

### Nederlandse samenvatting

**Studies naar mucosale en huid HPV typen:**  
de rol van genotypen en natuurlijk voorkomende varianten bij het  
bepalen van hun oncogene eigenschappen

- Het humaan papillomavirus en tumor ontwikkeling
- Humaan papillomavirus type 16 varianten wereldwijd
- Functionele karakterisatie van de E6 en E7 onco-eiwitten van verschillende beta huid humaan papillomavirus typen

## **Studies naar mucosale en huid HPV typen:**

de rol van genotypen en natuurlijk voorkomende varianten bij het bepalen van hun oncogene eigenschappen

### **Het humaan papillomavirus en tumor ontwikkeling**

Het humaan papillomavirus (HPV) is een klein dubbelstrengs-DNA virus dat epiteelcellen infecteert. Er zijn voornamelijk twee genera HPV typen; het alpha genus bestaande uit typen die de slijmvliezen infecteren, mucosale HPV typen genoemd, en het beta genus waarvan de typen de huid infecteren, de zogenaamde huid HPV typen. De mucosale HPV typen kunnen onderverdeeld worden in hoog -en laag-risico HPV typen, al naar gelang ze een hoog of laag risico met zich meebrengen voor het veroorzaken van ernstige premaligne baarmoederhals laesies en baarmoederhalskanker.

Van de hoog risico (HR) HPV typen is HPV16 het meest frequent geassocieerd met de ontwikkeling van baarmoederhalskanker. Daarnaast is een HPV16 infectie ook de meest voorkomende HPV infectie bij seksueel actieve vrouwen. De meerderheid van deze infecties wordt binnen 6 tot 12 maanden opgeruimd door het immuunsysteem en de eventueel gevormde laesies genezen dan. Een klein deel van deze infecties is echter blijvend, wat kan leiden tot premaligne baarmoederhals laesies en baarmoederhalskanker. Naast een HR-HPV infectie, zijn er meer risico-factoren voor de ontwikkeling van baarmoederhalskanker, zoals: roken, immuun-suppressie, langdurig gebruik van orale anti-conceptie, etc. Maar ook bepaalde virale variabelen, zoals natuurlijk voorkomende HPV intra-type varianten, zouden een risico-factor voor baarmoederhalskanker kunnen zijn.

Het HPV genoom codeert voor 7 of 8 genen, afhankelijk van het HPV type. Twee van deze genen coderen voor oncogene eiwitten (onco-eiwitten), genaamd E6 en E7. De activatie en expressie van deze genen zijn nauw

betrokken bij tumor ontwikkeling en het in stand houden van de tumor. E6 en E7 verstoren de functies van twee belangrijke tumor suppressor eiwitten, respectievelijk p53 en retinoblastoma (pRb) geheten. P53 kan een cel cyclus stop of apoptose (geprogrammeerde celdood) induceren nadat er DNA schade is opgetreden. Dit voorkomt dat DNA veranderingen worden gerepliceerd en doorgegeven aan dochtercellen. pRb is betrokken bij de regulatie van de celdelingcyclus. Bij infectie met HPV16 worden p53 en pRb afgebroken met behulp van E6 en E7, respectievelijk, wat leidt tot ongecontroleerde celdeling.

### **Humaan papillomavirus type 16 varianten wereldwijd**

HPV intratype varianten zijn HPVs van hetzelfde type waarvan de DNA sequentie slechts voor een klein percentage (maximaal 2%) afwijkt van andere varianten van hetzelfde type. Het is aangetoond dat HPV16 varianten patronen van single nucleotide polymorphisms (SNPs) hebben die phylogenetisch in verschillende lijnen voorkomen, namelijk de Europese (EUR), Aziatische (As), Aziatisch-Amerikaanse / Noord-Amerikaanse (AA/NA) lijn, alsmede 2 Afrikaanse lijnen, Afrikaans 1 en Afrikaans 2 (AFR1 en AFR2). De namen van deze lijnen komen voort uit de geografische regio's waar ze het eerst gedetecteerd zijn.

In dit proefschrift hebben we ons voornamelijk gericht op HPV16 varianten als risico-factor voor een blijvende HPV16 infectie en voor de ontwikkeling van baarmoederhalskanker. De doelstellingen van dit deel van het proefschrift waren:

- 1) het karakteriseren van HPV16 varianten uit geographisch en etnisch verschillende populaties vrouwen
- 2) het bepalen of het risico op blijvende HPV16 infecties en op baarmoederhalskanker geassocieerd zijn met specifieke HPV16 varianten

- 3) het evalueren of de oncogeniciteit van HPV16 varianten afhankelijk is van de geografische afkomst van de vrouwen

De baarmoederhals monsters voor deze studies waren afkomstig uit de biobank van het International Agency for Research on Cancer (IARC). Deze biobank bevat een groot aantal HPV16-positieve uitstrijkjes van vrouwen zonder cytologische afwijkingen (controles) en HPV16-positieve biopten van baarmoederhalskanker (cases) van vrouwen uit verschillende werelddelen met verschillende etniciteit. De HPV16 varianten zijn geanalyseerd in het E6 oncogeen en in het niet-coderende lange controle gebied (LCR) dat belangrijk is voor de regulatie van de expressie van de virale genen.

