

<http://hdl.handle.net/1765/123391>



## Summaries



## ENGLISH SUMMARY

Human papillomavirus (HPV) infections are common in both men and women and are in most cases cleared within 2 years after infection. When not cleared by the immune system, an infection with high-risk HPV genome expression can cause instability of the human DNA that can lead to cellular aberrations which are reflected in histological morphology of the epithelium. These changes are called intraepithelial neoplasia or squamous intraepithelial lesion. A lot of these lesions represent productive infections that will regress spontaneously without treatment, but some are transforming infections that will progress to cervical or anal cancer without interference. Identification of molecular differences that can distinguish between productive lesions which might regress spontaneously and advanced transforming lesions with a higher risk of progression to cancer could help identify those patients that require treatment and differentiate those patients in which close follow-up would be more appropriate. This thesis aimed to identify biomarker expression patterns corresponding with different grades of cervical and anal precursor lesions in cytological and histological specimens, opposing an important tool for diagnosis and clinical management of patient at risk of cervical and anal cancer.

Chapter 1 provides an overview of existing cervical and anal cancer prophylaxis, screening, triage, diagnosing and treatment. Current knowledge on natural history of HPV infection is summarized and gaps in current knowledge are mentioned. Finally, the biomarkers that have been used throughout this thesis are introduced and their role in improving diagnosing and clinical management are discussed.

## PART 1 – BIOMARKERS IN CERVICAL CANCER SCREENING AND TRIAGE

The introduction of hrHPV testing as a primary screening test has provided us with a more sensitive approach to detecting women with CIN2+/HSIL compared to cytology-based screening. By increasing the detection of women at risk of cervical precancer and cancer, cancer incidence can be decreased. Another way to lower cervical cancer incidence is increasing the participation rate of the screening programme. Currently, half of all carcinomas are found in women who have not attended screening and these so-called 'non-responders' are more likely to hand in a self-sample when offered than attend the doctor's office after an invitation for a Pap smear. Brush-based self-samples collect cervicovaginal cells from the vagina with a brush that is inserted in the vagina, and its performance for detection of CIN2+/HSIL using hrHPV testing has been found comparable to that of hrHPV testing on a clinician-taken smear.

Chapter 2 describes how first-void urine, which is collected less invasively than a brush-based self-sample, can be used to detect women with high-grade lesions. We compared the sensitivity of hrHPV detection and genotype detection in self-collected urine samples in the morning and later on during the day, in brush-based self-samples and clinician-taken smears (CTS). We measured CIN2+ detection in women referred for colposcopy using two different HPV testing algorithms (SPF10 and GP5+/6+). We found that all three sample types detected all CIN3 cases with both tests. The sensitivity for CIN2+ with the SPF10 system was 100% in clinician-taken smears, brush based self-samples and the second urine sample, and was 95% in the morning first-void urine sample. With the GP5+/6+ assay, sensitivity was 95% in all sample types. The sensitivities and specificities for both tests on each of the sample types did not significantly differ. Looking at the agreement of found genotypes in the paired samples of a woman, we found a discordance of 10–14% on hrHPV genotype. We concluded that CIN2+ detection using HPV testing of first-void urine samples shows a sensitivity similar to that of clinician-taken smears or brush-based self-samples, and in addition is convenient to use for women. There was substantial to almost excellent agreement between all samples on genotype with both hrHPV assays.

hrHPV screening has a higher sensitivity, but lower specificity than cytology-screening and therefore, a triage test is needed for hrHPV-positive women to prevent unnecessary colposcopy referrals. In the search for an objective and reproducible triage test with good clinical performance, various molecular tests have been evaluated.

