mogelijke verklaringen hiervoor liggen, naast het anti-inflammatoire karakter van het cytokine, in het vermogen om vaatnieuwvorming in carcinomen te stimuleren waardoor tumor cellen van extra bloed worden voorzien en tevens in de capaciteit om het bindweefsel in de tumor, en de extracellulaire matrix (ECM) hierin, te beschermen tegen afbraak. Dit tumor stroma zou op meerdere manieren van voordeel kunnen zijn voor het groeiende carcinoom. Met het oog op deze kenmerken wilden we onderzoeken, of de sterke expressie die we gemeten hadden in de carcinoomcellijnen ook terug te vinden was in tumorcellen in weefsel dat vers uit de patiënt verwijderd was, hetgeen waarschijnlijk een betere afspiegeling is van de werkelijke situatie in het lichaam, en of dit relatie had met factoren, waarvan we weten dat die een prognostisch ongunstige betekenis hebben in baarmoederhals kanker. In hoofdstuk 3 en hoofdstuk 4 beschrijven we zowel de expressie van TGF- $\beta_1$  in carcinoomcellen op weefsel niveau en de relatie met verschillende klinisch/pathologische parameters, als de betekenis van verhoogde expressie met betrekking tot recidiverende ziekte en overleving. We gebruikten hiervoor RNA *in situ* hybridizatie, waarmee op weefselcouples onder de microscoop kon worden bekeken, in welke cellen en vooral ook hoe sterk, het TGF- $\beta_1$  mRNA tot expressie werd gebracht. Hoewel we weten en bevestigd zagen dat dit molecuul ook door ontstekingscellen en fibroblasten wordt gemaakt, waren we met name geïnteresseerd in de productie in tumorcellen. De sterkte van de expressie en het percentage tumorcellen dat TGF- $\beta_1$  tot expressie bracht werden gescoord volgens een gevalideerd systeem. Ook de hoeveelheid stroma aanwezig in de tumor werd per carcinoom gescoord. Daarnaast werd de aanwezigheid van bepaalde ECM eiwitten aanwezig in het tumor stroma, zoals fibronectine, laminine en collageen IV, gescoord. De histologische gegevens zoals tumorgrootte, vaat-ingroei, infiltratiediepte en lymfkliermetastasen werden vastgesteld. De klinische gegevens van de patiënten m.b.t. FIGO stadium, ziektevrrije overleving, overlijden t.g.v. de ziekte verkregen we uit de prospectieve klinische database. TGF- $\beta_1$  wordt aanvankelijk in een inactieve vorm uitgescheiden, waarna het eerst geactiveerd moet worden voor het zijn diverse functies kan uitoefenen. Om te controleren of het mRNA dat wij maten in de carcinoomcellen ook daadwerkelijk werd omgezet in actief eitwit, hebben we gekeken naar de expressie van plasminogeen activator inhibitor (PAI)-1, een eiwit waarvan we weten dat de expressie ervan zowel kwalitatief als kwantitatief wordt geïnduceerd door TGF- $\beta_1$ .



Sterke expressie van TGF- $\beta_1$  in tumorcellen correleerde met de aanwezigheid van een minder uitgebreid ontstekingsinfiltraat rond de tumor, waarmee de anti-inflammatoire eigenschappen van dit cytokine ook op weefsel niveau in baarmoederhalskanker werd bevestigd. Daarnaast resulteerde een verhoogde expressie van TGF- $\beta_1$  in de tumorcellen in een uitgebreidere stroma formatie in de tumor. Zoals gezegd kan het ontstekingsinfiltraat zowel de tumorcellen opruimen, als tumorgroei en invasie bevorderen, terwijl je van de uitgebreidere stroma formatie zou kunnen verwachten, dat deze tumorgroei en invasie in het omliggende gezonde weefsel bevordert gezien de betere doorbloeding van de tumor. Toch bleken zowel de uitgebreidheid van het ontstekingsinfiltraat als de hoeveelheid stroma in de tumor geen relatie te hebben met overlevingsduur van de patiënten of met andere prognostisch ongunstige factoren. Een verklaring hiervoor zou daarin kunnen liggen, dat TGF- $\beta_1$  niet alleen de hoeveelheid ontstekingscellen negatief beïnvloedt, maar ook de activiteit ervan. T cellen vormen naast macrofagen het belangrijkste bestanddeel van het tumor infiltraat bij baarmoederhalskanker. Uit andere studies is gebleken dat zowel de proliferatie van T cellen als hun cytotoxisch vermogen, en de tumor antigeen presentatie en cytotoxische activiteit van macrofagen, geremd kan worden door TGF- $\beta_1$ . Daarnaast kunnen de tumor geassocieerde macrofagen verschillende tumorgroei bevorderende factoren produceren.

