

VU Research Portal

Early detection of cervical cancer

Snoek, B.C.

2019

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Snoek, B. C. (2019). *Early detection of cervical cancer: The quest for novel epigenetic biomarkers*.

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

CHAPTER 9



The image features a dark blue background with a stylized DNA double helix in shades of teal and yellow at the top. A large, light teal shape resembling a speech bubble or a large bracket encompasses the central text. At the bottom, there is a circular diagram with teal and yellow segments, connected to a series of horizontal bars that resemble a bar chart or a data visualization.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Beknopte samenvatting

Baarmoederhalskanker is de op drie na meest voorkomende vorm van kanker onder vrouwen wereldwijd. In Nederland krijgen jaarlijks meer dan 700 vrouwen de diagnose baarmoederhalskanker en ongeveer 200 vrouwen overlijden aan de gevolgen van deze ziekte. De invoering van het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker heeft geleid tot een sterke afname van het aantal sterfgevallen. Voor het bevolkingsonderzoek in Nederland worden vrouwen tussen de 30 en 60 jaar uitgenodigd voor een uitstrijkje, welke wordt getest op de aanwezigheid van het humaan papillomavirus (HPV). In het geval dat een vrouw HPV positief is wordt hetzelfde materiaal getest op de aanwezigheid van afwijkende cellen. Helaas is er een beperkte deelname van vrouwen aan het bevolkingsonderzoek ($\pm 65\%$). Om de deelname aan het bevolkingsonderzoek te verhogen is het tegenwoordig mogelijk om thuis vaginaal materiaal af te nemen (zelfafnametest). Dit zelfafgenomen materiaal kan worden getest op de aanwezigheid van HPV, echter is het onderzoek naar afwijkende cellen op dit materiaal niet betrouwbaar genoeg. Dit betekent dat HPV-positieve vrouwen alsnog naar de huisarts moeten voor een uitstrijkje, wat zal leiden tot verlies in deelname. Moleculaire biomarkers die direct toepasbaar zijn op zelfafgenomen materiaal zijn dus dringend nodig. In dit proefschrift hebben we nieuwe moleculaire biomarkers ontdekt, waarmee baarmoederhalskanker en ernstige voorstadia gedetecteerd kunnen worden in zelfafgenomen materiaal en uitstrijkjes. Daarnaast hebben wij aangetoond dat moleculaire biomarkers getest kunnen worden in urine van vrouwen met baarmoederhalskanker.

Achtergrond informatie over baarmoederhalskanker

Baarmoederhalskanker wordt veroorzaakt door een infectie met hoog risico types van HPV. De meest voorkomende hoog risico types zijn HPV16 en HPV18. HPV is een seksueel overdraagbaar virus dat in de meeste gevallen binnen een paar jaar geklaard wordt door het immuunsysteem. In een enkel geval wordt het virus niet geklaard en bij langdurige aanwezigheid van het virus in de cellen van de baarmoederhals kan dit leiden tot kanker.

Na een HPV infectie kunnen er voorstadia van baarmoederhalskanker ontwikkelen. Deze voorstadia worden ook wel cervicale intra-epitheliale neoplasie (CIN) genoemd en kunnen worden opgesplitst in niet ernstige (CIN1) en ernstige voorstadia (CIN2/3). De ontwikkeling van baarmoederhalskanker na een HPV infectie is een langdurig proces en kan tot 30 jaar duren. Naast een HPV infectie vinden er veranderingen in het DNA en epigenetische veranderingen plaats die bijdragen aan de ontwikkeling van baarmoederhalskanker. Epigenetische veranderingen vinden plaats rondom het DNA, maar leiden niet tot veranderingen van het DNA zelf. Een voorbeeld hiervan is DNA methylering, waarbij een methyl groep op het DNA geplaatst wordt. Wanneer dit gebeurt op een plek in het DNA waar een gen wordt gereguleerd, kan dit resulteren in veranderde genexpressie. DNA methylering is een normaal proces wat in normale cellen

plaatsvindt. Echter, bij kankercellen of voorstadia hiervan kan de DNA methylering op andere plekken plaatsvinden, en dus andere genen beïnvloeden, wat tumourgroei kan bevorderen.

