



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Vulvar squamous cell carcinoma : genetics, morphology and clinical behaviour

Trietsch, M.D.

Citation

Trietsch, M. D. (2017, November 9). *Vulvar squamous cell carcinoma : genetics, morphology and clinical behaviour*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/54945>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/54945>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

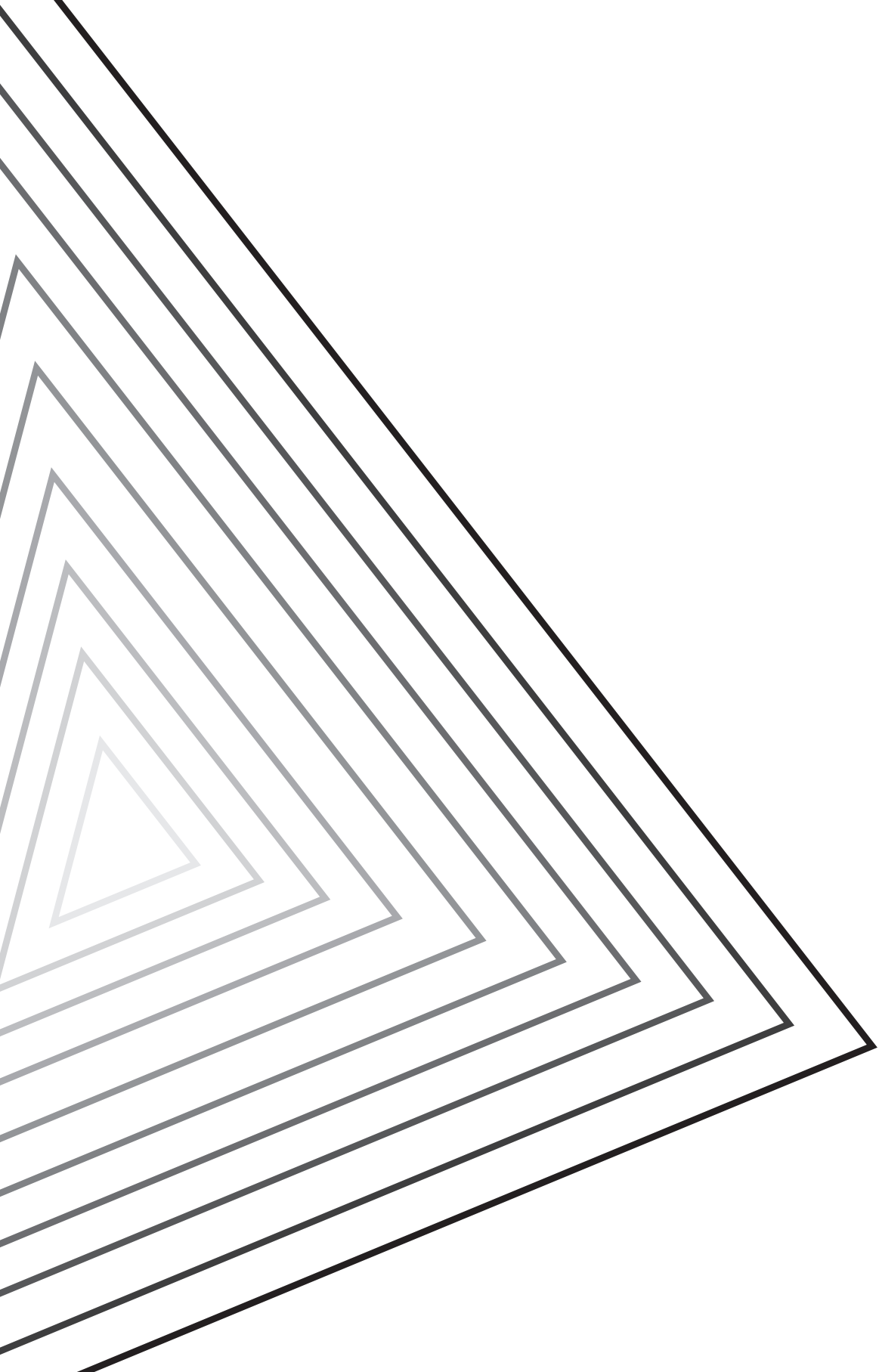


The handle <http://hdl.handle.net/1887/54945> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Trietsch, M.D.