**Hoofdstuk 2** beschrijft HPV16 E6 en LCR varianten en de phylogenetische analyse hiervan (evolutionaire stamboom). De HPV16 varianten zijn geëvalueerd in 953 virale isolaten (van baarmoederhalskanker biopten en van normale baarmoederhals-cellen) afkomstig uit 27 landen. De DNA sequenties van het E6 gen en de LCR waren geanalyseerd d.m.v. polymerase chain reaction (PCR) amplificatie van deze gebieden gevolgd door een directe sequence analyse van het PCR product. Deze DNA sequenties zijn vergeleken met de HPV16 prototype sequentie om de single nucleotide polymorfismen (SNPs) te detecteren. Van deze DNA sequenties is een fylogenetische boom geconstrueerd, waarvan elke grote tak een variant lijn beschrijft. Met deze uitgebreide phylogenetische analyse zijn alle in de literatuur beschreven lijnen gedetecteerd, te weten EUR, As, AA/NA, AFR-1 en AFR-2. Daarnaast, zijn twee sub-lijnen binnen beide Afrikaanse lijnen gedetecteerd, genaamd AFR-1a, AFR-1b, AFR-2a en AFR-2b. Elk van deze HPV variant lijnen wordt gekarakteriseerd door een 'specifiek' patroon van SNP's, welke ook zijn beschreven in Hoofdstuk 2. Met behulp van deze SNP's kunnen de verschillende isolaten in lijnen geclassificeerd worden zonder een uitgebreide fylogenetische analyse uit te voeren. Dit kan in de toekomst gebruikt worden om snel en met goedkopere technieken de HPV16 variant lijnen te analyseren.

De verspreiding van de HPV16 variant lijnen is geografisch en etnisch afhankelijk en de namen van de lijnen blijken veelal overeen te komen met de namen van de continenten waar ze in onze studie het meest gedetecteerd zijn. Uitzonderingen hierop zijn de Europese lijn, die niet alleen in Europa, maar ook vaak in Zuid/Centraal Amerika en delen van Azië wordt gedetecteerd en de Noord-Amerikaanse lijn, die vaker in Noord-Afrika gedetecteerd wordt dan in Noord-Amerika.

In **Hoofdstuk 3** is een wereldwijde case-controle studie beschreven, waarin het risico op baarmoederhalskanker in relatie tot de HPV16 varianten werd onderzocht. 1211 baarmoederhalskanker cases en 400 controles van verschillende landen zijn hierbij geanalyseerd voor varianten in het E6 oncogen. De classificatie van Hoofdstuk 2 werd gebruikt om de gedetecteerde varianten in lijnen te classificeren, in dit geval: EUR, As, AFR en NA/AA. Verschillen in de aanwezigheid van de HPV16 variant lijnen in baarmoederhalskanker cases versus controles zijn getoetst met de Fisher's exact test per land en per regio. Met deze methode zijn geen significante verschillen in de verdeling van de variant lijnen tussen baarmoederhalskanker cases en controles gedetecteerd.

De meest voorkomende individuele SNP in de Europese lijn is T350G in het E6 gen. Hiermee kunnen isolaten van de EUR lijn worden verdeeld in isolaten met 350T (EUR-350T) of met 350G (EUR-350G). Ondanks het feit dat deze SNP geen fylogenetische lijnen definieert, zijn er aanwijzingen dat deze het risico op baarmoederhalskanker kan beïnvloeden. Met een onderverdeling van HPV16 varianten op basis van deze SNP zijn statistisch significante verschillen voor risico op baarmoederhalskanker gedetecteerd in de verschillende continenten. In Zuid/Centraal Amerika werd de EUR-350G vaker gedetecteerd in baarmoederhalskanker dan in controles (OR = 4.69; 95% CI = 2.07-10.66). Echter, in Oost Azië en Europa/Centraal Azië werd EUR-350G minder vaak gedetecteerd in baarmoederhalskanker (OR = 0.02; 95% CI = 0.00-0.37, en OR = 0.42; 95% CI = 0.27-0.64 respectievelijk).

In **Hoofdstuk 4** en **Hoofdstuk 5** zijn twee follow-up studies beschreven van vrouwen behorende tot de normale populatie in twee verschillende landen. Namelijk Denemarken en Frankrijk, waarbij werd gekeken naar HPV16 varianten en hun associatie met blijvende (persistente) infecties in vergelijking met voorbijgaande (transiënte) infecties. Het betrof hier analyses op uitstrijkjes van vrouwen met normale cytologie. De meest gedetecteerde HPV16 variant lijn in beide landen was de Europese lijn. Zoals hierboven beschreven is, kan deze lijn onderverdeeld worden in EUR-350T en EUR-350G. In Denemarken bleek de EUR-350T variant geassocieerd te zijn met een significant hoger risico op een blijvende infectie, met danwel zonder progressie naar een cervicale intra-epitheliale neoplasie van graad 3 of hoger (OR = 2.06; 95% CI = 1.04-4.26). In Frankrijk was er een trend in dezelfde richting; EUR-350T was niet significant meer gerelateerd is aan blijvende infecties (OR = 1.6; 95% CI = 0.8-3.4).