Naast DNA methylering zijn microRNAs (miRNAs) ook onderdeel van het epigenetische mechanisme van de cel. miRNAs zijn kleine RNA moleculen die niet coderen voor een eiwit maar wel betrokken zijn bij de expressie van genen. Wanneer een miRNA bindt aan een ander RNA molecuul (messenger RNA) kan dit leiden tot remming van de eiwitproductie. Het is belangrijk om beide moleculaire veranderingen (DNA methylering en miRNAs) tijdens de ontwikkeling van baarmoederhalskanker goed in kaart te brengen zodat we de ziekte vroegtijdig kunnen detecteren en optimaal kunnen bestrijden.

Het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker is een effectieve preventiestrategie wat leidt naar eerdere opsporing en behandeling van ernstige voorstadia (CIN2/3). In 2017 is het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker in Nederland veranderd; het onderzoek naar de aanwezigheid van afwijkende cellen (Pap-test; cytologie) is vervangen door een test op de aanwezigheid van HPV.

Naast deze verandering is het tegenwoordig ook mogelijk om zelf thuis vaginaal materiaal af te nemen voor de HPV test. Onderzoek heeft aangetoond dat een zelfafnametest de deelname aan het bevolkingsonderzoek kan vergroten, wat in Nederland maar 65% is. Een andere effectieve preventiestrategie is de HPV vaccinatie, welke wordt aangeboden aan meisjes in het jaar dat ze 13 worden. Deze vaccinatie biedt bescherming tegen de twee meest voorkomende hoog risico HPV types, HPV16 en HPV18.

Aangezien de meeste HPV infecties geklaard worden door het immuunsysteem, kunnen niet alle HPV positieve vrouwen behandeld worden. Er is dus een tweede test nodig, een zogenaamde triagetest, die alleen uitgevoerd wordt op HPV-positieve vrouwen, en die aantoont wie doorverwezen moet worden naar de gynaecoloog en eventueel behandeld moet worden. Deze test moet naast baarmoederhalskanker ook de ernstige voorstadia kunnen detecteren, aangezien deze voorstadia de meeste kans hebben om zich verder te ontwikkelen tot kanker. In het huidige bevolkingsonderzoek in Nederland wordt cytologie als triagetest op uitstrijkjes toegepast. Echter, cytologie is niet betrouwbaar op zelfafgenomen materiaal, wat betekent dat een vrouw die HPV positief blijkt te zijn op haar zelfafgenomen materiaal alsnog een afspraak bij de huisarts moet maken voor een uitstrijkje. Dit kan leiden tot verlies aan deelname voor vervolgonderzoek, terwijl deze vrouwen juist een verhoogd risico lopen op het ontwikkelen van baarmoederhalskanker. Naast de onbetrouwbaarheid van cytologie op zelfafgenomen materiaal is het ook een subjectieve test, wat betekent dat de beoordeling afhankelijk is van de persoon die het uitstrijkje beoordeelt. Door deze twee redenen is het noodzakelijk om nieuwe objectieve triagetesten te ontwikkelen die toepasbaar zijn op zowel uitstrijkjes als zelfafgenomen materiaal.

In dit proefschrift zijn we op zoek gegaan naar moleculaire veranderingen die ontstaan tijdens de ontwikkeling van baarmoederhalskanker. Onze focus lag op epigenetische veranderingen zoals miRNAs en DNA methylering. Ons doel was om biomarkers te ontdekken die een onderscheid kunnen maken tussen HPV-positieve vrouwen die wel of geen verhoogd risico lopen op het ontwikkelen van baarmoederhalskanker. Hiervoor hebben wij technieken gebruikt die de profielen van miRNAs en DNA methylering in kaart hebben gebracht in patiëntenmateriaal. We hebben verschillende typen patiëntenmateriaal gebruikt waaronder uitstrijkjes, zelfafgenomen materiaal en urine. De ontdekte biomarkers in zelfafgenomen materiaal zijn vervolgens getest en gevalideerd in onafhankelijke series.