In Chapter 3 we compared the performance of hrHPV-testing and genotyping (GP5+/6+), and methylation testing of human tumor suppressor genes FAM19A4 and/or miR124-2, and different combinations of those, for the detection of CIN3 and cervical carcinoma in women with an ASC-US/LSIL or ASC-H/AGC/HSIL Pap smear result. Both women younger than 30 and women of 30 years of age and over were included, and results of these groups of women were interpreted both together and separately. Overall sensitivity and specificity for CIN3+ were respectively 90.3% and 31.8% for hrHPV, 77.8% and 69.3% for methylation biomarkers, and 93.1% and 49.4% for combined HPV16/18 and/or methylation positivity, which was the best combination that we found. Excluding cancers, in CIN3, the markers performed equally well. In women aged  $\geq 30$ , the sensitivity of combined HPV16/18 and methylation was increased (98.2%) with a specificity of 46.3%. And in younger women, this test had an optimal balance between sensitivity (75.0%) compared to methylation alone and specificity (55.5%) compared to hrHPV testing alone as well. We concluded that the combination of HPV16/18 and methylation analysis was very sensitive and offered improved specificity for CIN3+, opening the possibility of

rapid treatment for these women and follow-up for women with potentially regressive, less advanced, HSIL/CIN2 lesions.

Our study about HPV16/18 genotyping and detection of hypermethylation of human cell genes involved in cervical oncogenesis and others have shown promising results in triage of high-risk HPV (hrHPV)-screen positive women on cervical smears. These tests can be performed on self-samples of cervicovaginal cells. In Chapter 4 we studied whether a self-sample represents the hrHPV genotype causing the worst cervical lesion, using the GP5+/6+ assay. This has important implications for hrHPV genotyping triage on self-samples. In addition, we studied whether any differences in hypermethylation of FAM19A4/miR124-2 exist between CIN lesions caused by different hrHPV types. For this study, we used self-samples collected from former non-responders to the Dutch screening programme from the PROTECT-3b trial. We found the causative hrHPV genotype of the worst lesion on self-sample in 93.4%, with HPV16 the most frequently detected type on self-sample and also the most frequently found causative genotype in CIN3+, and all of these women with HPV16-caused CIN3+ also had HPV16 detected on self-sample. There were no differences in the percentages of positive FAM19A4/miR124-2 methylation assays between lesions caused by HPV16/18 (73.8% methylation positivity in CIN3+) or other hrHPV genotypes (66.7% methylation positivity in CIN3+).

## **PART 2 – BIOMARKERS EXPRESSION PATTERNS IN AIN**

Classical H/E interpretation of biopsies is subject to inter and intra observer variation and does not reflect cellular transformation, not allowing for the identification of advanced transforming lesions with a higher risk of progression to cancer and in need of treatment and productive infections with a higher chance of spontaneous regression. This leads to differences in diagnosis between pathologists, centres and clinical studies on the one hand, and to overtreatment of women with CIN and men and women with AIN. CIN treatment has a risk of adverse pregnancy outcome and AIN treatment is burdensome and has a high percentage of recurrent lesions. There are biomarkers can differentiate between productive and transforming lesions, of which a selection of immunohistochemical markers was used in sets of anal biopsies in Part 2 of the thesis.

In Chapter 5 we used immunohistochemical marker p16, which is a surrogate marker of transforming activity of the HPV E7 gene, and Ki-67, a marker of cell cycle activity, and the novel marker HPV E4 which is a marker for completion of the productive phase of the HPV life cycle to describe different immunohistochemical staining patterns in AIN biopsies. Biopsies were taken from the anal canal of men who have sex with men,

and most were HIV positive. We identified the causative HPV genotype of lesions using the SPF10 assay and laser capture microdissection (LCM) in case of multiple infections. Using the three immunohistochemical markers, we were able to identify four main biomarker expression patterns: p16 negative, E4 negative, Ki-67 positive (p16-,E4- Ki-67+ ), representing early or resolving AIN1 (1); p16 negative, E4 positive, Ki-67 positive (p16-, E4+, Ki-67+), representing mature productive AIN1 (2); p16 positive, E4 positive, Ki-67 positive, (p16-, E4+, Ki-67+) representing productive and early transforming infection mostly seen in AIN2 (3); and finally p16 positive, E4 negative, Ki-67 positive (p16+, E4-, Ki-67+), representing advanced transforming infection mostly seen in AIN3 (4). Our results suggested that division of lesions into LSIL and HSIL might be too simplistic and that by combining p16 and Ki-67 with E4 productive AIN lesions can be distinguished from advanced transforming AIN.