De aanwezigheid van een bepaalde ECM component, collageen IV, in het stroma, waardoor het stroma een stuggere samenstelling krijgt, werd wel beïnvloedt door TGF- $\beta_1$  expressie in tumor cellen. Zo'n collageen rijk tumorstroma ging gepaard met een minder uitgebreid ontstekingsinfiltraat, maar ook dit resulteerde niet in een veranderde overlevingsduur, hetgeen eigenlijk in overeenstemming is met bovengemelde bevindingen.

Sterke expressie van TGF- $\beta_1$  in carcinoomcellen op zichzelf correleerde ook niet met verminderde overleving of met prognostisch ongunstige factoren. TGF- $\beta_1$  leek wel sterker tot expressie te komen in adenocarcinomen dan in plaveiselcelcarcinomen, hoewel dit net niet statistisch significant bleek. In baarmoederhalskanker werd in andere onderzoeken vaker een afname van TGF- $\beta_1$  expressie in weefsel gezien tijdens de ontwikkeling van normaal (plaveiselcel) epitheel via CIN naar invasieve tumor. Dit gegeven, samen met het ontbreken van een correlatie tussen TGF- $\beta_1$  expressie in onze groep invasieve tumoren en belangrijke prognostische factoren en overleving, doet het vermoeden rijzen dat vroeg tijdens de ontwikkeling van baarmoederhalskanker de kwaadaardig veranderende cellen minder TGF- $\beta_1$  gaan produceren terwijl later, onder carcinomen, de verhoogde expressie wel de biologische voordelen van een tumorinfiltraat met minder sterke anti-tumor activiteiten en meer tumorstroma kan bieden. Een belangrijke eigenschap

van TGF- $\beta_1$  is, dat het proliferatie van cellen controleert. Het zou carcinoomcellen dus een voordeel op kunnen leveren om hier onder uit te komen, zodat ze ongebreideld kunnen delen. Door zelf minder TGF- $\beta_1$  te produceren (autocrine productie) kunnen cellen mogelijk die proliferatie controle deels ontduiken. De paracrine effecten van de resterende TGF- $\beta_1$  productie op het omliggende tumor weefsel, blijven echter wel gehandhaafd. Zulke bifasische effecten van TGF- $\beta_1$ , waarbij het cytokine vroeg in de ziekte ontwikkeling als tumorsuppressor werkt en later juist paracrine tumor bevorderende effecten uitoefent, zijn wel vaker beschreven. Onze bevinding van een sterkere expressie in adenocarcinomen dan in plaveiselcelcarcinomen van de baarmoederhals, evenals het feit dat bijna alle andersoortige tumoren waarin verhoogde expressie gepaard gaat met verminderde overleving adenocarcinomen zijn, samen met het gegeven dat andere onderzoekers tijdens de ontwikkeling van het baarmoederhals adenocarcinoom juist een toegenomen expressie vonden van normaal via CIN naar invasief carcinoom, doet het vermoeden rijzen dat TGF- $\beta_1$  in adenocarcinomen mogelijk een andere rol speelt dan in plaveiselcelcarcinomen.

Ter controle van de activiteit van het onderzochte TGF- $\beta_1$  onderzochten we ook de expressie van PAI-1 in tumorcellen. Kwantitatief gezien correleerde de gescoorde hoeveelheid van beide molekulen aanwezig in carcinoomcellen niet met elkaar, hetgeen mogelijk het gevolg is van het feit dat we bij TGF- $\beta_1$  naar mRNA expressie keken en bij PAI-1 naar eiwit expressie. mRNA en eiwit expressie van hetzelfde molecuul correleren vaak niet lineair met elkaar, zodat dit van verschillende molekulen mogelijk nog minder verwacht kan worden. Wel viel op dat steeds co-expressie van beide molekulen in de carcinomen werd aangetroffen, en dat geen TGF- $\beta_1$ -positieve/PAI-1-negatieve of TGF- $\beta_1$ -negatieve/PAI-1-positieve carcinomen aanwezig waren. Hieruit leidden we af, dat het onderzochte TGF- $\beta_1$  mRNA in ieder geval deels vertaald werd in actief eiwit.