Daarnaast hebben we onderzocht of DNA methylering aanwezig is in urine van vrouwen met baarmoederhalskanker en of deze biomarkers kanker kunnen aantonen. Deze onderzoeken hebben geleid tot een verrijking van onze kennis over de moleculaire veranderingen die samenhangen met de ontwikkeling van baarmoederhalskanker. Ook hebben deze onderzoeken veelbelovende biomarkers opgeleverd die als triagetest gebruikt kunnen worden op zelfafgenomen materiaal en uitstrijkjes in het bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker.

DE HOOFDSTUKKEN VAN DIT PROEFSCHRIFT

Hoofdstuk 1: Algemene inleiding

Hoofdstuk 1 geeft een algemene inleiding over baarmoederhalskanker en voorstadia hiervan, HPV, HPV-geïnduceerde kanker ontwikkeling, moleculaire veranderingen tijdens de ontwikkeling van baarmoederhalskanker, en preventiestrategieën.

Hoofdstuk 2: Eiwitten betrokken bij miRNA productie

De productie van miRNA's wordt gereguleerd door verschillende eiwitten. In Hoofdstuk 2 wordt de huidige kennis over de veranderingen van deze eiwitten in HPV-geïnduceerde kankers besproken. Naast baarmoederhalskanker kan HPV ook andere kankers veroorzaken zoals kankers van de anus, penis, vagina en vulva, en een stijgende subgroep van hoofd- en nekankers. MiRNA's zijn kleine niet-coderende RNA moleculen die genexpressie kunnen reguleren en zijn vaak zelf gedereguleerd in kankers, waaronder HPV-geïnduceerde kankers. De productie van miRNA's is een proces bestaande uit meerdere stappen en wordt uitgevoerd door verschillende eiwitten (zie Hoofdstuk 2, Figuur 1 voor een visuele weergave). Na de transcriptie van een miRNA in de kern wordt een deel van de "primary" miRNA (pri-miRNA) gesplitst door Drosha en zijn cofactor DGCR8 resulterend in een "precursor" miRNA (pre-miRNA) van ~60-70 nucleotiden. De pre-miRNA wordt vervolgens geëxporteerd naar het cytoplasma door het export eiwit XPO5, gevolgd door splitsing door Dicer in samenwerking met TRBP. Van de resulterende 'mature' miRNA duplex verzamelt één streng zich in het RNA geïnduceerde silencing complex (RISC) samen met een Argonaute eiwit (AGO). De miRNA leidt het complex naar messenger RNA's (mRNA's) voor hun degradatie of translationele repressie.

Naast de "mature" miRNA sequentie bestaan er verschillende miRNA sequentie varianten, zogenaamde isomiRs. Deze isomiRs kunnen worden gegenereerd door veranderingen in het splitsingspunt van Drosha en Dicer of door verschillende eiwitten zoals terminale nucleotidyltransferases (NTases). De samengevatte bevindingen in **Hoofdstuk 2** geven aan dat miRNA productie eiwitten Drosha, DGCR8, Dicer en AGO2 gedereguleerd zijn in HPV-geïnduceerde kankers. Deze deregulering wordt bijgedragen door de virale eiwitten E6 en E7, en genomische veranderingen. Verder zijn NTases die betrokken zijn bij de generatie van isomiRs zoals TENT2, TENT4A en TUT7, veranderd op het genomische en/of expressieniveau in baarmoederhalskanker, en sommige reeds in de voorstadia. Dit geeft aan dat NTases waarschijnlijk betrokken zijn tijdens de vroege ontwikkeling van kanker en dat de gegenereerde isomiR's veelbelovende biomarkers kunnen bieden voor een vroege diagnose van kanker. Toekomstige studies zijn nodig om de exacte rol van NTases tijdens kanker ontwikkeling op te helderen en hun modulatie kan een potentiële therapeutische weg bieden.