Findings from Chapter 5 showed us that Ki-67 is a useful marker, mostly helpful in discriminating between normal tissue and AIN1/LSIL. However, the most important improvement of clinical management will result from better identification of productive LSIL and HSIL with a higher chance of spontaneous regression, and this could well be identified using a combination of p16 and E4 only.

In Chapter 6, we therefore used a combination of E4 and p16 to improve definition of lr- and hr-HPV associated AIN in HIV+ MSM. We compared this approach to current LAST criteria, which uses p16 in a subset of lesions to categorize lesions as either LSIL or HSIL. Worst lesions were scored for p16 (0-4), used to identify transforming activity of HPV, and panHPV E4 (0-2) to identify HPV production and life-cycle completion. LAST diagnosis found 37 normal biopsies, 55 LSIL and 91 HSIL. 92.6% of LSIL was caused by lrHPV and 92.4% of HSIL was caused by hrHPV. No normal biopsy showed E4; 41.8% of LSIL and 38.5% of HSIL were E4 positive, and no differences in E4 positivity were found between lesions caused by lrHPV and hrHPV. Most lesions caused by lrHPV showed extensive patchy p16 staining (89.5%). From our results we concluded that combined p16/E4 IHC identifies both productive and non-productive LSIL associated with lrHPV and HSIL associated with hrHPV and can provide detailed information about AIN beyond supporting H/E. Using p16/E4 could potentially allow more selective treatment of hr-HPV-caused advanced transforming HSIL, preventing unnecessary treatment of productive HSIL and lr-HPV associated LSIL.

### **PART 3 – BIOMARKER EXPRESSION PATTERNS IN AIN**

The final part of this thesis focussed on how different combinations of biomarkers p16/E4 and methylation markers FAM19A4/mir124-2 can be used to identify women with or at risk of  $\geq$ CIN2/HSIL.

Chapter 7 describes a cross-sectional study in which the relationships between the immunohistochemical expression patterns of markers p16 and HPV E4 in biopsies and methylation markers FAM19A4/miR124-2 in cervical smears of women with different grades of CIN and negative controls associated with hrHPV infection was explored. Also, we studied the relation between the biomarker expression pattern and the grade of CIN or invasive cancer found on excision treatment. Most importantly, we show that there is an inverse relation between HPV E4 expression on biopsy and hypermethylation of markers FAM19A4/miR124-2 detected on cervical smear. Both p16 and methylation positivity increase with lesion severity and identify neoplastic transformation. Most HPV E4 positivity was found in lesions with p16 expression in the lower 2/3 of the epithelium, suggesting that there is also a role for p16, which is a surrogate marker of HPV E7 over-expression, in driving the increased epithelial proliferation necessary for viral reproduction. Expression patterns confirm that CIN1 and CIN2 are very heterogeneous groups, consisting of productive infections expressing E4 and transforming lesions expressing p16, some of which show methylation marker positivity. Our work shows that the use of the E4 immunomarker and methylation markers in this group could offer more detailed information than current CIN grading practice.

Finally, in Chapter 8, results described in this thesis were interpreted in a broader sense. Our results were discussed in the light of various factors that influence the effectiveness of screening and the incidence of cervical and anal cancer in the current and a possible future situation.





## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Human papillomavirus (HPV) infecties zijn veelvoorkomend in zowel mannen als vrouwen en worden in de meeste gevallen binnen 2 jaar opgeruimd door ons afweersysteem. Wanneer de infectie niet wordt opgeruimd door het immuunsysteem, kan een infectie met een hoog-risico HPV type zorgen voor instabiliteit van het humane DNA wat kan zorgen voor cellulaire veranderingen die zorgen voor afwijkingen in de histologische morfologie van het epitheel. Dit wordt intraepitheliale neoplasie of 'squamous intraepithelial lesion' genoemd. Veel van deze laesies zijn productieve HPV infecties die spontaan in regressie zullen gaan wanneer deze niet worden behandeld, maar sommige zijn transformerende infecties welke progressie naar cervix- of anuscarcinoom kunnen vertonen wanneer zij niet worden behandeld. Identificatie van moleculaire verschillen tussen productieve laesies die mogelijk regressie zullen vertonen en vergevorderde transformerende laesies met een hoger risico op progressie naar kanker kunnen helpen bij het herkennen van patiënten die een behandeling nodig hebben en patiënten waarbij een behandeling niet noodzakelijk is. Dit proefschrift had als doel om biomarker expressie patronen te identificeren in cytologische en histologische monsters die verschillende gradaties van cervicale en anale laesies weergeven. Zulke biomarkers kunnen een belangrijke rol spelen bij het diagnosticeren van verschillende stadia van intraepitheliale neoplasie en het bepalen van het klinische beleid van patiënten met een risico op baarmoederhalskanker en anuskanker.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van bestaande profylaxe, screening, triage, diagnose en behandeling van baarmoederhalskanker en anuskanker. De huidige kennis over het beloop van een HPV-infectie wordt in dit hoofdstuk samengevat en hiaten in de huidige kennis worden genoemd. Ten slotte worden de biomarkers geïntroduceerd die in dit proefschrift zijn gebruikt en hun rol bij het verbeteren van de diagnose en het klinisch management van patiënten wordt besproken.

## DEEL 1 - BIOMARKERS IN BAARMOEDERHALSKANKER SCREENING EN TRIAGE

De introductie van hrHPV-testen als primaire screeningstest heeft geresulteerd in een screeningsprogramma met een hogere sensitiviteit voor het detecteren van vrouwen met CIN2+/HSIL in vergelijking met op cytologie gebaseerde screening. Met een verhoogde sensitiviteit van het screeningsprogramma kan de baarmoederhalskankerincidentie worden verlaagd. Een andere manier om de incidentie van baarmoederhalskanker te verlagen, is het verhogen van de participatiegraad van het screeningsprogramma.

Momenteel wordt de helft van alle carcinomen aangetroffen bij vrouwen die niet aan de screening deelnemen. Deze zogenaamde 'non-responders' zullen eerder een zelfmonster inleveren dan naar de arts gaan voor een uitstrijkje. Zelfmonsters kunnen worden genomen met zelfafname borstels welke door een vrouw zelf wordt ingebracht in de vagina en daar cervicovaginale cellen verzamelt. De detectie van CIN2+/HSIL met behulp van hrHPV-testen uitgevoerd op een zelfafname borstel is vergelijkbaar met die van hrHPV-testen uitgevoerd op een door een arts afgenomen uitstrijkje.

Hoofdstuk 2 beschrijft hoe de eerste fractie van de mictie in een urinemonster kan worden gebruikt om vrouwen met hooggradige CIN laesies te detecteren. We vergeleken de gevoeligheid van hrHPV-detectie en genotypering in in de ochtend verzamelde urinemonsters, in later gedurende de dag verzamelde urinemonsters, in zelfafnames gedaan met een borstel en in door de arts gemaakte uitstrijkjes (clinician-taken samples: CTS). We hebben de CIN2+-detectie bij vrouwen die werden verwezen voor colposcopisch onderzoek in de verschillende sample typen met behulp van twee verschillende HPV-testalgoritmen (SPF10 en GP5+/6+) onderzocht. Alle CIN3-gevallen werden met behulp van beide HPV-tests in alle sample typen opgespoord. De gevoeligheid voor CIN2+ met het SPF10-systeem was 100% in door de arts genomen uitstrijkjes, zelfafname borstels en het tweede urinemonster van de dag, en was 95% in het ochtend urinemonster. Met de GP5+/6+ test was de gevoeligheid 95% in alle sample typen. De sensitiviteit en specificiteit voor beide HPV-testen was voor geen enkel sample type significant verschillend. De gevonden HPV genotypen in de verschillende sample typen van één vrouw verschilden 10–14%. We concludeerden dat CIN2+-detectie met behulp van HPV-testen van het eerste gedeelte van een urinemonster een gevoeligheid vertoont die vergelijkbaar is met die van door de arts afgenomen uitstrijkjes of zelfafnames met een borstel. Met beide testen was er een substantiële tot bijna uitstekende overeenkomst in gevonden HPV genotypen in alle sample typen. Daarnaast is het verzamelen van een urinemonster handig en makkelijk voor een vrouw zelf.