Title: Vulvar squamous cell carcinoma : genetics, morphology and clinical behaviour

Issue Date: 2017-11-09



Addendum

Nederlandse Samenvatting

Curriculum Vitae

List of publications

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

Inleiding

De vulva is het uitwendige deel van het vrouwelijk geslachtsorgaan en bestaat uit de kleine schaamlippen, rond de opening van de vagina, de uitgang van de urinebuis en de clitoris. Vulvacarcinoom is een kwaadaardige aandoening van de huid van de vulva die gelukkig weinig voorkomt, maar wel een grote invloed heeft op het leven van de vrouwen die het treft. In Nederland wordt ieder jaar bij 2 op de 100.000 vrouwen vulvacarcinoom vastgesteld. Als een vulvacarcinoom in een vroeg stadium wordt ontdekt, is curatieve behandeling goed mogelijk en heeft de patiënte een goede prognose. De standaardbehandeling bestaat uit chirurgische excisie van de tumor en het omliggende weefsel (radicale excisie) en in veel gevallen het verwijderen van de lymfeklieren in de lies. Sommige vrouwen krijgen echter snel een recidief of hebben een tumor die snel en progressief groeit. Wanneer de tumor zich heeft uitgebreid tot de urinebuis, de anus of de lymfeklieren zal de tumor ruimer moeten worden uitgesneden om een veilige tumorvrije marge te kunnen bereiken. Dit resulteert helaas ook in schade aan gezonde weefsels. Deze soms verminkende behandeling heeft om die reden een grote impact op de kwaliteit van leven van patiëntes, omdat zij last kunnen hebben van wondgenezingsstoornissen, lymfoedeem en zenuwschade. Dit kan weer leiden tot seksuele problemen en incontinentie.

De ontstaanswijze van vulvacarcinoom wordt op dit moment nog niet goed begrepen. Er bestaan verschillende vormen van schaamlipkanker, en de meest voorkomende is het plaveiselcelcarcinoom. Inmiddels staat vast dat ongeveer 40% van deze plaveiselcelcarcinomen is geassocieerd met een persisterende infectie met een hoog-risico variant van het Humaan Papilloma Virus (HPV). De resterende 60% draagt geen HPV en is geassocieerd met mutaties in het gen *tp53*.

Op dit moment is het wel of niet hebben van lymfekliermetastasen de enige goed bruikbare maat waarmee voorspeld kan worden of iemand een goede of slechte prognose heeft. In dit proefschrift proberen we beter te begrijpen hoe vulvacarcinoom ontstaat en zoeken we naar een methode om te voorspellen welke vulvacarcinomen zich agressief zullen gedragen.

Behandeling van vulvacarcinoom

De Internationale Federatie voor Gynaecologie en Obstetrie (FIGO) heeft een stadieringsstelsel ontwikkeld waarmee patiënten kunnen worden ingedeeld in risicocategorieën op basis van weefselkenmerken en klinische parameters. Patiënten met een tumor in het laagste stadium hebben een vijfjaarsoverleving van 79%, terwijl patiënten in het hoogste stadium een vijfjaarsoverleving van slechts 13% hebben.



De behandeling van eerste keus voor het laagste stadium vulvacarcinoom is chirurgische excisie. Afhankelijk van de grootte en de doorgroei van de tumor komen patiënten in een hoger FIGO stadium en zal de behandeling ook agressiever zijn, waarbij de lymfeklieren kunnen worden verwijderd, of bestraling en chemotherapie kan worden gegeven.

Ontstaan van vulvacarcinoom: twee verschillende routes:

Wanneer cellen ongecontroleerd gaan delen ontstaat kanker. Dit kan gebeuren wanneer er in het DNA in de cel een fout ontstaat die niet hersteld wordt. In principe kan dit in elk type cel in het menselijk lichaam gebeuren. Huidkanker is wereldwijd een van de meest voorkomende vormen van kanker. In de meeste gevallen ontstaat huidkanker nadat er DNA-schade is veroorzaakt door ultraviolette straling uit zonlicht. Veelvoorkomende types huidkanker zijn onder andere melanoom, basaalcelcarcinoom en plaveiselcelcarcinoom.

Ook in de huid van de vulva kan kanker ontstaan. Dit gebeurt echter niet door zonlicht zoals in de huid op de rest van het lichaam, maar door een compleet ander mechanisme. Zoals eerder genoemd, zijn de meeste gevallen van vulvacarcinoom plaveiselcelcarcinomen. Plaveiselcelcarcinomen ontstaan vanuit het plaveiselepitheel van de huid.