Hoofdstuk 3: Optimaliseren van miRNA analyse

De meest gebruikte methode voor nauwkeurige miRNA expressieanalyse is reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (PCR) (RT-qPCR). De gemeten expressie kan worden onderverdeeld in de biologische expressie en de technische bias. Dit laatste is ongewenst en kan optreden vanwege verschillen in hoeveelheid en kwaliteit van het gebruikte materiaal, efficiëntie van de RT en qPCR prestaties. Voor een betrouwbare analyse van miRNA expressie met RT-qPCR is adequate data normalisatie essentieel om niet-biologische, technische variaties te verwijderen. Onvoldoende normalisatie kan de biologische verschillen van de miRNA verminderen of overdrijven, wat kan leiden tot onjuiste gegevens en conclusies. In Hoofdstuk 3 hebben we de meest optimale methoden gedefinieerd voor het normaliseren van miRNA expressie analyse met RT-qPCR. We hebben een panel van 11 kandidaat referentiegenen geselecteerd uit genoom-wijde miRNA profielen van weefsels, zelf-afgenomen materiaal en de literatuur.

De 11 referentiegenen zijn geanalyseerd in verschillende typen materiaal van de baarmoederhals (weefsels, uitstrijkjes en zelfafgenomen materiaal) met verschillende ziektestadia. We hebben de expressiestabiliteit van de 11 referentiegenen geëvalueerd door de combinatie van drie algemeen gebruikte algoritmen (GeNorm, NormFinder en BestKeeper). De berekening van signal-to-noise ratios (SNRs) en P waarden tussen controle- en ziektegroepen werd gebruikt om het effect van normalisatie van twee miRNA's te evalueren. Hogere SNR waarden impliceren grotere verschillen tussen de groepen en zijn daarom gewenst. We identificeerden miR-423 als geschikt referentiegen voor alle typen materiaal van de baarmoederhals, te gebruiken in combinatie met RNU24 in weefsels, RNU43 in uitstrijkjes en miR-30b in zelfafgenomen materiaal. In het algemeen zagen we dat normalisatie met behulp van de twee geselecteerde referentiegenen de SNR waarden verhoogden, terwijl normalisatie met de meest algemeen gebruikte referentiegenen in de literatuur variatie introduceerde en de SNR verlaagde. Al met al laten onze resultaten zien dat de meest optimale referentiegenen kunnen verschillen tussen verschillende typen materiaal en dat adequate normalisatie de interpretatie van de gegevens zou kunnen verbeteren.

Hoofdstuk 4: miRNA analyse in uitstrijkjes

In **Hoofdstuk 4** hebben we de toepassing van miRNAs in uitstrijkjes onderzocht. We hebben de klinische prestaties geëvalueerd van acht eerder geïdentificeerde miRNA's op uitstrijkjes als triagetest voor HPV-positieve vrouwen in het bevolkingsonderzoek. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat de expressie van deze acht miRNA's (miR-9, miR-15b, miR-28, miR-100, miR-125b, miR-149, miR-203a en miR-375) bleek te zijn veranderd in weefsels van vrouwen met ernstige voorstadia of baarmoederhalskanker. Allereerst hebben we met behulp van RT-qPCR de expressie van 6 van de 8 miRNA's bevestigd in 58 weefsels van de baarmoederhals bestaande uit normaal weefsel, ernstige voorstadia (CIN2/3), en baarmoederhalskankers die

verder onderverdeelt kunnen worden in plaveiselcelcarcinomen (SCC's) en adenocarcinomen (AC's). Vervolgens hebben we geevalueerd of de veranderde expressie van de 6 miRNA's ook werd waargenomen in uitstrijkjes. Tweehonderdvijfentwintig HPV-positieve uitstrijkjes van vrouwen zonder ziekte aan de baarmoederhals, CIN3, SCC of AC werden geanalyseerd met RT-qPCR. De meeste van onze bevindingen in uitstrijkjes waren vergelijkbaar met die verkregen in weefsels.