hrHPV-screening heeft een hogere sensitiviteit, maar een lagere specificiteit dan cytologie-screening en daarom is een triage test voor hrHPV-positieve vrouwen noodzakelijk om onnodige colposcopie-verwijzingen te voorkomen. In de zoektocht naar een objectieve en reproduceerbare triage test met goede klinische waarde werden verschillende moleculaire tests geëvalueerd.

In hoofdstuk 3 vergeleken we hrHPV-testen en genotypering (GP5+/6+) en methylatie-tests van humane tumorsuppressorgenen FAM19A4 en/of miR124-2, en verschillende combinaties daarvan, voor de detectie van CIN3 en cervixcarcinoom bij vrouwen met een ASC-US/LSIL of ASC-H/AGC/HSIL uitstrijkje. Vrouwen jonger dan 30 jaar en vrou-

wen van 30 jaar en ouder werden in de studie geïncludeerd, en de resultaten van deze groepen vrouwen werden zowel samen als afzonderlijk geïnterpreteerd. In de gehele groep waren de sensitiviteit en specificiteit voor CIN3+ respectievelijk 90,3% en 31,8% voor hrHPV, 77,8% en 69,3% voor methylatiepositiviteit en 93,1% en 49,4% voor de combinatie van HPV16/18 genotypering en/of methylatiepositiviteit, wat de beste combinatie was die we vonden. De markers presteerden even goed voor de detectie van CIN3 (exclusief carcinomen). Bij vrouwen van 30 jaar en ouder was de sensitiviteit van gecombineerde HPV16/18 en methylatie detectie hoger (98,2%) met een specificiteit van 46,3%. Bij jongere vrouwen (<30 jaar) had deze test de beste balans tussen sensitiviteit (75,0%) en specificiteit (55,5%). We concludeerden dat de combinatie van HPV16/18 en methylatie analyse zeer gevoelig was en goede specificiteit voor CIN3+ bood. Het gebruik van een dergelijke combinatie biedt de mogelijkheid van snelle behandeling van vrouwen positief voor deze combinatie en daarmee een hoge kans op CIN3+, en follow-up voor vrouwen negatief voor deze combinatie en daarmee een hoge kans op een mogelijk regressieve, minder geavanceerde HSIL/CIN2-laesie.

Onze studie over het gebruik van HPV16/18 genotypering en detectie van hypermethylering van genen die betrokken zijn bij cervicale oncogenese en de studies van anderen over het gebruik van deze markers als triage test na een hrHPV-positief screenings uitstrijkje hebben veelbelovende resultaten laten zien. HPV genotypering en methylatietesten kunnen ook worden uitgevoerd op zelfmonsters van cervicovaginale cellen.

In hoofdstuk 4 hebben we onderzocht of het hrHPV-genotype dat de meest ernstige onderliggende laesie veroorzaakt in een zelfafname kan worden gevonden met behulp van de GP5+/6+ HPV test. Dit is van belang voor het gebruik van hrHPV genotypering als triage test in zelfafnamen. Daarnaast hebben we onderzocht of er verschillen in hypermethylering van FAM19A4/miR124-2 bestaan tussen CIN-laesies veroorzaakt door verschillende hrHPV-typen. Voor dit onderzoek hebben we zelfafnamen gebruikt die zijn verzameld in het kader van de PROHTECT-3b-studie bij voormalige non-responders van het Nederlandse screeningprogramma. We vonden het veroorzakende hrHPV-genotype van de ergste laesie in de zelfafname in 93,4%. HPV16 was het meest frequent gedetecteerde HPV type in de zelfafname en was ook het meest voorkomende causale genotype in CIN3+. Alle vrouwen met een door HPV16 veroorzaakte CIN3+ hadden ook een HPV16 positieve zelfafname. Er waren geen verschillen in de percentages FAM19A4/miR124-2 methylatiepositiviteit tussen laesies veroorzaakt door HPV16/18 (73,8% methylatiepositiviteit in CIN3+) en andere hrHPV-genotypen (66,7% methylatiepositiviteit in CIN3+).