Ongeveer 40% van alle vulvacarcinomen ontstaat na een langdurige infectie met hoog risico HPV. HPV's zijn veelvoorkomende en besmettelijke virussen die abnormale celgroei kunnen veroorzaken. Hierdoor kunnen bijvoorbeeld wratjes ontstaan, maar in sommige gevallen ook kanker. Meer dan 100 verschillende varianten van HPV zijn al beschreven. Ongeveer 15 hiervan zijn 'hoog risico' varianten die kanker kunnen veroorzaken. Deze hoog risico HPV's staan vooral bekend als veroorzaker van baarmoederhalskanker en voorlopers daarvan. Veel minder vaak veroorzaken deze virussen ook vulvacarcinomen. Geschat wordt dat ongeveer 80% van alle vrouwen tenminste eens in haar leven een HPV-infectie doormaakt. Slechts een heel klein deel van deze vrouwen zal HPV-gerelateerde kanker ontwikkelen. In de meeste gevallen is de HPV-infectie voorbijgaand van aard en ruimt het lichaam het virus binnen 1 tot 2 jaar op. Sommige vrouwen blijken echter niet in staat dit virus te kuren, bijvoorbeeld als het immuunsysteem niet goed functioneert. Het virus kan zich dan in het DNA van de aangedane cellen nestelen. De cellen zullen hierdoor ongecontroleerd gaan groeien en kunnen uiteindelijk uitmonden in kanker. Vrouwen die roken en vrouwen die een verminderd immuunsysteem hebben door bijvoorbeeld HIV/AIDS hebben vaker een persisterende HPV-infectie en dus ook vaker HPV-geassocieerde vormen van kanker. We begrijpen nog niet goed waarom het sommige vrouwen zónder deze risicofactoren ook niet in staat zijn het virus te kuren. HPV-positieve vulvacarcinomen worden voorafgegaan door een premaligne huidaandoening 'usual vulvar intraepithelial neoplasia', afgekort uVIN. Vrij vertaald staat dit voor 'meest voorkomende nieuwvorming in het epitheel van de huid van



de vulva', met als kenmerk dat er wel afwijkende cellen in de epitheellaag van de huid aanwezig zijn, maar dat deze niet doorgroeien door de basaalmembran die de huid van het onderliggende weefsel scheidt. De voorlopers van baarmoederhalskanker die door HPV worden veroorzaakt gaan meestal onopgemerkt, terwijl uVIN juist vaak klachten van jeuk en pijn kan geven. Onbehandelde patiënten met uVIN ontwikkelen in 9-16% van de gevallen een maligniteit die wél doorgroeit. Bij patiënten die wel behandeling krijgen is dit nog 3%. Dit HPV-positieve type vulvacarcinoom komt vaker voor bij jonge vrouwen met een gemiddelde leeftijd van 40 jaar. Het is geassocieerd met roken en promiscuïteit.

De overige 60% van de vulvacarcinomen is niet geassocieerd met HPV en komt juist vaker voor bij oudere vrouwen, met een gemiddelde leeftijd van 70 jaar. Dit type kan worden voorafgegaan door lichen sclerosus, een chronische autoimmuunontsteking van de huid. In sommige gevallen kan de voorloper 'differentiated vulvar intraepithelial neoplasia' (dVIN) worden gevonden. Gedifferentieerd betekent in dit geval dat de tumorcellen ver zijn uitgerijpt en sterk lijken op het oorspronkelijke weefsel. Dit type VIN is dan ook zeer moeilijk te herkennen, en wordt vaak pas gezien als er al vulvacarcinoom is ontstaan. Drie tot 5% van alle vrouwen met lichen sclerosus ontwikkelt uiteindelijk kanker. Deze groep vrouwen met vulvacarcinoom hebben een slechtere prognose dan de vrouwen met een HPV-geassocieerde tumor.