Om het meest onderscheidende miRNA panel voor HPV-positieve uitstrijkjes van vrouwen met CIN3 te identificeren, hebben we multivariabele logistische regressie analyse uitgevoerd en een 2-miRNA classifier geïdentificeerd bestaande uit miR-15b en miR-375 met een area under the curve (AUC) van 0,622 voor CIN3 detectie. Bovendien verbeterde het combineren van deze 2-miRNA classifier met HPV16/18-genotypering de classificatie van CIN3 met een gevoeligheid van 63% en een specificiteit van 77%. Belangrijk is dat alle kankers werden gedetecteerd met behulp van de 2-miRNA classifier, alleen of in combinatie met HPV16/18-genotypering. Bovendien onthulde functionele analyse van miR-15b en miR-375 dat beide miRNA's de levensvatbaarheid van baarmoderhalskankercellen beïnvloeden en dit geeft aan dat biologisch relevante miRNA's veelbelovende biomarkers zijn. Onze bevindingen tonen de potentie van miRNA expressie analyse in uitstrijkjes voor triage van HPV-positieve vrouwen in het bevolkingsonderzoek.

Hoofdstuk 5: miRNA analyse in zelfafgenomen vaginaal materiaal

Eerder onderzoek heeft aangetoond dat biomarkers die goed werken op weefsels en uitstrijkjes, niet per se goede biomarkers zijn voor toepassing op zelfafgenomen materiaal. Dit zal voornamelijk komen door de lagere aanwezigheid van ziekte-gerelateerde cellen en hogere aanwezigheid van cellen die niet afkomstig zijn van de baarmoederhals in dit materiaal. Om de meest optimale biomarkers voor triage van HPV-positieve vrouwen te identificeren die direct toepasbaar zijn op zelfafgenomen materiaal, hebben we in **Hoofdstuk 5** genomewijde miRNA profielen in kaart gebracht, door middel van small RNA sequencing (sRNA-Seq), van zelfafgenomen materiaal van 74 HPV-positieve vrouwen. Na uitgebreide statistische analyse hebben we een panel van 9 miRNA's geïdentificeerd met een AUC van 0,89 voor CIN3 detectie.

Om te controleren dat de geïdentificeerde miRNA's gerelateerd zijn aan de ontwikkeling van baarmoederhalskanker, hebben we in-house beschikbare genomewijde miRNA profielen van weefsels geanalyseerd, bestaande uit normaal weefsel, CIN2/3 en SCC's. Voor de meerderheid van de miRNA's hebben we vergelijkbare expressiepatronen waargenomen zoals geobserveerd in het zelfafgenomen materiaal, en alle miRNA's behalve één toonde verhoogde expressie in SCC in vergelijking met de controles.

De daaropvolgende validatie door RT-qPCR in een onafhankelijke set van zelfafgenomen materiaal (controles, CIN3 en SCC) gevolgd door logistische regressie analyse liet een goede klinische prestatie zien voor een 5-miRNA classifier bestaande uit let-7b, miR-15b, miR-20a, miR-93 en miR-222 met een AUC van 0,78 voor CIN3+ detectie. Deze 5-miRNA classifier kon 67% van CIN3 (32 van de 48) en 93% van de SCC's (38 van de 41) detecteren met een specificiteit van 65%. Deze bevindingen tonen aan dat het mogelijk is om veranderde miRNA expressie geassocieerd met CIN3 en baarmoederhalskanker in zelfafgenomen materiaal te detecteren. Deze resultaten laten zien dat miRNA expressie analyse een nieuwe en veelbelovende moleculaire triage strategie biedt die direct toepasbaar is op zelfafgenomen materiaal.