Verassend genoeg, bleek sterke expressie van PAI-1 in tumor cellen een onafhankelijke prognostische factor voor kortere (ziekte-vrije) overleving te zijn. PAI-1 heeft als belangrijkste functie het remmen van overdreven proteolyse van ECM eiwitten door plasmine, dat wordt gevormd uit plasminogeen door plasminogeen activatoren (PA). Tevens blijkt er zonder PAI-1 verminderde of geen vaatnieuwvorming te kunnen plaatsvinden. Omdat proteolyse van de ECM eiwitten juist een onmisbaar proces voor tumor cel invasie in het omringende gezonde weefsel is, lijkt het paradoxaal dat het remmen hiervan bevorderend zou werken voor de tumorgroei. Toch is in kwaadaardige tumoren van verschillende organen een dergelijk verband tussen verhoogd PAI-1 en kortere ziektevrije overleving aangetoond. Een mogelijke oorzaak hiervoor zou kunnen zijn dat PAI-1 de balans bewaard tussen ECM afbraak en behoud, waardoor tumor cellen juist beter kunnen

infiltreren. Met andere woorden, er lijkt een zekere hoeveelheid ECM nodig te zijn voor succesvolle migratie van zowel tumor cellen als endotheel cellen. Daarbij stimuleert PAI-1 zoals gezegd de vaatnieuwvorming, een onmisbare factor in solide tumoren.

In hoofdstuk 5 onderzochten we een andere factor die verband houdt met TGF- $\beta_1$ , namelijk het  $\alpha\beta_6$  integrine. Integrines zijn een familie van transmembraan celoppervlaktereceptoren, die in rustfase adhesie tussen cellen onderling, maar tijdens migratie ook tractie tussen cellen en de ECM verzorgen. Hierin wordt een subfamilie onderscheiden van de  $\alpha\nu$  integrines, waarvan  $\alpha\beta_6$  er één is. Deze blijkt betrokken te zijn bij verschillende oncologische processen zoals tumorcel proliferatie en migratie, activatie van MAP kinases en van matrixmetalloproteinasen (MMP). Bovendien heeft deze receptor sterke affiniteit voor in de eerste plaats het latency associated protein (LAP), het eiwit waaraan inactief TGF- $\beta_1$  gebonden is en waarvan het gekliefd moet worden voor activatie, en in de tweede plaats het ECM eiwit fibronectine (en in mindere mate vitronectine en tenascin).  $\alpha\beta_6$  kan aldus latent TGF- $\beta_1$  activeren. Vice versa blijkt (actief) TGF- $\beta_1$  de expressie van  $\alpha\beta_6$  op epitheel cellen te kunnen verhogen, zoals is aangetoond in wond genezingsstudies, maar ook in darmkanker cellen, hetgeen mogelijk een uiting is van een functionele verandering van die cellen, epithelial-mesenchymal transition (EMT) genaamd. In gedifferentieerde epithelia komt  $\alpha\beta_6$  nauwelijks voor, maar in ongedifferentieerde epithelia zoals tijdens wondgenezing en de embryonale ontwikkeling en in verschillende carcinomen, wordt dit integrine verhoogd tot expressie gebracht. Het wordt niet door cellen van het immuunsysteem of andersoortige cellen geproduceerd. In verscheidene vormen van kanker is de verhoogde expressie in verband gebracht met een toegenomen capaciteit van de tumor cellen om het omringende gezonde weefsel te infiltreren en te metastaseren. Vanwege een mogelijk verband met TGF- $\beta_1$  en fibronectine, beide uitgebreid aanwezig in baarmoederhalskanker weefsel, onderzochten we de expressie van  $\alpha\beta_6$  in normaal cervix epitheel, CIN, primaire carcinomen en lymfklier metastasen. Tevens vergeleken we in carcinomen onderling de expressie en correleerden dit aan belangrijke prognostische factoren zoals eerder beschreven, en ziekte overleving. Het bleek, dat tijdens de ontwikkeling van normaal epitheel via CIN naar carcinoom de expressie van  $\alpha\beta_6$  geleidelijk aan toenam, hetgeen mogelijk de verminderde differentiatie van de betreffende epitheelcellen weergeeft. Daarnaast werd in de groep carcinomen onderling een duidelijk verband tussen verhoogde expressie en prognostisch ongunstige factoren gezien. Sterke aanwezigheid van  $\alpha\beta_6$  in de tumor cellen bleek een onafhankelijke factor die een verkorte ziekte-vrije overleving voorspelde. Dit zou verklaard kunnen worden door het feit dat