Genetische mutaties in HPV negatieve vulvacarcinomen

De HPV-negatieve vulvacarcinomen worden geassocieerd met lichen sclerosus, maar ook met genetische mutaties. Het meest bestudeerde gen waarin ook de meeste mutaties zijn gevonden is het gen *tp53*. *tp53* is de bewaker van de celcyclus: wanneer er een fout wordt ontdekt in het DNA van een cel, zal *tp53* de celdeling afremmen. Wanneer *tp53* beschadigd is geraakt door een mutatie kan de cel ongecontroleerd gaan delen en ontstaat er instabiliteit in de chromosomen. Er is bij vulvacarcinomen weinig onderzoek gedaan naar mutaties in andere genen dan in *tp53*. In kleine studies hebben Holway en Growden laten zien dat een deel van de vulvacarcinomen mutaties in het gen *PTEN* dragen. O'Nions, soufir en Gasco hebben mutaties in *CDKN2A* aangetoond. *PTEN* en *CDKN2A* zijn allebei tumorsuppressorgenen die onderdeel uitmaken van de signaalstructuur die de celcyclus kunnen afremmen en cellen zelfs tot apoptose kunnen doen overgaan. In melanomen, long-, colorectaal- en borstkanker is al aangetoond dat tumorspecifieke mutaties gebruikt kunnen worden als voorspeller voor overleving, en zelfs voor tumorspecifieke behandelstrategieën. Een aantal studies naar dit soort gerichte therapieën hebben veelbelovende resultaten laten zien, zoals bijvoorbeeld in de PI3K/AKT/mTOR route bij colorectalkanker.



Epigenetische veranderingen

Een genetische mutatie houdt in dat een deel van de DNA volgorde in een cel veranderd is. Vulvacarcinomen ontstaan mogelijk ook ten gevolge van een ander soort verandering, namelijk 'epigenetische' verandering. Epigenetische veranderingen zoals hypermethylering zijn overerfbare veranderingen in genexpressie, zonder dat er een verandering in de DNA volgorde optreedt. Hypermethylering werkt als een schakelaar die genen aan en uit kan zetten. Hiermee kan bijvoorbeeld een tumorsuppressorgen uitgeschakeld worden. In vulvacarcinomen is hypermethylering van onder andere *RASSF2A*, *MGMT* en *TSP1* beschreven.

Morfologische factoren met voorspellende waarde

Zoals eerder genoemd gebruikt de FIGO stadiering klinische en histologische parameters. Deze stadiering heeft zijn voorspellende waarde bewezen in grote groepen patiënten. Om de mortaliteit en morbiditeit bij patiënten met vulvacarcinoom nog lager te kunnen krijgen is het belangrijk onderzoek te blijven doen naar nieuwe, aanvullende risicofactoren. Op dit moment zijn lymfekliermetastasen de enige betrouwbare maat voor overleving en de kans op een recidief. In dit proefschrift beschrijven we morfologische karakteristieken die mogelijk kunnen bijdragen aan het maken van een juiste voorspelling. Vulvacarcinomen met een sprieterig groeipatroon hebben mogelijk een slechtere prognose dan 'gewone', in solide veldjes groeiende vulvacarcinomen. Deze sprieterige spoelvormige cellen, of spindle shaped cells in het engels, zijn dunner en groeien niet in eilandjes, maar als losse langgerekte cellen of in sprieterige uitlopers. Spoelcellige tumoren komen voor bij veel soorten tumoren en worden bij slokdarm-, long-, mond- en keelkanker geassocieerd met een slechtere prognose. De spoelvormige cellen lijken hun epitheliale karakter te verliezen en hebben een groter vermogen zich los te maken van de oorspronkelijke tumor en in het onderliggende weefsel te infiltreren.

Epitheliale naar Mesenchymale Transitie

Onderzoek wijst uit dat invasief groeiende vulvacarcinomen wellicht ten dele Epitheliale naar Mesenchymale Transitie (EMT) ondergaan. EMT is een proces dat tijdens de embryonale ontwikkeling plaatsvindt, maar soms ook wordt waargenomen bij kankercellen. Cellen die EMT ondergaan verliezen epitheliale kenmerken, en gaan steeds meer op mesenchymale cellen lijken. Zo verandert de vorm van de cel, verliezen de cellen hun onderlinge samenhang en wordt het voor de cellen mogelijk om los te komen van de primaire tumor. Hierdoor kunnen de cellen ingroeien in het onderliggend weefsel en zo via bloed- of lymfevaten metastaseren. Door EMT kunnen vaste tumoren dus losse, invasieve cellen vormen. Verschillende signaalroutes spelen een rol bij EMT, waaronder de Wnt en NOTCH-routes. Een van de grote aanstuurders van EMT is Transforming Growth Factor- β (TGF- β). In gezonde cellen is TGF- β een tumorsuppressor, maar in maligne cellen kan TGF- β juist cel-



