

# VU Research Portal

## Altered DNA methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis

Overmeer, R.M.

2011

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

### ***citation for published version (APA)***

Overmeer, R. M. (2011). *Altered DNA methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis: basic aspects and diagnostic implications*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **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](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

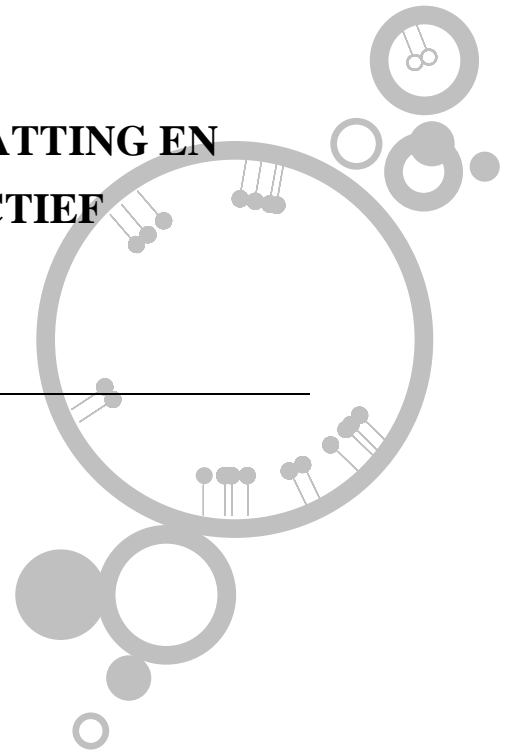


# CHAPTER 8

---

## NEDERLANDSE SAMENVATTING EN TOEKOMSTPERSPECTIEF

---





## SAMENVATTING

Wereldwijd is baarmoederhalskanker de op één na meest voorkomende vorm van kanker bij vrouwen. De ontwikkeling van baarmoederhalskanker verloopt via een traject van goed te behandelen voorstadia, de zogenaamde cervicale intraepitheliale neoplasie (CIN) laesies. Deze CIN laesies worden gegradeerd van graad 1 tot 3, gebaseerd op de toenemende ernst van de afwijking. Om baarmoederhalskanker te voorkomen worden in de huidige praktijk CIN2 en CIN3 afwijkingen behandeld.

Wetenschappelijk onderzoek heeft uitgewezen dat baarmoederhalskanker veroorzaakt wordt door een aanhoudende infectie met hoog-risico humaan papillomavirus (hrHPV), waarvan op dit moment 15 types zijn geïdentificeerd. Afwijkende cellen afkomstig van CIN laesies of kanker kunnen door middel van cytologisch onderzoek opgespoord worden in uitstrijkjes van de baarmoedermond. Dit onderzoek is gebaseerd op het herkennen van afwijkende uiterlijke celkenmerken. In westerse landen wordt in het bevolkingsonderzoek daarom ook gebruik gemaakt van cytologie voor het opsporen van ernstige CIN laesies en kanker, wat heeft geresulteerd in een daling van het aantal gevallen van baarmoederhalskanker. Helaas is de cytologische beoordeling van uitstrijkjes subjectief en is vooral de gevoeligheid relatief laag. Dit leidt in de praktijk tot teveel fout-negatieve uitslagen, dat wil zeggen een als normaal beoordeeld uitstrijkje terwijl er toch een voorstadium van kanker aanwezig is.

Het feit dat hrHPV noodzakelijk is voor de ontwikkeling van baarmoederhalskanker en hooggradige CIN laesies (samen afgekort tot  $\geq$ CIN2) en in alle afwijkingen aanwezig blijft, heeft geleid tot nieuwe mogelijkheden voor het verbeteren van het huidige bevolkingsonderzoek.

Recente studies hebben aangetoond dat het testen op de aanwezigheid van hrHPV in uitstrijkjes de gevoeligheid voor het opsporen van  $\geq$ CIN2 aanzienlijk

verbetert, vergeleken met de huidige cytologie test. Echter, niet alle hrHPV-positieve vrouwen hebben daadwerkelijk een ernstige afwijking, aangezien het overgrote deel van alle hrHPV infecties voorbijgaande infecties zijn die door het immuunsysteem worden opgeruimd. Dit betekent dat er naast een test op hrHPV nog een tweede test nodig is om te bepalen welke hrHPV-positieve vrouwen een hoge kans hebben op een ernstige baarmoederhalsafwijking en verwezen dienen te worden naar een gynaecoloog voor verder onderzoek. Een dergelijke aanvullende test wordt ook wel een triage test genoemd en maakt gebruik van zogenaamde ziektemerkers. Het idee bestaat dat het verkrijgen van meer inzicht in de moleculaire veranderingen die optreden gedurende de ontwikkeling van baarmoederhalskanker niet alleen zal zorgen voor een beter inzicht in het kanker proces, maar ook zal leiden tot het verkrijgen van nieuwe ziektemerkers die het risico op  $\geq$ CIN2 bij een hrHPV-positieve testuitslag beter kunnen voorspellen.