Hoofdstuk 6: DNA methylering analyse in zelfafgenomen vaginaal materiaal

Naast miRNA's bieden andere epigenetische veranderingen ook potentiële moleculaire biomarkers. Voorgaande studies hebben de potentie van DNA methyleringsmarkers voor triage van HPV-positieve vrouwen aangetoond, zelfs in onzuiver materiaal wat weinig ziektecellen bevat, zoals zelfafgenomen vaginaal materiaal.

Om een DNA methylatie classifier te verkrijgen met optimale klinische prestaties op zelfafgenomen materiaal, hebben we in **Hoofdstuk 6** genoom-wijde DNA-methylatie profielen gegenereert, met behulp van de Infinium 450K-array, rechtstreeks op zelfafgenomen materiaal. We hebben 12 DNA methylatie markers geïdentificeerd met een goed onderscheidend vermogen voor CIN3 die vervolgens zijn geanalyseerd door multiplex qMSP in grote series van zelfafgenomen materiaal wat afgenomen is met behulp van twee verschillende zelfafnametesten (lavage n = 245 en brush n = 246). Logistische regressie analyse resulteerde in een classifier bestaande uit 3 DNA methyleringsmarkers (ASCL1, LHX8 en ST6GALNAC5), met een optimale klinische prestatie voor CIN3 detectie. De methylerings classifier werd vervolgens gevalideerd door multiplex qMSP in grote onafhankelijke series van zelfafgenomen materiaal (n = 100 lavage en n = 287 brush). Deze serie is afkomstig van vrouwen die niet hebben deelgenomen aan het bevolkingsonderzoek maar wel hiervoor zijn uitgenodigd. De resultaten vertoonden een uitstekende en reproduceerbare klinische prestatie voor CIN3 detectie in HPV-positieve lavages (AUC = 0,88, gevoeligheid = 74%, specificiteit = 79%) en brushes (AUC = 0,90, gevoeligheid = 88%, specificiteit = 81%). Belangrijk is dat alle kankers (zowel SCC als AC) werden gedetecteerd met behulp van de methylerings classifier.

Deze studie geeft aan dat de methylerings classifier een krachtige triage strategie biedt voor de detectie van zowel CIN3 als baarmoederhalskanker in HPV-positief zelfafgenomen vaginaal materiaal, wat superieur is aan andere momenteel beschikbare triage strategieën.

Hoofdstuk 7: DNA methylering analyse in urine

Ten slotte hebben we gekeken naar de potentie van HPV DNA en DNA methylatie analyse in urine voor detectie van baarmoederhalskanker als een alternatief voor zelfafgenomen materiaal. Het gebruik van urine heeft onlangs veel belangstelling gekregen als een andere niet-invasieve methode van ziekte detectie. Er is vastgesteld dat urine de voorkeur heeft boven het verzamelen van materiaal van de baarmoederhals, hetzij door een arts of door zelfafname. Hoewel studies over DNA methylatie analyse in weefsels, uitstrijkjes en zelfafgenomen materiaal overvloedig zijn, bestaan er beperkte gegevens over DNA methylatie analyse in urine. Daarom hebben we in **Hoofdstuk 7** HPV en zes eerder geïdentificeerde DNA methyleringsmarkers (FAM19A4, GHSR, PHACTR3, PRDM14, SST en ZIC1) getest in urine en gepaarde uitstrijkjes van vrouwen met baarmoederhalskanker.

