

VU Research Portal

MicroRNAs in HPV-induced cervical cancer

Babion, I.

2020

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Babion, I. (2020). *MicroRNAs in HPV-induced cervical cancer: Triage markers for cervical screening and drivers of carcinogenesis*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl



Nederlandse Samenvatting

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Na borstkanker, darmkanker en longkanker is baarmoederhalskanker de meest voorkomende vorm van kanker bij vrouwen wereldwijd. Baarmoederhalskanker wordt veroorzaakt door infectie met hoog risico types van het humaan papillomavirus (HPV). Terwijl de meeste HPV infecties door het immuunsysteem worden geklaard, kunnen langdurige HPV infecties leiden tot kanker. De invoering van georganiseerde screeningsprogramma's in vele ontwikkelende landen heeft geleid tot het vroegtijdige opsporen en behandelen van baarmoederhalskanker en zijn voorstadia. In Nederland worden vrouwen tussen de 30 en 60 jaar iedere 5 tot 10 jaar uitgenodigd om aan de bevolkingsonderzoek deel te nemen. Hiervoor laten zij door de huisarts een uitstrijkje afnemen, welke eerst op de aanwezigheid van HPV wordt onderzocht. Omdat maar een klein aandeel van HPV infecties tot ziekte leidt, is er een tweede, zogenoemde triagetest nodig om vrouwen te identificeren die een verhoogd risico op baarmoederhalsafwijkingen hebben en naar de gynaecoloog verwezen dienen te worden. Als een uitstrijkje HPV-positief blijkt te zijn, wordt daarom middels cytologie bepaald of er ook afwijkende cellen aanwezig zijn. Aangezien ongeveer 30% van de vrouwen niet deelneemt aan de bevolkingsonderzoek wordt deze vrouwen de mogelijkheid aangeboden om thuis zelf vaginaal materiaal af te nemen. Zelf-afgenomen materiaal is wel geschikt voor een HPV test maar niet betrouwbaar genoeg voor cytologisch onderzoek. Vrouwen met een positieve HPV test op zelf-afgenomen materiaal moeten daarom alsnog naar de huisarts voor een uitstrijkje. Hier bestaat het risico dat HPV-positief geteste vrouwen niet voor hun vervolgonderzoek komen, terwijl zij mogelijk wel een baarmoederhalsafwijking hebben en voor onderzoek naar de gynaecoloog zouden moeten. Een ander nadeel is, is dat cytologie een subjectieve test is. Om het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker verder te verbeteren is een objectieve triagetest noodzakelijk die zowel op uitstrijken als direct op zelf-afgenomen materiaal kan worden uitgevoerd.

De ontwikkeling van baarmoederhalskanker is een langzaam verlopend proces dat gekenmerkt wordt door verschillende voorloperstadia, zogenoemde cervicale intra-epitheliale neoplasieën (CIN). CIN laesies worden afhankelijk van de ernst van de afwijking gegradieerd van 1 tot 3, waarbij CIN1 als laaggradige en CIN2 en CIN3 als hooggradige laesies worden gezien. Tijdens de progressie van deze CIN laesies vinden moleculaire veranderingen plaats die de ontwikkeling van baarmoederhalskanker bevorderen. MicroRNA's (miRNA's) zijn kleine biomoleculen die de expressie van eiwitten reguleren. Tijdens het ontstaan van baarmoederhalskanker verandert ook de expressie van bepaalde miRNA's.

Daardoor worden genen die de kwaadaardige transformatie bevorderen of remmen, zogenaemde oncogenen en tumorsuppressorgenen, respectievelijk in- of uitgeschakeld. MiRNA's zijn veelbelovende triagemarkers aangezien zij gerelateerd zijn aan het ontstaan van baarmoederhalskanker. Daarnaast is het meten van miRNA expressie objectief, eenvoudig en potentieel mogelijk in zowel uitstrijkjes als zelf-afgenomen materiaal.

MiRNA's als triagemarkers in het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker

In het eerste deel van dit proefschrift wordt onderzocht of miRNA's gebruikt kunnen worden als triagemarkers voor HPV-positieve vrouwen in het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker. Hierbij hebben wij twee manieren gebruikt om potentiële marker miRNA's zorgvuldig te selecteren: (1) om biologische relevantie te garanderen hebben wij miRNA's geselecteerd die tijdens de progressie tot baarmoederhalskanker door veranderingen op DNA niveau dereguleerd worden, en (2) hebben wij direct op zelf-afgenomen materiaal de expressie van alle miRNA's in kaart gebracht om de klinisch meest belovende miRNA's te identificeren. De geselecteerde miRNA's zijn vervolgens geëvalueerd in uitstrijkjes en zelf-afgenomen materiaal van HPV-positieve vrouwen.