## DEEL 2 - BIOMARKERS EXPRESSIEPATRONEN IN AIN

Klassieke H/E-interpretatie van biopten is onderhevig aan inter- en intra-waarnemer-variantie en geeft cellulaire transformatie niet weer, waardoor geavanceerde transformerende laesies met een hoger risico op progressie naar kanker niet kunnen worden onderscheiden van productieve infecties met een hogere kans op spontane regressie. Dit leidt allereerst tot verschillen in diagnose tussen pathologen, centra en klinische studies. Daarnaast kan dit leiden tot overbehandeling van vrouwen met productieve CIN en mannen en vrouwen met productieve AIN, welke geen behandeling nodig hebben. De behandeling van CIN geeft een risico op nadelige zwangerschapsuitkomsten. De behandeling van AIN is belastend voor de patiënt en er worden na behandeling veel terugkerende laesies gezien. Er zijn biomarkers die een onderscheid kunnen maken tussen productieve en transformerende laesies, waarvan een selectie van immunohistochemische markers werd gebruikt in sets van anale biopsieën in deel 2 van het proefschrift.

In hoofdstuk 5 hebben we immunohistochemische marker p16, een vervangende marker voor transformerende activiteit van het HPV E7-gen, en Ki-67, een marker voor celcyclusactiviteit, en de nieuwe marker HPV E4 die voltooiing van de productieve fase van de HPV-levenscyclus weergeeft, gebruikt om verschillende biomarker expressiepatronen in AIN-biopten te beschrijven. Biopten werden genomen uit het anale kanaal van mannen die seks hebben met mannen (MSM), en de meesten waren HIV-positief. We hebben het causale HPV-genotype van laesies geïdentificeerd met behulp van de SPF10 HPV-test en laser capture microdissection (LCM) wanneer er meerdere HPV-typen in het biopt aanwezig waren. Met behulp van de drie immunohistochemische markers konden we vier hoofdpatronen van biomarker-expressie identificeren: p16 negatief, E4 negatief, Ki-67 positief (p16-, E4- Ki-67+), passend bij vroege of genezende AIN1 (1); p16 negatief, E4 positief, Ki-67 positief (p16-, E4+, Ki-67+), passend bij mature productieve AIN1 (2); p16 positief, E4 positief, Ki-67 positief, (p16-, E4+, Ki-67+) passend bij productieve en vroeg transformerende infectie, meestal AIN2 (3); en ten slotte p16 positief, E4 negatief, Ki-67 positief (p16+, E4-, Ki-67+), passend bij een vergevorderde transformerende infectie, meestal AIN3 (4). Onze resultaten suggereerden dat de verdeling van laesies in LSIL en HSIL te simplistisch is en dat door p16 en Ki-67 te combineren met E4, productieve AIN-laesies kunnen worden onderscheiden van vergevorderde transformerende AIN.

De bevindingen uit hoofdstuk 5 lieten ons zien dat Ki-67 een nuttige marker is, meest bijdragend bij het maken van onderscheid tussen normaal weefsel en AIN1/LSIL. De belangrijkste verbetering van klinisch management zal echter het gevolg zijn van een betere identificatie van productieve LSIL en HSIL met een hogere kans op spontane re-