motiliteit en angiogenese stimuleren. Ook L1CAM is een promotor van celmotiliteit die mogelijk een rol speelt in EMT. L1CAM wordt in steeds meer tumortypes gezien als een marker voor prognose. L1CAM is een membraanglycoproteïne dat tijdens neurale ontwikkeling kan zorgen voor zowel celmotiliteit als celadhesie. In gezond weefsel wordt L1CAM met name tot expressie gebracht door zenuwweefsel, maar soms wordt het ook gevonden op het oppervlak van tumorcellen. Cellen gaan invasiever groeien wanneer tumoren in vitro worden blootgesteld aan L1CAM. Ook in vivo is dit proces herkenbaar, doordat L1CAM met name en soms zelfs alleen maar tot expressie wordt gebracht door de cellen aan de invasieve rand van tumoren. De rol van L1CAM is al onderzocht bij gynaecologische tumoren zoals endometrium- en ovariumcarcinoom, maar nog niet bij vulvacarcinoom.

Inhoud van dit proefschrift

de etiologie van HPV-positieve vulvacarcinomen wordt inmiddels goed begrepen, maar de HPV-onafhankelijke route moet nog worden ontrafeld. Dit proefschrift bevat resultaten van onderzoek waarmee wij proberen meer inzicht te verkrijgen in de ontstaanswijze van vulvacarcinoom.

In **hoofdstuk 2** wordt beschreven hoe een mutatieanalyse-panel werd ontwikkeld dat specifiek geschikt is voor gynaecologische maligniteiten. Dit panel richt zich op de meest relevante mutaties in cervix-, endometrium-, ovarium- en vulvacarcinoom. Om genetische mutaties in vulvacarcinomen te kunnen bestuderen werd een techniek geselecteerd (massaspectometrie) die geschikt is voor het kleine aantal patiënten met vulvacarcinoom en de daarbij behorende kleine hoeveelheid DNA-materiaal, dat vaak ook nog eens van matige kwaliteit is. Het is grotendeels nog onduidelijk welke genetische mutaties voorkomen in vulvacarcinomen. *TP53* is een bekende speler, maar mutaties in *CDKN2A* en *PTEN* zijn ook beschreven. De genen *HRAS*, *KRAS* en *NRAS* zijn eerder al bestudeerd in vulvacarcinomen, maar er werd tot nu toe nog geen mutatie in deze genen gevonden. Omdat er slechts kleine aantallen studies naar mutaties in vulvacarcinomen zijn verricht, hebben wij bij het samenstellen van het mutatiepanel gebruik gemaakt van kennis over mutaties bij vergelijkbare tumortypes, zoals gynaecologische tumoren, plaveiselcelcarcinomen van de huid, en hoofd-halstumoren. 171 somatische hotspot mutaties in 13 verschillende genen werden in het panel geïncorporeerd. (*BRAF*, *CDKN2A*, *CTNNB1*, *FBXW7*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FOXL2*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PPP2R1A* en *PTEN*). In totaal werden 564 tumoren (205 cervixcarcinomen, 227 endometriumcarcinomen, 89 ovariumcarcinomen en 25 vulvacarcinomen) gebruikt om het panel te testen en valideren. In 20% van de 25 vulvacarcinomen die in deze studie werden geanalyseerd werden mutaties gevonden in *CDKN2A*, *PIK3CA* en *HRAS*. Mutaties in *PIK3CA* en *HRAS* waren niet eerder beschreven bij vulvacarcinomen. Tegen verwachting in werden geen mutaties in *PTEN* gevonden. De re-



sultaten werden gevalideerd door enkele samples in duplo of in triplo te analyseren. Het panel bleek geschikt om grote aantallen samples tegelijk te bestuderen, was reproduceerbaar en bruikbaar voor paraffinemateriaal van lage kwaliteit en kwantiteit.

