

Hoofdstuk 9

Nederlandse samenvatting

Nederlandse samenvatting

Essentiële moleculaire mechanismen die bijdragen aan HPV-gemedieerde transformatie

Baarmoederhalskanker is, vooral in de derde wereld, nog altijd een veel voorkomende vorm van kanker bij vrouwen. Deze vorm van kanker wordt veroorzaakt door een infectie met het hoog-risico humaan papillomavirus (hrHPV). Baarmoederhalskanker kan globaal worden onderverdeeld in twee subtypen, namelijk het plaveiselcelcarcinoom en het adenocarcinoom. Van het plaveiselcarcinoom is bekend dat deze vorm van kanker ontstaat vanuit een aantal goed herkenbare voorstadia van kanker, ook wel voorloperlaesies genoemd, de zogenaamde cervicale intraepitheliale neoplasieën (CIN). Door middel van een bevolkingsonderzoek, waarbij uitstrijkjes van de baarmoederhals worden beoordeeld op de aanwezigheid van afwijkende cellen, kunnen deze voorloperlaesies en baarmoederhalskanker vroegtijdig worden opgespoord en behandeld. Dit heeft in de westerse landen geleid tot een sterke daling van het aantal vrouwen met baarmoederhalskanker. Recente studies hebben aangetoond dat het bevolkingsonderzoek verbeterd kan worden door te testen op de aanwezigheid van hrHPV in uitstrijkjes, hetgeen in de nabije toekomst de klassieke cytologische beoordeling van uitstrijkjes hoogstwaarschijnlijk zal gaan vervangen.

Hoewel een persisterende infectie met hoog-risico HPV (hrHPV) noodzakelijk is voor de ontwikkeling van baarmoederhalskanker en zijn voorloperlaesies, zijn daarnaast ook DNA veranderingen in het genoom van de geïnfecteerde gastcel nodig voor de progressie naar een kankercel. Ondanks dat al veel DNA veranderingen in baarmoederhalskankercellen in kaart zijn gebracht, is het nog altijd onduidelijk welke veranderingen daadwerkelijk actief bijdragen aan HPV geïnduceerde carcinogenese. Om een beter beeld te krijgen van deze zogenaamde moleculaire veranderingen die functioneel betrokken zijn bij het ontstaan van baarmoederhalskanker, is het gebruik van *in vitro* model systemen zeer waardevol. Eerdere studies hebben aangetoond dat door het transfecteren van humane voorhuid keratinocyten met hrHPV, vier opeenvolgende stadia van transformatie kunnen worden geïdentificeerd; (I) een verlengde levensduur (langer kunnen delen), (II) immortalisatie (onbeperkt kunnen delen), (III) groei zonder hechting (zonder afhankelijkheid van extracellulair substraat kunnen delen) en (IV) tumorigeniteit (vormen van invasieve tumoren in proefdieren). Het eerste stadium, de verlengde levensduur van de cellen, is een direct gevolg

van de aanwezigheid van het virus. Bij de ontwikkeling van de andere drie stadia zijn veranderingen in het genoom van de gastheer cel zelf betrokken.

In dit proefschrift zijn een aantal veranderingen in de gastcel die mogelijk een functionele rol spelen bij HPV-geïnduceerde transformatie onderzocht. We hebben ons met name gericht op de overgang van immortalisatie (stadium II) naar het stadium waarin de cellen kunnen groeien zonder hechting (stadium III). Hiervoor hebben we een longitudinaal *in vitro* model systeem van HPV16 en HPV18-bevattende keratinocyten, alsmede baarmoederhalskankercellijnen bestudeerd waarin de verschillende stadia van transformatie goed te onderscheiden zijn. Daarnaast hebben we ook patiëntenmateriaal, waaronder baarmoederhalscarcinomen en de voorloperlaesies bestudeerd. Door deze gecombineerde aanpak wordt een totaalbeeld verkregen van zowel de functionele als klinische relevantie van de gastcel veranderingen die we hebben onderzocht. Met behulp van deze benadering krijgen we niet alleen meer inzicht in de biologie van baarmoederhalskanker, maar kunnen ook nieuwe strategieën voor screening of behandeling ontworpen worden.