gressie, en deze laesies kunnen worden geïdentificeerd met alleen een combinatie van p16 en E4. In hoofdstuk 6 hebben we daarom een combinatie van E4 en p16 gebruikt om de definitie van lr- en hr-HPV-geassocieerde AIN bij HIV+ MSM te verbeteren. We hebben deze benadering vergeleken met de huidige LAST richtlijn, waarin p16 wordt gebruikt in een subset van laesies om deze te categoriseren als LSIL of HSIL. In onze studie werden de meest ernstige laesies gescoord voor p16 (scores 0-4), gebruikt om transformerende activiteit van HPV te identificeren, en E4 (scores 0-2) om HPV-productiviteit en voltooiing van de levenscyclus te identificeren. LAST diagnose vond 37 normale biopsieën, 55 LSIL en 91 HSIL. 92,6% van LSIL werd veroorzaakt door lrHPV en 92,4% van HSIL werd veroorzaakt door hrHPV. Geen enkel normaal biopt toonde E4; 41,8% van LSIL en 38,5% van HSIL waren E4-positief en er werden geen verschillen in E4-positiviteit gevonden tussen laesies veroorzaakt door lrHPV en hrHPV. De meeste laesies veroorzaakt door lrHPV toonden een patroon van uitgebreide vlekkerige p16-kleuring (89,5%). Uit onze resultaten hebben we geconcludeerd dat gecombineerde p16/E4 IHC zowel productieve als niet-productieve LSIL geassocieerd met lrHPV en HSIL geassocieerd met hrHPV identificeert en gedetailleerde informatie over AIN kan bieden. Deze informatie gaat verder dan het ondersteunen van H/E alleen. Het gebruik van p16/E4 kan mogelijk een meer selectieve behandeling van door hr-HPV veroorzaakte vergevorderde transformerende HSIL mogelijk maken, waardoor onnodige behandeling van productieve HSIL en lr-HPV-geassocieerde LSIL wordt voorkomen.

### DEEL 3 – BIOMARKER EXPRESSIEPATRONEN IN CIN

Het laatste deel van dit proefschrift richtte zich op hoe verschillende combinaties van biomarkers p16/E4 en methylatie markers FAM19A4/miR124-2 kunnen worden gebruikt om vrouwen met  $\geq$ CIN2/HSIL of met een verhoogd risico op  $\geq$ CIN2/HSIL te identificeren.

Hoofdstuk 7 beschrijft een cross-sectioneel onderzoek waarin de relaties tussen de immunohistochemische expressiepatronen van markers p16 en HPV E4 in biopten en methylatie markers FAM19A4/miR124-2 in cervicale uitstrijkjes van vrouwen met CIN en histologische normale, hrHPV positieve controles werd verkend. We onderzochten ook de relatie tussen het biomarker expressiepatroon in het biopt en de uitstrijk en de meest ernstige laesie die werd gevonden tijdens de behandeling van vrouwen middels een LEEP (loop electrosurgical excision procedure) of hysterectomie. De belangrijkste bevinding is dat er een omgekeerd verband is tussen HPV E4-expressie in een biopt en hypermethylering van markers FAM19A4/miR124-2 in het cervixuitstrijkje. Zowel p16 als methylatiepositiviteit nemen toe met de ernst van de laesie en identificeren neoplastische transformatie. De meeste HPV E4-positiviteit werd gevonden in laesies met

p16-expressie in het onderste 2/3 van het epitheel, wat suggereert dat er ook een rol is voor p16, een surrogaat marker van HPV E7-overexpressie, bij het stimuleren van de verhoogde epitheliale proliferatie die nodig is voor virale reproductie. Expressiepatronen bevestigen dat CIN1 en CIN2 zeer heterogene groepen zijn, bestaande uit productieve infecties die E4 tot expressie brengen en transformerende laesies die p16 tot expressie brengen, waarvan sommige methylatiemarkers positiviteit vertonen. Ons werk toont aan dat het gebruik van de E4 immunomarker en methylatie markers in deze groep meer gedetailleerde informatie zou kunnen bieden dan de huidige CIN-beoordelingspraktijk.

Ten slotte werden in hoofdstuk 8 de resultaten die in dit proefschrift zijn beschreven in een breder wetenschappelijk en maatschappelijk kader geplaatst. Hierbij worden verschillende factoren die van invloed zijn op de effectiviteit van screening en de incidentie van baarmoederhalskanker en anale kanker mee gewogen en werd bediscussieerd hoe de resultaten van dit proefschrift van belang zullen zijn in de huidige en een mogelijke toekomstige situatie.