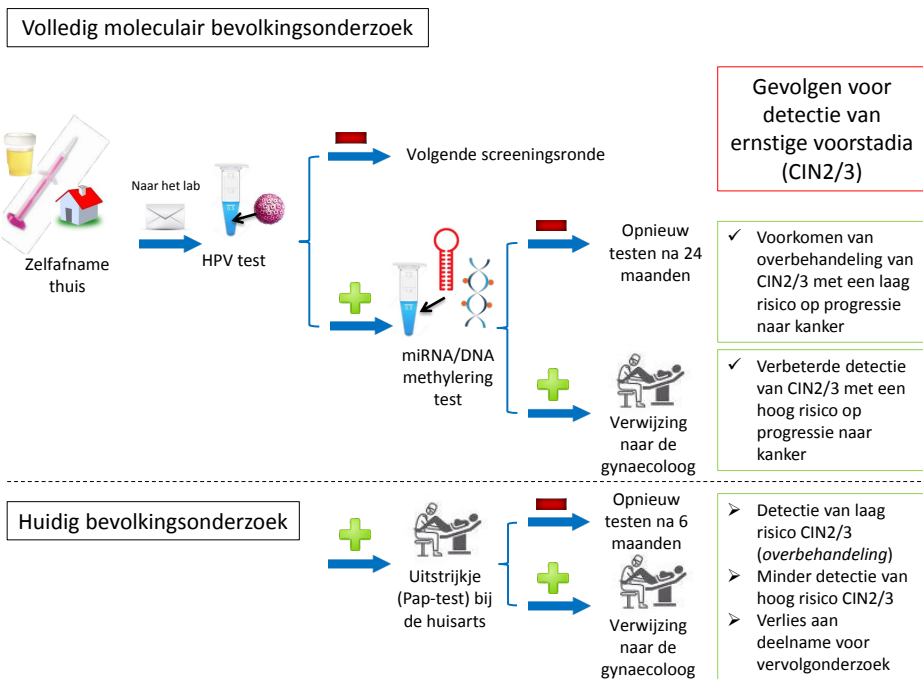
HPV DNA-testresultaten werden vergeleken tussen verschillende urinecomponenten (volle urine en sediment) en uitstrijkjes en leverden een sterke tot bijna perfecte overeenkomst op (sediment versus volle urine: $\kappa = 0,79$; 95% CI 0,58-1,00, sedimenten versus uitstrijkjes: $\kappa = 0,85$; 95% CI 0,64-1,00). Bovendien waren de DNA methylatieniveaus die in de urine werden gedetecteerd, matig tot sterk gecorreleerd aan die in de uitstrijkjes. Logistische regressieanalyse onthulde dat alle DNA methyleringsmarkers een goed onderscheidend vermogen toonden voor detectie van baarmoederhalskanker met een AUC variërend van 0,744 (PHACTR3) tot 0,867 (SST). Onze resultaten wijzen op de potentie van HPV DNA- en DNA methylatie analyse in urine voor de detectie van baarmoederhalskanker.

Verbetering van het bevolkingsonderzoek

Het huidige bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker in Nederland test op de aanwezigheid van HPV in uitstrijkjes. Momenteel wordt dit aangevuld met cytologie als triage strategie.

Vanwege de onbetrouwbaarheid van cytologie op zelfafgenomen vaginaal materiaal, moeten vrouwen die HPV-positief zijn getest op hun zelfafgenomen materiaal hun huisarts bezoeken voor een uitstrijkje wat zal leiden tot verlies aan deelname voor vervolgonderzoek. De miRNA- en DNA methyleringsmarkers die in dit proefschrift worden beschreven (**Hoofdstuk 5** en **6**) bieden veelbelovende alternatieve triage strategieën voor HPV-positieve vrouwen en ondersteunen een overgang naar een volledig moleculair bevolkingsonderzoek met primaire HPV detectie en triage met moleculaire biomarkers, toepasbaar op zelfafgenomen materiaal. Naast zelfafgenomen materiaal kan een overgang naar een volledig moleculair bevolkingsonderzoek toepasbaar op urine ook worden overwogen.