verhoogde  $\alpha\beta6$  expressie het proces van EMT weergeeft; dusdanig veranderde cellen hebben een verhoogde motiliteit, met name in een fibronectine-rijke omgeving, zoals uit verschillende onderzoeken in darm- en mondkanker is gebleken. Aangezien de ECM van baarmoederhalskankerweefsel heel rijk is aan fibronectine, zoals in **hoofdstuk 2** is beschreven, vormt die een ideale ondergrond voor de migratie van cervix carcinoomcellen die  $\alpha\beta6$  tot expressie brengen. Een andere opvallende bevinding was dat de aanwezigheid van TGF- $\beta_1$  en  $\alpha\beta6$  met elkaar correleerden. Een hypothese hieromtrent is, dat verhoogde  $\alpha\beta6$  expressie in tumorcellen zou voorzien in een mechanisme om lokaal TGF- $\beta_1$  te activeren, hetgeen vervolgens weer leidt tot inductie van EMT in de tumorcellen; aldus zou een micromilieu kunnen worden geschapen, waarin invasie van carcinoomcellen geoptimaliseerd wordt.

Uit de gepresenteerde studies kunnen we concluderen dat in baarmoederhalskanker de tumorcellen hun omgeving kunnen moduleren. De balans in het cytokinenetwerk van een carcinoom bepaalt mogelijk, of het begeleidend ontstekingsinfiltraat meer tumor aanvullende of tumor bevorderende eigenschappen tentoonstelt. Bij het ontwikkelen van immunologische strategieën die als doel hebben de effectiviteit van de locale anti-tumor ontstekingsreactie te versterken, is het van belang rekening te houden met de ondermijnende eigenschappen van de tumorcellen hierin. Methoden om lokaal het cytokinemilieu te modificeren, zoals bijvoorbeeld via de transfectie van tumor cellen met genen die coderen voor bepaalde cytokinen zoals GM-CSF, IL-2 of IL-12, zou plaatselijk de anti-tumor ontstekingsreactie enigszins kunnen herstellen. Dit heeft bijvoorbeeld bij experimenten met muizen zijn nut bewezen. Uit onze data blijkt dat baarmoederhalskanker cellen niet het mechanisme gebruiken om bepaalde sterke anti-inflammatoire cytokines verhoogd tot expressie te brengen, welke normale epitheel cellen niet maken, om zo de locale afweerreactie te ontduiken. Het is wel mogelijk dat tijdens de ontwikkeling van gewone plaveiselepitheelcel naar carcinoomcel de autocrine productie van TGF- $\beta_1$  wordt verminderd, om aldus aan de negatieve groeicontrolle te ontkomen. In carcinomen sorteert het tumorcel afkomstige TGF- $\beta_1$  paracrine en autocrine effecten, waardoor tumorgroei en invasie vergemakkelijkt lijken te kunnen worden. In toekomstige klinische trials, met name op het gebied van immunotherapie, is het van belang de aanwezigheid van bepaalde cytokinen en integrinen, zoals PAI-1 en  $\alpha\beta6$ , mee te nemen.