In **hoofdstuk 3** werd dit panel toegepast op een cohort van 108 patiënten met vulvacarcinomen. Deze patiënten werden tussen 2000 en 2009 behandeld voor een primair vulvacarcinoom in het Leids Universitair Medisch Centrum. Follow-up gegevens tot december 2012 werden verzameld uit patiëntendossiers. Hiermee is een groot cohort ontstaan, dat verder in dit proefschrift vaker gebruikt zal worden. Tumorweefsel van de patiënten in dit cohort werd onderzocht op aanwezigheid van HPV en middels massaspectrometrie onderzocht op de mutaties genoemd in het voorgaande hoofdstuk (*BRAF*, *CDKN2A*, *CTNNB1*, *FBXW7*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FOXL2*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PPP2R1A* en *PTEN*). Daaraan werd het gen *TP53* toegevoegd dat middels Sanger sequencing werd bestudeerd. In 7 van de bovengenoemde genen werden mutaties aangetroffen. Van de 107 patiënten waarvan genoeg tumorweefsel was om mutatieanalyses te verrichten bevatten er 66 (62%) tenminste één mutatie. (*TP53* = 58, *CDKN2A*(p16) = 14, *HRAS* = 10, *PIK3CA* = 7, *PPP2R1A* = 3, *KRAS* = 1, *PTEN* = 1). Zeventien procent van de tumoren in dit cohort was HPV-positief. Mutaties kwamen het meest voor bij HPV-negatieve tumoren. De 5-jaarsoverleving was significant slechter voor patiënten mét een mutatie (47% versus 59%, $P = 0.035$). Het duidelijkst was dit verschil bij patiënten met een *HRAS*-mutatie.

In **hoofdstuk 4** werden de uitkomsten van hoofdstuk 3 vergeleken met de huidige kennis over genetische en epigenetische veranderingen in vulvacarcinomen en de voorlopers van vulvacarcinomen. Deze literatuurstudie liet zien dat veel onderzoekers hebben aangetoond dat genetische mutaties vaker voorkomen bij HPV-negatieve vulvacarcinomen dan bij HPV-positieve vulvacarcinomen. Het gen dat het meest gemuteerd was is *TP53*. 'Allelic imbalance' en 'loss of heterozygosity' werden vaker gevonden in hogere stadia van dysplasie en invasieve carcinomen en kwam voor bij zowel HPV-positieve als HPV-negatieve tumoren. Een klein aantal studies beschrijft epigenetische veranderingen in vulvaire laesies. Hypermethylatie werd het meest bestudeerd en dan met name hypermethylatie van het gen *CDKN2A*. Voor de meeste genen geldt dat hypermethylatie vaker voorkomt in carcinomen dan in voorloperlaesies.

De meerderheid van vulvacarcinomen zijn plaveiselcelcarcinomen, en binnen dit type kanker kunnen morfologische subclassificaties worden gemaakt die kunnen helpen te voorspellen en begrijpen wat de prognose voor patiënten is. In **hoofdstuk 5** beschrijven we het spoelcellige of spindle cell carcinoom, een subtype van plaveiselcelcarcinoom. Dit subtype wordt in verschillende soorten kanker beschreven en geeft in plaveiselcelcarcinomen van de long, slokdarm en het hoofd-halsgebied een slechtere prognose. Spindle cellen hebben hun epitheliale



kenmerken deels verloren en lijken makkelijker door te dringen in onderliggende weefsels. Het cohort van 108 patiënten werd onderzocht door middel van keratinekleuringen op weefselcoupes. In 20% van de gevallen bleek een component met spoelvormige cellen aanwezig. Deze patiënten hadden een slechtere prognose, met een 5-jaarsoverleving van 27.3 versus 58.2% ($P = 0.00041$) en een verhoogd risico op lymfekliermetastasen (relatief risico 2.26 met een 95% confidence interval van 1.47-3.47). Ook ziekte-specifieke overleving was significant slechter voor patiënten met spindle cell morfologie (45.2% versus 79.7% 5-jaarsoverleving, $P = 0.00057$). Wanneer gecorrigeerd werd voor mogelijke confounders bleek spindle cell morfologie een onafhankelijke prognostische factor voor overleving, met een hazard ratio van 4.1 (95% CI 1.61-10.60). Dit tumortype lijkt in sommige gevallen te ontstaan onder invloed van EMT, een proces dat onder invloed staat van onder andere L1CAM.