In een volledig moleculair bevolkingsonderzoek kunnen vrouwen thuis vaginaal materiaal verzamelen en opsturen naar het laboratorium (Figuur 1). Wanneer de aanwezigheid van HPV wordt gevonden in dit materiaal zal op hetzelfde materiaal een moleculaire triagetest worden uitgevoerd op basis van miRNA of DNA methyleringsmarkers. Alleen HPV-positieve vrouwen met een positieve moleculaire triagetest worden doorverwezen naar de gynaecoloog. Onderzoek heeft aangetoond dat DNA methyleringsmarkers (en mogelijk miRNA's) bijna alle baarmoederhalskankers en ernstige voorstadia met een hoog risico op progressie naar kanker detecteren. In het geval van een volledig moleculair bevolkingsonderzoek met DNA methylering als triagetest zullen dus alleen de vrouwen die daadwerkelijk vervolgonderzoek en behandeling nodig hebben worden doorverwezen. Vrouwen met een negatieve triagetest kunnen na 24 maanden opnieuw getest worden en doorverwezen bij een positieve uitslag. Met deze aanpak kan overbehandeling en bijbehorende gevolgen, zoals een slechtwerkende baarmoedermond en vroeggeboorte, worden voorkomen.



Figuur 1. Concept van volledig moleculair bevolkingsonderzoek naar baarmoederhalskanker.

Een combinatie van primair HPV testen met een moleculaire triage test op basis van miRNAs of DNA methylering op zelfafgenomen vaginaal materiaal zal alleen de vrouwen met CIN2/3 detecteren die een hoog risico hebben op progressie naar kanker. Deze aanpak zal overbehandeling voorkomen. Het huidige bevolkingsonderzoek staat ter vergelijking eronder.

CONCLUSIE

Concluderend, in dit proefschrift hebben we veranderde miRNA- en DNA methylatieprofielen aangetoond geassocieerd met de ontwikkeling van baarmoederhalskanker in verschillende soorten materiaal van de baarmoederhals, waaronder uitstrijkjes, zelfafgenomen materiaal en urine. De meeste veranderingen werden al waargenomen in het voorstadium van kanker en namen toe met de ernst van de ziekte. Genoom-wijde technieken uitgevoerd op HPV-positief zelfafgenomen materiaal hebben nieuwe veelbelovende miRNA- en DNA methyleringsmarkers voor detectie van CIN3 en baarmoederhalskanker geïdentificeerd.

We hebben aangetoond dat DNA methyleringsmarker-gebaseerde triage van HPV-positief zelfafgenomen vaginaal materiaal in staat is om alle baarmoederhalskankers en de meerderheid van de ernstige voorstadia te detecteren met een AUC van (bijna) 0,9. De nieuwe DNA methyleringsmarkers die in dit proefschrift worden beschreven, presteren even goed als het goed klinisch gevalideerde bi-markerpanel FAM19A4/miR124-2. Daarnaast laten deze nieuwe DNA methyleringsmarkers een competitieve prestatie zien versus andere triage strategieën en zijn ze compatibel met zelfafgenomen materiaal (**Hoofdstuk 6**). Met deze prestatiekenmerken vereizen deze DNA methyleringsmarkers verdere klinische validatie om de geschiktheid ervan in zelfafgenomen materiaal en mogelijk urine te bevestigen.

Ondanks dat de betrokkenheid van miRNA's bij baarmoederhalskanker herhaardelijk gerapporteerd is, blijft hun potentie als triage strategie voor HPV-positieve vrouwen grotendeels ongetest. Ons onderzoek naar miRNA's in zelfafgenomen materiaal (**Hoofdstuk 5**) is de eerste studie die genoom-wijde miRNA profielen en de klinische toepasbaarheid ervan in HPV-positief zelfafgenomen materiaal heeft bepaald. De haalbaarheid van miRNA detectie in zelfafgenomen materiaal heeft de weg vrijgemaakt voor verdere beoordeling van hun geschiktheid en nauwkeurigheid als triage strategie in klinisch materiaal van HPV-positieve vrouwen.

De bovengenoemde resultaten bieden veelbelovende alternatieve triage strategieën voor HPV-positieve vrouwen en ondersteunen een overgang naar een volledig moleculair bevolkingsonderzoek met primaire HPV detectie en triage met moleculaire biomarkers, toepasbaar op zelfafgenomen vaginaal materiaal.