In dit proefschrift is het mechanisme onderzocht dat ten grondslag ligt aan de ontregeling van drie genen die een (mogelijke) rol spelen bij het ontstaan van baarmoederhalskanker, te weten hTERT, CADM1 en MAL. Er is onderzocht of de DNA veranderingen, die zijn gevonden in bovengenoemde genen, gebruikt zouden kunnen worden als merkers voor het vroegtijdig opsporen van  $\geq$ CIN2.

De studies beschreven in dit proefschrift hebben zich specifiek gericht op DNA methylering van de promoter gebieden van deze genen. DNA methylering is een epigenetisch proces waarbij een methylgroep ( $\text{CH}_3$ ) aan één van de bouwstenen van het DNA, cytosine, wordt gekoppeld waardoor de structuur van DNA verandert. DNA methylering van promotoren leidt in de meeste gevallen tot inactiviteit van het gen. Wanneer inactiviteit van zogenaamde tumorsuppressorgenen optreedt, kan dit bijdragen aan de verandering van een normale cel in een kankercel. De biologische gevolgen van DNA promoter methylering van hTERT, CADM1 en MAL zijn bestudeerd in een *in vitro* model van HPV-bevattende epitheel cellen waarmee het ontstaan van baarmoederhalskanker goed kan worden nagebootst. Vervolgens is de

potentiële waarde van deze veranderingen van methylering als ziektemerker voor vrouwen met een hrHPV infectie geëvalueerd op een goed gekarakteriseerde groep klinische weefsels en uitstrijkjes.

*Promoter methylering, één van de mechanismen die ten grondslag ligt aan de ontregeling van hTERT gedurende HPV-gemedieerde immortalisatie*

Het is wetenschappelijk bewezen dat het activeren van telomerase door middel van gedereguleerde hTERT genexpressie een belangrijke stap is voor immortalisatie, het onsterfelijk worden, van HPV-geïnfecteerde cellen tijdens de ontwikkeling van baarmoederhalskanker. In **Hoofdstuk 2** wordt de relatie tussen hTERT promotor activiteit en DNA methylering gedurende HPV-geïnduceerde immortalisatie beschreven. Door middel van bisulfiet sequentie analyse van de hTERT promotor regio's is aangetoond dat DNA methylering in deze regio's gecorreleerd is aan een toename van hTERT expressie. Dit suggereert dat DNA methylering van deze promotor regio's bijdraagt aan de ontregeling van hTERT expressie in HPV-getransformeerde cellijnen. DNA methyleringsanalyse op baarmoederhalsweefsels toonde aan dat er een geleidelijke toename in methylering van de regulerende hTERT regio's plaatsvindt, die proportioneel gekoppeld is aan de ernst van de afwijking. Daarom zouden nieuwe testen gebaseerd op DNA methylering van deze hTERT regio's ziektemerkers kunnen opleveren die kunnen bijdragen aan de vroegtijdige detectie van baarmoederhalskanker.

*CADM1 and MAL promoter methylering in baarmoederhalstumoren en ernstige CIN laesies*

Eerdere studies hebben aangetoond dat promoter methylering van CADM1, een tumorsuppressorgen dat onder normale omstandigheden tumorgroei onderdrukt, veelvuldig voorkomt in plaveiselcel tumoren (SCCs) van de baarmoederhals. Daarnaast is het mogelijk gebleken om CADM1 promoter methylering te detecteren in uitstrijkjes van vrouwen die zijn afgenomen tot