Identificatie van veranderingen in DNA methylering gedurende het proces van HPV-geïnduceerde carcinogenese

In hoofdstuk 2 hebben we opeenvolgende passages van cellen van het *in vitro* model systeem getest op promoter methylering van 29 kandidaat tumor suppressor genen door middel van de techniek “Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification” (MS-MLPA). Dit resulteerde in de ontdekking van meerdere elkaar opeenvolgende veranderingen in DNA methylering die optreden tijdens het proces van HPV-geïnduceerde transformatie. In vroeg immortale cellen waren de promotors van genen TP73 en ESR1 al gemethyleerd, hierop volgde RAR β en DAPK1 in laat immortale cellen, en MGMT in cellen die kunnen delen zonder hechting. Dezelfde veranderingen in DNA methylering werden ook gevonden in baarmoederhalskankercellijnen, welke daarnaast ook nog methylering van CADM1, CDH13 en CHFR toonden. Deze 8 veranderingen in methylering die konden worden toegeschreven aan de verschillende stadia van transformatie werden allen ook teruggevonden in baarmoederhalstumoren. Onderzoek naar zowel plaveiselcel- als adenocarcinomen toonde aan dat de promotor van MGMT het meest gemethyleerd was in beide tumortypen (92%). Methylering van DAPK1 en CADM1 kwam juist significant meer voor in

plaveiselcelcarcinomen, terwijl APC, CDKN2B, RASSF1A, TIMP3 en TP73 methylering vaker voorkwam in adenocarcinomen. Middels andere technieken, waaronder methylerings specifieke PCR (MSP), zijn deze bevindingen deels bevestigd.

Verminderde expressie van CADM1 en MAL ten gevolge van DNA methylering heeft functionele consequenties

In **hoofdstuk 3** zijn in HPV-geïmmortaliseerde keratinocyten, baarmoederhalskancercellijnen en weefsels, 3 regio's van de CADM1 promoter geanalyseerd voor DNA methylering. Er werd gevonden dat de dichtheid van methylering (methylering op 2 of meer van de 3 gebieden die geanalyseerd zijn) geassocieerd was met een verminderde genexpressie van CADM1 in cellijnen en groei zonder hechting in de cellijnen. Analyse van de 3 regio's in voorloperlaesies van baarmoederhalskanker gaf aan dat zowel de frequentie als de dichtheid van de CADM1 promoter methylering toenam met de ernst van de afwijking. Er werd significant meer dichte methylering gevonden in hooggradige voorloperlaesies (CIN3) (30%) en plaveiselcelcarcinomen (83%) dan in normaal baarmoederepitheel en laaggradige voorloperlaesies (5%) ($p=0.005$). In adenocarcinomen werd minder vaak dichte CADM1 methylering gevonden (23%). Immunohistochemische analyse van dezelfde weefsels toonde aan dat deze dichte methylering van de CADM1 promoter ook significant geassocieerd was met een verminderde eiwitexpressie van CADM1. Deze resultaten geven aan dat verminderde CADM1 expressie als gevolg van promoter methylering een functionele rol speelt bij het ontstaan van baarmoederhalskanker. Deze bevindingen kunnen daarom van toepassing zijn voor het verbeteren van het bevolkingsonderzoek, waarbij hrHPV-positieve vrouwen getest kunnen worden op CADM1 promoter methylering om zo het risico op het ontwikkelen van hooggradige voorloperlaesies en kanker nauwkeuriger in te schatten.

Gezien het feit dat CADM1 promoter methylering niet verhoogd was in adenocarcinomen, blijft het wel noodzakelijk verder onderzoek te doen naar veranderingen die ook bij dit type tumoren en de voorloperlaesies daarvan betrokken zijn.