De gouden standaard techniek om miRNA expressie te meten is tegenwoordig *qRT-PCR* (*quantitative Polymerase Chain Reaction following reverse transcription*). Deze techniek maakt ook het gelijktijdig analyseren van een groot aantal patiëntmaterialen mogelijk en is daarom de eerste keuze voor de implementatie van miRNA tests voor diagnostische doeleinden. Om miRNA's middels *qRT-PCR* betrouwbaar te kunnen kwantificeren is het noodzakelijk om *qRT-PCR* data te normaliseren. Hiervoor is het gebruikelijk om een of meerdere referentie genen in hetzelfde experiment te meten. In **Hoofdstuk 2** hebben wij de geschiktheid van 11 potentiële referentie genen voor de normalisatie van miRNA *qRT-PCR* data in weefsels (biopten), uitstrijkjes en zelf-afgenomen materiaal geëvalueerd. miR-423-3p was een geschikt referentie gen voor alle monster types en wordt het best gecombineerd met RNU24 in weefsels, RNU43 in uitstrijkjes en miR-30b-5p in zelf-afgenomen materiaal. Om te testen of gebruik van deze referentie genen ook leidt tot een betere detectie van ziekte, hebben we twee potentiële marker miRNAs getest in weefsels, uitstrijkjes en zelf-afgenomen materiaal van vrouwen met en zonder ziekte. Het bleek inderdaad dat de verschillen in expressie van de marker miRNAs miR-15b-5p en miR-100-5p tussen monsters van vrouwen zonder of met ernstige CIN laesies of kanker het meest duidelijk

waren na normalisatie met de gevonden combinaties aan referentie genen. Onze resultaten tonen aan dat voor verschillende sample types mogelijk een andere selectie van referentie genen nodig is. De hier gevonden paren van referentie genen zijn van belang voor de vervolgstudies waarin onderzocht wordt of miRNA's geschikt zijn als triagemarkers in het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker.

Voor toepassing in het bevolkingsonderzoek zijn triagemarkers idealiter direct toepasbaar op het materiaal dat ook voor de HPV test wordt gebruikt. In **Hoofdstuk 3** hebben wij onderzocht of 8 eerder geselecteerde miRNA's geschikt zijn voor de triage van HPV-positieve uitstrijkjes. Eerdere studies hebben aangetoond dat expressie van deze miRNA's veranderd is in CIN2/3 laesies en kanker ten opzichte van gezond baarmoederhalsweefsel. Omdat veranderingen op DNA niveau hiervoor de directe oorzaak zijn, is het waarschijnlijk dat deze miRNA's in de tumorcellen zelf veranderd zijn en direct betrokken zijn bij het kankerproces. Expressie analyse van de 8 miRNA's middels *qRT-PCR* in uitstrijkjes van HPV-positieve vrouwen met en zonder afwijkingen aan de baarmoederhals toonde aan dat veranderde miRNA expressie ook in uitstrijkjes kan worden gemeten. Om te testen of individuele miRNA's een onderscheid kunnen maken tussen uitstrijkjes van vrouwen met en zonder CIN3, hebben wij voor elke miRNA een klinische waarde, de zogenoemde area under the curve, of in kort: AUC, bepaald. De AUC is een waarde tussen 0 en 1 die aangeeft hoe goed een marker of een panel van meerdere markers tussen twee groepen kan onderscheiden. Hoe dichterbij 1, hoe beter het onderscheid tussen gezond en ziekte (CIN3). De individuele miRNA's bereikten AUCs tussen 0.523 (miR-203a-3p) en 0.605 (miR-125b-5p). De beste resultaten werden behaald met een 2-miRNA panel bestaande uit miR-15b-5p en miR-375 (AUC=0.622). Dit panel detecteerde 55% van de CIN3 en alle kankers. Het toevoegen van HPV16/18 genotypering aan het panel verbeterde de AUC (0.712). Daarnaast hadden miR-15b-5p en miR-375 invloed op de groei en vitaliteit van kanker cellen *in vitro*, wat aanduidt dat zij direct bijdragen aan het ontstaan van baarmoederhalskanker.