zeven jaar voordat de diagnose baarmoederhalskanker gesteld was, hetgeen duidt op een mogelijke diagnostische toepassing. **Hoofdstuk 3** beschrijft een DNA methyleringsanalyse van drie regio's van de CADM1 promoter. Er is gebleken dat een toename van de dichtheid van methylering, dat wil zeggen methylering van meerdere regio's, geassocieerd is met een afname van de normale CADM1 functie *in vitro*. Hiernaast is aangetoond dat de frequentie van methylering op meerdere regio's ( $\geq 2$  regio's) toenam naarmate ook de ernst van de afwijking toenam, van 5% in gezonde baarmoederhals weefsels naar 30% in CIN3 laesies en 83% in SCCs. Ook werd aangetoond dat methylering van  $\geq$  twee gemethyleerde regio's significant vaker voorkomt in SCCs vergeleken met adenocarcinomen (AdCAs) van de baarmoederhals (83% ten opzichte van 23%). Een andere interessante bevinding was dat naarmate de dichtheid van methylering toenam, er een afname in de CADM1 eiwit expressie werd gezien. De resultaten van deze studie geven aan dat het testen op CADM1 promoter methylering zou kunnen bijdragen aan de samenstelling van een waardevol ziektemerker panel voor de triage van hrHPV-geïnfectede vrouwen.

Een ander potentieel tumorsuppressorgen dat zou kunnen bijdragen aan de detectie van vrouwen met ernstige baarmoederhalsafwijkingen is MAL. MAL werd in eerdere studies geïdentificeerd als een gen met een sterk verminderende expressie in baarmoederhalstumoren ten opzicht van normaal baarmoederhalsepitheel. In **Hoofdstuk 4** is het mechanisme dat ten grondslag ligt aan de afname van MAL expressie en de functionele rol daarvan in HPV-geïnduceerde transformatie *in vitro* onderzocht. MAL mRNA was bijna niet detecteerbaar in alle onderzochte HPV-geïmmortaliseerde cellijnen en baarmoederhalskanker cellijnen. Na behandeling met een stof die ervoor zorgt dat de promoter methylering tenietgedaan wordt (5'-Aza-2'-deoxycytidine), bleek de expressie van MAL weer omhoog te gaan. Dit duidt er op dat MAL promoter methylering hoogstwaarschijnlijk ten grondslag ligt aan de afname van MAL mRNA in de cellijnen. DNA methylering van twee regio's in de MAL promoter, genaamd MAL-M1 en MAL-M2, werd gevonden in alle HPV-geïmmortaliseerde cellijnen. Wanneer door ons het MAL gen in een



baarmoederhalskanker cellijn werd ingebracht, zorgde dit voor een afname in tumor-specifieke groei-eigenschappen. Dit betekent dat de inactiviteit van MAL, net als CADM1, een functionele rol speelt bij het ontstaan van baarmoederhalskanker. Analyse op weefsels toonde aan dat de mate van MAL promoter methylering toenam naarmate de ernst van de afwijkingen toenam. Meer dan 90% van de tumoren, zowel SCCs als AdCAs, toonde MAL promoter methylering. Verder bleek MAL promoter methylering in uitstrijkjes voorspellend te zijn voor onderliggende hooggradige baarmoederhalsafwijkingen. Zowel in baarmoederhalsweefsels als in uitstrijkjes ging MAL promoter methylering gepaard met een afname in *MAL* mRNA expressie. Het bovenstaande geeft aan dat, zoals voor hTERT en CADM1, MAL promoter methylering een veelbelovende moleculaire ziektemerker zou kunnen zijn voor de triage van vrouwen met een hrHPV infectie.

*Verbeterde detectie van hooggradige CIN laesies en baarmoederhalskanker door middel van een combinatie van CADM1 en MAL promoter methyleringsmerkers*

Inactiviteit van zowel CADM1 als MAL draagt functioneel bij aan het ontstaan van baarmoederhalskanker. Onze *in vitro* experimenten hebben aangetoond dat inactiviteit van MAL in een vroege fase van het transformatie proces belangrijk is en inactiviteit van CADM1 in een later stadium. Zoals hierboven is beschreven, komen beide genen ook in baarmoederhalstumoren en in een deel van CIN3 laesies niet meer of verlaagd tot expressie, wat geassocieerd is met promoter methylering. Gebaseerd op het gegeven dat inactivatie van beide genen geassocieerd is aan andere specifieke fases in het transformatie proces, ontstond het idee dat methyleringsanalyse van CADM1 en MAL elkaar mogelijk kunnen aanvullen bij het opsporen van CIN3 laesies en baarmoederhalskanker.