Samenvattend is in dit proefschrift beschreven dat de verspreiding van HPV16 variant lijnen en het risico op baarmoederhalskanker een geografische afhankelijkheid laat zien.

In drie van de beschreven studies was de EUR-350T variant geassocieerd met een ernstiger beloop in Europese populaties dan EUR-350G, e.g. EUR-350T geeft een hoger risico op een blijvende infectie en op baarmoederhalskanker in verschillende Europese landen. Dit is in tegenstelling tot Zuid/Centraal Amerika, waar een hoger risico op baarmoederhalskanker was gerelateerd aan de EUR-350G variant. Dit suggereert dat de immunogene eigenschappen van HPV16 varianten gastheer-afhankelijk zijn. Gastheer-genetische factoren, zoals HLA-haplotypen die verschillen per populatie, zouden een rol kunnen spelen bij de associatie tussen HPV16 varianten en de ontwikkeling van baarmoederhalskanker. De bevindingen van dit proefschrift laten zien dat HPV16 varianten een belangrijke rol spelen bij de aard van de HPV16 infectie, voorbijgaand of blijvend, en bij de ontwikkeling van

baarmoederhalskanker. Desondanks is het gebruik van HPV varianten als marker voor baarmoederhalskanker nog niet bewezen.

## **Functionele karakterisatie van de E6 en E7 onco-eiwitten van verschillende huid beta humaan papillomavirus typen**

Van de huid beta HPV typen wordt gedacht dat deze, samen met ultra violet (UV) -irradiatie (door zonlicht), een rol spelen bij de ontwikkeling van niet-melanoom huidkanker, voornamelijk plaveiselcelcarcinomen. De met huidkanker geassocieerde huid HPV typen zijn voor het eerst geïsoleerd uit patiënten met Epidermodysplasie Verruciformis (EV). Deze patiënten zijn erg gevoelig voor infecties met beta HPV typen en ontwikkelen vaak huidkanker op zon-blootgestelde delen van de huid. Ook bij immuun-deficiënte patiënten komen plaveiselcelcarcinomen van de huid vaker voor dan bij de normale populatie. Dit suggereert een mogelijke rol voor beta HPV typen bij de ontwikkeling van huidkanker. Een aantal functionele studies hebben laten zien dat de E6 en E7 onco-eiwitten van enkele beta HPV typen (e.g. HPV5, 8 en 38) primaire huidcellen (keratinocyten) kunnen immortaliseren en transformeren. Aan de andere kant, zijn de beta HPV typen ook frequent aanwezig op de huid van gezonde individuen. Hierdoor is de rol van de beta HPV typen bij de ontwikkeling van huid tumoren nog steeds onduidelijk.

In **Hoofdstuk 6** van dit proefschrift zijn de biologische eigenschappen van de E6 en E7 onco-eiwitten van verschillende beta HPV typen gekarakteriseerd met als doel hun mogelijke oncogeniteit in de mens te voorspellen.

De E6 en E7 genen van HPV 14, 22, 23, 24, 36, 38 en 49 zijn bestudeerd door deze in primaire keratinocyten te transduceren met behulp van een retrovirale expressie vector, en daarna de getransduceerde cellen te karakteriseren. Alleen HPV 38 en 49 E6 en E7 bleken deze primaire keratinocyten direct te kunnen immortaliseren. Dit waren ook de enige typen in

de bestudeerde set die de functies van de tumorsuppressor eiwitten p53 en pRb konden beïnvloeden. Beide HPV typen bleken hyperphosphorylering van pRb te kunnen bewerkstelligen, wat leidt tot de inactivatie van pRb en voortgang van de celdelingcyclus. Het HPV38 E6E7 construct bewerkstelligde daarnaast activatie van  $\Delta Np73\alpha$ , een remmer van p53, wat resulteert in p53 inactivering. Anderzijds resulteerde introductie van HPV49 E6E7 in de afbraak van het p53 eiwit. Alhoewel de afbraak minder sterk was dan bij het mucosale HR-HPV type 16, werd hetzelfde mechanisme gebruikt als door HPV16 E6. Dit is de eerste studie waarin een overeenkomst wordt gezien tussen de eigenschappen van HPV16 en een beta HPV type.

Deze studie suggereert dat de beta HPV typen, net als de mucosale HPV typen, verdeeld kunnen worden in hoog en laag risico typen, e.g. HPV38 en 49 als hoog risico beta HPV typen voor de ontwikkeling van plaveiselcelcarcinomen van de huid. De andere bestudeerde beta HPV typen kunnen gezien worden als laag-risico beta HPV typen.

De studies beschreven in dit proefschrift kunnen leiden tot betere middelen om de klinische gevolgen van HPV infecties en de maligne consequenties hiervan in te schatten en onder controle te houden.