In **Hoofdstuk 4** hebben wij middels *small RNA sequencing* alle miRNA's die tot expressie komen in zelf-afgenomen materiaal in kaart gebracht om zodanig de meest belovende miRNA markers voor de detectie van CIN3 en kanker te identificeren. Dit onderzoek heeft een panel van 9 miRNA's opgeleverd met een AUC van 0.89 voor de detectie van CIN3. Validatie van dit panel middels *qRT-PCR* in een nieuwe serie van zelf-afgenomen materiaal resulteerde in een 5-miRNA panel (let-7b-5p, miR-15b-5p, miR-20a-5p, miR-93-5p, miR-222-3p) met een AUC van 0.78 voor de detectie van

CIN3 en kanker (CIN3+). De relatief hoge discrepantie tussen de twee sample series is waarschijnlijk het gevolg van de aanwezigheid van miRNA varianten, zogenaamde isomiRs, die door de gebruikte verschillende analyse technieken (d.w.z. *small RNA sequencing* en *qRT-PCR*) niet even goed gemeten kunnen worden.

Behalve miRNA's hebben ook DNA methyleringmarkers in het verleden veelbelovende resultaten opgeleverd voor de triage van HPV-positieve vrouwen. DNA methylering is een proces waarbij een methylgroep op de DNA wordt geplaatst en waardoor tumorsuppressorgen kunnen worden uitgeschakeld. In **Hoofdstuk 5** hebben wij de klinische waarde van triage met miRNA's vergeleken met dat van de DNA methyleringmarker *FAM19A4*. Hiervoor hebben wij de expressie van de 10 meest belovende miRNA's uit hoofdstukken 3 en 4 in HPV-positieve uitstrijkjes gemeten. Statistische analyse resulteerde in een optimaal panel bestaand uit miR-149-5p, miR-20a-5p en miR-93-5p met een AUC van 0.834 voor CIN3 detectie. In dezelfde serie samples had *FAM19A4* methyleringsanalyse een AUC van 0.862 en was deze niet significant beter dan het 3-miRNA panel. Een gecombineerd panel bestaande uit de 3 miRNA's en *FAM19A4* behaalde een AUC van 0.939 en was daarmee significant beter dan het 3-miRNA panel en *FAM19A4* alleen. Het onderverdelen van CIN2 en CIN3 laesies op basis van grootte (klein/groot) of HPV type (HPV16/HPV18/andere HPV types) toonde aan dat *FAM19A4* methylering vooral grote en HPV16-geassocieerde CIN3 laesies detecteert, terwijl het 3-miRNA panel ook CIN2 laesies detecteerde en onafhankelijk was van de HPV type.

Deze resultaten geven aan dat voor de identificatie van moleculaire triage markers het ook belangrijk is om een goed inzicht te hebben in de rol van deze moleculaire veranderingen bij de progressie van CIN2/3 laesies naar kanker.

MiRNA's en andere moleculaire afwijkingen bevorderen HPV-geïnduceerde transformatie

In het tweede deel van dit proefschrift is onderzocht hoe miRNA's en andere moleculaire afwijkingen aan het ontstaan van baarmoederhalskanker bijdragen. Andere moleculaire afwijkingen zijn met name veranderingen in de expressie van eiwit-coderende mRNA's en genomische afwijkingen. Genomische afwijkingen betreffen de toename of het verlies van stukken chromosoom. De aanwezigheid van meer of minder gen-kopieën leidt vaak tot respectievelijk hogere of lagere expressie van dit gen. Om zowel individuele moleculaire veranderingen als de wisselwerking van de verschillende moleculaire levels te onderzoeken hebben wij *in vitro* cellijn modellen gebruikt.

In **Hoofdstuk 6** hebben wij een cellijn model gebruikt waarbij de hoog risico HPV types HPV16 en HPV18 zijn ingebracht zijn in gezonde huidcellen. Het voordeel van dit model is dat de cellen met iedere celdeling, over de tijd, veranderen en wij het kankerproces op deze manier stap voor stap kunnen volgen. Om moleculaire veranderingen die betrokken zijn bij kankerontwikkeling na een HPV infectie te bestuderen, hebben wij de expressie van miRNA's, mRNA's en genomische afwijkingen op 8 verschillende tijdstippen van twee HPV16 en twee HPV18-bevattende cellijnen in kaart gebracht. De 8 tijdstippen vertegenwoordigen verschillende stadia van het ontwikkelingsproces tot kanker. Een toename in chromosomale afwijkingen was met name betrokken bij de overgang van de cellen naar een stadium waar ze zonder hechting aan de kweekplaat konden groeien. Het vermogen van cellen om zonder hechting te kunnen groeien wordt vaak als het ultieme bewijs voor kwaadaardige verandering (transformatie) beschouwd. Daarnaast was ongeveer een derde van de veranderingen in miRNA en mRNA expressie direct geassocieerd met veranderingen in het aantal gen-kopieën door chromosomale afwijkingen. Veel genen in de TGF- β signaalroute, een belangrijke signaalroute die betrokken is bij het ontstaan van kanker, waren ontregeld door chromosomale afwijkingen. Door onze data longitudinaal (over de tijd) te onderzoeken hebben we ontdekt dat PITX2 een belangrijke negatieve regulator van de TGF- β signaalroute is. Overexpressie van PITX2 in HPV-bevattende cellen remde de groei. Door ons longitudinale onderzoek naar de genomwijde miRNA en mRNA expressie veranderingen over de tijd hebben we ook nieuwe miRNA-mRNA interacties aangetoond, zoals tussen miR-138-5p en PLXNB2, miR-221-3p en BRWD3 en miR-221-3p en cFOS.