In **Hoofdstuk 5** hebben we onderzocht of een gecombineerde promoter methyleringsanalyse voor CADM1 en MAL leidt tot een verbeterde detectie van hooggradige laesies en kanker ten opzichte van beide merkers afzonderlijk. De

hoogste methylerings-positiviteit werd gevonden door het combineren van 1 CADM1 regio en 1 MAL regio. Hiermee konden 97% van de CIN3 laesies en 99% van de SCCs en AdCAs gedetecteerd worden. Toepassing van het merker panel bestaande uit CADM1-M18 en MAL-M1 op uitstrijkjes bleek het beste onderscheid te maken tussen hrHPV-positieve vrouwen met een onderliggende CIN3 laesie (90% van de uitstrijkjes was positief) en vrouwen zonder baarmoederhalsafwijkingen (13,5% van de uitstrijkjes was positief). Ten slotte hebben we in een groep vrouwen die naar de polikliniek werd verwezen voor het ondergaan van een colposcopie op basis van een afwijkend uitstrijkje, getest op de aanwezigheid van hrHPV gevolgd door een methyleringsanalyse met het panel CADM1-M18/MAL-M1. Het testen voor alleen de aanwezigheid van hrHPV leidde tot een gevoeligheid voor een CIN3 laesie of baarmoederhalskanker van 97% (97% van de zieke vrouwen werd daadwerkelijk opgepikt) maar de specificiteit was slechts 33% (het percentage vrouwen zonder afwijkingen dat daadwerkelijk negatief testte). Na een toegevoegde methyleringsanalyse voor CADM1-M18/MAL-M1 nam de specificiteit toe tot 78%. Hieruit kan geconcludeerd worden dat een ziektemerker panel gebaseerd op een gecombineerde analyse van CADM1 en MAL promoter methylering van grote waarde is voor de triage van hrHPV-positieve vrouwen.

In een op zichzelf staande studie is gebleken dat MAL promoter methylering ook gebruikt kan worden een voorspellende marker voor maagkanker, zoals is beschreven in **Hoofdstuk 6**. Methylering van de MAL-M1 en de MAL-M2 regio's was aanwezig in respectievelijk 71% en 80% van de onderzochte maagtumoren, maar werd niet teruggevonden in het gezonde maag weefsel. Daarnaast bleek methylering van de MAL-M2 regio significant gecorreleerd te zijn aan een langere periode van kankervrije overleving en een verminderde MAL mRNA expressie.

Samenvattend kunnen we stellen dat voor de genen hTERT, CADM1 en MAL is aangetoond dat in hrHPV-getransformeerde cellen promoter methylering is

gecorreleerd aan een veranderde genexpressie ten opzichte van de normale, niet afwijkende situatie. Voor hTERT geldt dat de expressie omhoog gaat onder invloed van promoter methylering, terwijl voor zowel CADM1 als MAL geldt dat de expressie drastisch afneemt onder invloed van promoter methylering. Gezien het feit dat alle drie de genen functioneel betrokken zijn bij HPV-geïnduceerde transformatie, en promotermethylering van alle drie toeneemt met de ernst van de afwijking, lijken ze zeer geschikte ziektemerkers die voortgang naar kanker weergeven. Daarnaast is gebleken dat de testen voor CADM1 en MAL promoter methylering elkaar aanvullen met betrekking tot het opsporen van  $\geq$ CIN2 laesies. Het toevoegen van hTERT methyleringsanalyse droeg niet verder bij aan het detecteren van hooggradige CIN laesies en baarmoederhalskanker.

## **TOEKOMSTPERSPECTIEF**

Om de potentiële waarde van de methyleringsmerkers CADM1 en MAL te benutten in een bevolkingsonderzoek dat gebaseerd is op het primair testen op de aanwezigheid van hrHPV, zijn er momenteel meerdere studies gaande. Onder andere zal er voor elke individuele ziektemerker een optimale afkapwaarde voor test-positiviteit gedefinieerd worden.

Naast CADM1 en MAL zouden additionele methyleringsmerkers ook kunnen bijdragen aan de samenstelling van een marker panel dat de gevoeligheid en specificiteit voor klinisch relevante hooggradige CIN laesies en baarmoederhalskanker nog verder verhoogd. Niet alleen eerder beschreven methyleringsmerkers, zoals is samengevat in **Hoofdstuk 1**, maar ook nog nieuw te ontdekken ziektemerkers komen hiervoor in aanmerking. Uiteindelijk zal dit moeten leiden tot een optimaal triage merker panel voor hrHPV-positieve vrouwen.