In **hoofdstuk 6** werd de prevalentie en prognostische waarde van L1CAM onderzocht in twee cohorten uit het Leids en het Groningse Universitair Medisch Centrum. L1CAM kan de celmotiliteit in tumoren stimuleren en blijkt bij steeds meer kankertypes een prognostische rol te spelen. Het Leidse cohort van 103 geschikte tumorweefsels en een tweede cohort uit Groningen van 245 primaire vulvacarcinomen werden gekleurd voor L1CAM, vimentine en E-cadherine. Het Leidse cohort was eerder al onderzocht op HPV-infectie en de aanwezigheid van *TP53* en *CTNNB1* mutaties. L1CAM werd gezien in het invasieve front van 17% van alle tumoren die werden onderzocht. L1CAM-positieve tumoren brachten vaker vimentine tot expressie, wat een maat is voor verlies van epitheliale kenmerken. L1CAM expressie was niet gecorreleerd met *TP53* of *CTNNB1* mutaties. De 5-jaarsoverleving was slechter voor patiënten met L1CAM-expressie (overall overleving 46.1% vs 63.6%, $P=.014$, ziekte specifieke overleving 63.8% vs 80.0%, $P=.018$). Multivariate analyse wijst L1CAM expressie aan een onafhankelijke prognostische marker is voor overleving (HR 2.9, 95% CI 1.10–7.68). Een in vitro assay met sferoïden van door ons gekweekte L1CAM-positieve vulvacarcinoomcellen laat zien dat de mate van invasieve groei afneemt wanneer L1CAM geneutraliseerd wordt.

In **hoofdstuk 7** werd de relatie tussen genetische mutaties en morfologische kenmerken onderzocht. Inmiddels is aangetoond dat patiënten met spindle cell carcinomen een hoger risico op lymfekliermetastasen hebben. Het is echter nog niet duidelijk of het de spoelvormige cellen zelf zijn die naar de lymfeklieren metastaseren. Als de spindle cel component van een tumor een uniek mutatieprofiel heeft dat verschilt van dat van de solide component in de primaire tumor, kan dit profiel gebruikt worden om te onderzoeken welke component van de tumor metastaseert of recidiveert. In dit hoofdstuk werden 66 tumoren uit het basiscohort geselecteerd die een lymfekliermetastase of een recidief hadden. Om spindle cellen te isoleren uit de andere tumorcellen en gezond weefsel werd gebruik gemaakt van Fluorescence Activated Cell Sorting. Alle samples werden onderzocht



op de aanwezigheid van een mutatie in de genen *BRAF*, *CDKN2A*(p16), *CTNNB1*, *FBXW7*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FOXL2*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PPP2R1A* en *PTEN*. Er was geen verschil in mutatiefrequentie tussen vulvacarcinomen met of zonder spindle cell morfologie (77% versus 58%). Ook in recidieven en metastasen bleken *TP53*, *CDKN2A* en *HRAS* het meest gemuteerd. De mutatieprofielen van de primaire tumor waren in 58% verschillend van de lymfekliermetastasen en in 71% van de recidieven. Het mutatieprofiel van spindle cell componenten leek vaker op dat van de solide groeiende cellen in de primaire tumor dan metastasen en recidieven, maar was in 14% van de gevallen toch verschillend van de solide component in de primaire tumor. Mutaties die primaire spindle cellen konden verbinden met recidieven of metastasen werden niet gevonden. Hiermee konden we niet aantonen dat er een selectieve rol is voor genetische mutaties in het ontstaan van spindle cell carcinomen of voor progressie naar metastasen en recidieven. Wel laat dit onderzoek de aanwezigheid van verschillende klonen binnen een tumor zien, die ieder een eigen spectrum van mutaties bij zich dragen. Het is van belang bewust te zijn van klonaliteit van tumoren, omdat bij gerichte therapie selectie kan plaatsvinden van klonen die een afwijkend spectrum hebben ten opzichte van de rest van de tumor. Vrijwel alle vulvacarcinomen met spindle cell morfologie bleken bij FACS analyse aneuploid.

De gegevens die bij de totstandkoming van dit proefschrift zijn verzameld hebben ons nieuwe inzichten gegeven in het gedrag van vulvacarcinomen. We hebben bevestigd dat HPV gerelateerde plaveiselcelcarcinomen van de vulva in de basis een ander type tumor is dan plaveiselcelcarcinomen van de vulva die zijn ontstaan vanuit genetische mutaties. Dat *TP53* een belangrijke speler is staat buiten kijf. In dit proefschrift wordt aangetoond dat er meerdere andere mutaties zijn die bijdragen aan het ontstaan en de progressie van vulvacarcinomen.

We hopen dat de resultaten in dit proefschrift een begin zullen zijn van een nieuw hoofdstuk in het onderzoek naar vulvacarcinomen, en dat dit nieuwe mogelijkheden zal bieden waarmee we vulvacarcinoom beter kunnen begrijpen, maar vooral ook beter kunnen behandelen.