Uit eerdere studies is gebleken dat de expressie van de tumorsuppressor MAL heel sterk verlaagd was in baarmoederhalstumoren ten opzichte van normaal baarmoederhalsweefsel. In **hoofdstuk 4** is het mechanisme dat ten grondslag

ligt aan de afname van MAL expressie en de functionele rol van MAL in transformatie onderzocht. MAL mRNA expressie was zeer laag in zowel HPV-geïmmortaliseerde cellijnen als in baarmoederhalskancercellijnen, maar kon worden opgereguleerd door een chemische stof die DNA methylering teniet doet. Hieruit blijkt dat DNA methylering een rol speelt bij de verminderde expressie van MAL in de cellijnen, hetgeen vervolgens bevestigd kon worden met MSP analyse. Wanneer MAL tot overexpressie werd gebracht in een baarmoederhalskancercelijn, leidde dit tot een vermindering van een aantal oncogene eigenschappen zoals viabiliteit, migratie en groei zonder hechting. Deze data geven aan dat de verminderde expressie van MAL een functionele rol speelt bij de ontwikkeling van baarmoederhalskanker.

Analyse van patiëntenmateriaal liet zien dat MAL promoter methylering toenam met de ernst van de afwijking, van 0% in normaal baarmoederhals weefsel, 9% in laaggradige voorloperlaesies tot 53% in hooggradige voorloperlaesies en 90% in plaveiselcelcarcinomen tegenover 93% in adenocarcinomen. DNA methylering in weefsel bleek ook significant gecorreleerd te zijn met verminderde MAL expressie. Het feit dat MAL promoter methylering vervolgens ook aantoonbaar bleek in uitstrijkjes en voorspellend was voor de onderliggende afwijking, geeft aan dat naast CADM1 ook methylering van MAL als zogenaamde marker kan fungeren voor de risico stratificatie van hrHPV positieve vrouwen.

Veranderingen in signaaltransductieroutes betrokken bij HPV-geïnduceerde transformatie

PI3-kinase signalering

Uit meerdere onderzoeken blijkt dat de PI3-kinase signaaltransductieroute een belangrijke rol speelt bij de ontwikkeling van kanker, waaronder mogelijk ook baarmoederhalskanker. In **hoofdstuk 5** is onderzocht wat de functionele bijdrage van deze route is aan HPV-geïnduceerde transformatie. Zowel de expressie van het katalytische deel van PI3-kinase, PIK3CA, als de activering van onderliggende effector PKB/AKT, nam toe met de opeenvolgende stadia van *in vitro* transformatie. Remming van PI3-kinase leidde tot een verminderde activering van de route. Ook de viabiliteit, migratie en groei zonder hechting was sterk verminderd na remming van PI3-kinase. Daarnaast bleken ook HPV16 E7 en hTERT mRNA expressie verlaagd te zijn. Driedimensionale kweken waarin de cellen werden behandeld met de remmers, resulteerde in een sterk verminderde epitheliale ontwikkeling, een verlaagde expressie van de

differentiatiemarker keratine-10, evenals een verlaagde activering van PKB/AKT.

Dit werk toont aan dat activering van de PI3-kinase signaaltransductieroute van belang is bij HPV-geïnduceerde transformatie. Deze bevindingen zouden kunnen leiden tot nieuwe behandelingsmethoden voor patiënten met HPV positieve tumoren.