Squameuze cel carcinomen (SCC) en adenocarcinomen (AC) zijn de twee meest voorkomende vormen (zogenaamde weefseltypes) van baarmoederhalskanker. De meeste SCC zijn HPV16 positief terwijl AC meestal HPV18 positief zijn. Eerdere studies hebben beschreven dat de expressie van miR-9-5p in SCC verhoogd is, maar niet in AC. In **Hoofdstuk 7** laten wij zien dat de lage expressie van miR-9-5p in AC veroorzaakt wordt door methylering van miR-9-5p genen. Het verschil in miR-9-5p expressie en methylering tussen SCC en ACs is toe te schrijven aan het kanker weefseltype en het HPV type. *In vitro* experimenten met de SiHa cellijn, die afkomstig is van een HPV16-positieve SCC, lieten zien dat miR-9-5p tumorgroei en hechting onafhankelijke celgroei bevordert. In HeLa, een cellijn die van een HPV18-positieve AC afstamt, had miR-9-5p juist het tegenovergestelde effect en werkte het als een tumorsuppressor miRNA. Daarnaast hebben we voor het eerst aangetoond dat TWIST1, een gen

dat een rol speelt bij groei zonder hechting, direct gereguleerd wordt door miR-9-5p. Deze resultaten tonen aan dat miR-9-5p een dubbele rol speelt bij het ontstaan van baarmoederhalskanker welke afhankelijk is van het weefseltype en HPV type.

In hoofdstuk 4 hebben we gevonden dat naast 'gewone' miRNA's ook miRNA varianten, zogenoemde isomiRs, tot expressie komen in baarmoederhalscellen. IsomiR's zijn miRNA's die met name aan de uiteinden iets veranderd zijn en die mogelijk ook een andere functie in de cel hebben dan gewone miRNAs. De vorming van miRNA's is een meerstaps proces, waarbij verschillende enzymen betrokken zijn. Veranderingen in deze enzymen kunnen daarom leiden tot veranderde miRNA expressie of tot de productie van isomiR's. In **Hoofdstuk 8** wordt een overzicht gegeven van de actuele literatuur over miRNA-regulerende enzymen in HPV-bevattende kankers. De expressie van enzymen die belangrijk zijn voor het maken van miRNAs, zoals DROSHA, DGCR8, Dicer en AGO2, is vaak verhoogd of verlaagd in HPV-bevattende kankers. Deze veranderde expressie is vaak het directe gevolg van HPV of wordt veroorzaakt door chromosomale afwijkingen. DROSHA en DGCR8 in het bijzonder blijken een tumor bevorderende rol te spelen. Daarnaast zijn ook enzymen die betrokken zijn bij de vorming van isomiRs, zoals ADAR1, ADAR2 en TUT1, veranderd in baarmoederhalskanker en soms ook al in CIN3.

Samenvattend hebben wij in dit proefschrift aangetoond dat miRNA's veel belovende moleculaire triagemarkers zijn voor het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker. De miRNAs die uit eerdere studies en genomwijde analyses geselecteerd zijn, zijn met name interessant omdat ze direct op HPV-positieve uitstrijkjes en zelf-afgenomen materiaal getest kunnen worden. Daarnaast hebben wij middels uitgebreide moleculaire analyses van *in vitro* cellijn modellen en een literatuurstudie meerdere genen, zoals PITX2, miR-9-5p en miRNA-regulerende enzymen, ontdekt die betrokken zijn bij het kankerproces. Deze genen kunnen van belang zijn voor de ontwikkeling van nieuwe kankertherapieën.