## CURRICULUM VITAE

Suzanne Hazelbag werd geboren op 31 mei 1970 in Gouda. Zij behaalde het eindexamen aan het Stedelijk Gymnasium te Leiden in 1988, waarna zij in datzelfde jaar begon aan de studie Geneeskunde aan de Rijksuniversiteit te Leiden. In 1989 behaalde ze het propedeutisch examen. In de daarop volgende tijd deed ze naast haar studie onderzoek naar ontwikkelingsstoornissen bij kinderen met infantiele encephalopathie op de afdeling kinderneurologie/neuropsychologie van het LUMC onder begeleiding van Dr. J. Lanser. Haar afstudeerproject in 1993 betrof een prospectieve studie naar het effect van de anti-epileptica Valproaat en Carbamazepine op de plasma-carni-tinestatus van kinderen met epi-lep-sie onder bege-lei-ding van Dr. B.M. Poo-rthuis, LUMC. In de wachttijd tussen het afstudeerproject en het starten van de co-schappen ging zij naar Orissa, India, waar ze participeerde in de kliniek en op de poli en waar ze een beschrijvend onderzoek verrichtte naar de indicaties voor medische ingrepen in de verloskunde in dat ziekenhuis, hetgeen plaatsvond onder supervisie van Prof. Dr. J. Bennebroek Gravenhorst. Bij terugkomst in Nederland volgden het doctoraal examen en, van 1994 tot 1996, de co-schappen. Ter afsluiting deed zij een extra keuze co-schap in Kaapstad, Zuid-Afrika, onder begeleiding van Prof. Dr. A. Peters en Dr. R. Soeters, waar ze mocht meewerken in een midwife obstetrical unit in een township en op de afdeling Gynaecologie en Verloskunde van het Groote Schuur Ziekenhuis. Na terugkomst was zij een jaar werkzaam als AGNIO op de afdeling Gynaecologie en Verloskunde in het St. Antoniushove Ziekenhuis in Leidschendam, thans onderdeel van het MCH, en vervolgens een halfjaar als AGNIO in het Groene Hart Ziekenhuis in Gouda. In 1998 volgde een aanstelling als AGIKO voor full-time wetenschappelijk onderzoek naar immunologische factoren van het cervix carcinoom voor 2 jaar. Dit onderzoek, dat plaatsvond op de afdeling Pathologie van het LUMC in samenwerking met de afdeling Gynaecologie onder begeleiding van Prof. Dr. G.J. Fleuren, Dr. A. Gorter en Prof. Dr. G.G. Kenter, heeft uiteindelijk geresulteerd in dit proefschrift. Vanaf juli 2000 is zij in opleiding tot gynaecoloog in het LUMC (opleiders: Prof. Dr. H. Kanhai en Prof. Dr. G.G. Kenter) en het Groene Hart Ziekenhuis in Gouda (opleider: Dr. J. van Huissing).



## DANKWOORD

Dit proefschrift had niet tot stand kunnen komen zonder de hulp van velen, waarvan sommigen in het bijzonder. Tijdens de onderzoeksperiode op de afdeling Pathologie (en Gynaecologie) heb ik in de vele werkberepkingen de bereidheid van anderen om mee te denken over de invulling en uitvoering van het onderzoek, waardoor vaak een opening werd geboden wanneer het even leek te stagneren, heel erg gewaardeerd. In het lab heb ik veel hulp gehad van Hans Baelde en Michael Eikmans bij het opzetten van de RT-PCR en RNA in situ hybridisatie. Ook Enno, Lambert, Yvon, Sandra en Jaap ben ik veel dank verschuldigd voor vele fraaie IHC kleuringen en positieve kweek resultaten en Henry voor de HPRT RISH resultaten. De klassieke muziek op het lab (vanuit de radio dan wel fluitend) tijdens de lange 'scorings' sessies kon ik altijd wel waarderen. De relaxte, gezellige sfeer op de PA, die tot uiting kwam in vele gezellige activiteiten zoals de labuitjes, Sinterklaas, het kerstontbijt, de jaarlijkse gouden eikel uitreiking, tennis toernooien etc., heeft de soms ook wel wat 'taai' onderzoekstijd tot een positieve periode in mijn werkloopbaan gemaakt. Ook de kamergenoten van P1-41, Louise, Christine, Kyra, Anne-Marie, Liesbeth en Vanessa, hebben veel bijgedragen in het hooghouden van het moreel, hetzij door eindeloze kletspartijen in het 'kippenhok', hetzij door heimelijke curly-wurly's en kopjes cappuchino op het Leidse Plein. Marian, bedankt voor je altijd snelle reactie en hulp, bij de vele administratieve bezigheden die publiceren en een proefschrift schrijven met zich meebrengen. Klaas en Ruud, veel dank voor jullie professionaliteit, waardoor mijn coupes in kunstwerkjes werden getransformeerd. Onmisbaar was ook de hulp van de medewerkers van de afdeling gynaecologie voor het verkrijgen van het cervix weefsel waarmee alle experimenten zijn gedaan en het opzetten van de klinische database. Vriend-(inn)en, mede-assistenten en bazen, bedankt voor het begrip en de collegialiteit; een naast-de-specialisten-opleiding-volgende-ook-promotieonderzoek-doende-en-moederende persoon, behoort lang niet altijd tot de meest gezelligste en flexibele individuen.

Fokkeden, Hens en Bea, Lies en Eef, heel veel dank voor jullie vele begrip, vertrouwen en aanmoediging; het heeft me heel veel geholpen.



Goeri, je hebt gelijk, jouw bijdrage in het regelen van onze thuissituatie en eeuwige (soms hemeltergende) optimisme waren en zijn onontbeerlijk voor zowel het vele schrijfwerk als het onregelmatige werk in het ziekenhuis. Daarom past jou inderdaad een paginagroot

DANK JE!