Notch signalering

Een andere signaaltransductieroute die van groot belang is voor de ontwikkeling van normale cellen maar ook betrokken is bij kanker, is de Notch-sigtaaltransductieroute. Op basis van bestaande literatuur is het echter onduidelijk welke rol Notch speelt bij het proces van HPV-geïnduceerde transformatie. Er zijn immers aanwijzingen voor zowel een kanker stimulerende als remmende rol. Uit eerder werk van ons laboratorium kwam naar voren dat expressie van Notch toeneemt van normale cellen tot cellen die groeien zonder hechting, maar dat in kanker cellijnen de expressie juist verlaagd is. Dit duidt op een strikte regulatie van de expressie gedurende HPV-geïnduceerde transformatie, waardoor de functionele effecten mogelijk dosisafhankelijk zijn. Een belangrijke effector van Notch is het AP-1 transcriptie factor complex. Dit complex bestaat in normale cellen uit cJun/Fra1 dimeren, terwijl in baarmoederhalskankercellen het complex juist uit cJun/cFos bestaat. In **hoofdstuk 6** zijn de dosisafhankelijke effecten van Notch in HPV bevattende baarmoederhalskankercellijnen en de relatie tot AP-1 onderzocht. Door middel van overexpressie in een baarmoederhalskankercellijn zijn twee niveaus van Notch expressie gecreëerd die leidden tot twee niveaus van activering van de signaaltransductieroute. Waar gemiddelde Notch expressie positief bijdroeg aan de getransformeerde eigenschappen van kankercellen zoals viabiliteit en groei zonder hechting, had sterk verhoogde Notch expressie juist een remmend effect op deze oncogene eigenschappen. Gemiddelde Notch expressie was gecorreleerd met een verhoogde DNA binding van het AP-1 complex, maar had geen effect op de samenstelling van het transcriptiefactor complex. Hoge Notch expressie daarentegen, resulteerde in een veranderde samenstelling van het complex, van cJun/cFos naar cJun/Fra1. De anders oncogene samenstelling van het complex (cJun/cFos), veranderde naar een samenstelling kenmerkend voor niet tumorigene cellen (cJun/Fra1). Andersom, een sterke verlaging van Fra1 expressie in niet-tumorigene HPV-geïmmortaliseerde cellen, resulteerde in een verandering van cJun/Fra1 naar cJun/cFos samenstelling van het AP-1

transcriptiefactor complex en verhoogde oncogene eigenschappen. Deze resultaten geven aan dat de rol van Notch in HPV-gemedieerde transformatie dosisafhankelijk is en gecorreleerd is met een verandering in de samenstelling van het AP-1 complex.

Samenvattend hebben de resultaten beschreven in dit proefschrift een belangrijke bijdrage geleverd aan de huidige kennis omtrent HPV-gemedieerde transformatie. Er is aangetoond dat er een opeenvolging van veranderingen in DNA methylering plaatsvindt tijdens het proces van HPV-gemedieerde transformatie. Daarnaast is van twee genen, CADM1 en MAL, een correlatie aangetoond tussen verminderde genexpressie en een verhoogde DNA promoter methylering. Deze verhoogde DNA promoter methylering ging gepaard met de ernst van de afwijking. Deze twee genen bleken daarnaast ook functioneel van belang. Vervolgstudies in ons laboratorium hebben recentelijk aangetoond dat het testen voor aanwezigheid van HPV gevolgd door testen op CADM1 en MAL methylering net zo goed werkt voor het onderscheiden van hooggradige voorloperlaesies als een cytologische analyse gevolgd door een HPV test. Mogelijk dat de andere DNA methyleringsveranderingen beschreven in hoofdstuk 2 hier nog tot verdere verbetering kunnen leiden.

Van de twee onderzochte signaaltransductieroutes, PI3-kinase en Notch, is bewezen dat ze functioneel betrokken zijn bij HPV-gemedieerde transformatie. Vervolg onderzoek in deze richting zou zich kunnen toespitsen op de interactie tussen beide signaaltransductieroutes. Daarnaast is de regulatie van HPV genexpressie in deze routes een zeer interessante en tot nu toe nog onduidelijke factor. Toekomstige studies moeten uitwijzen welke elementen uit de nieuwe signaaltransductieroutes potentie hebben voor de ontwikkeling van mogelijke nieuwe behandelmethodes.

