

Biomerkers voor cervix kanker: voorkomen in het cervicovaginale vocht

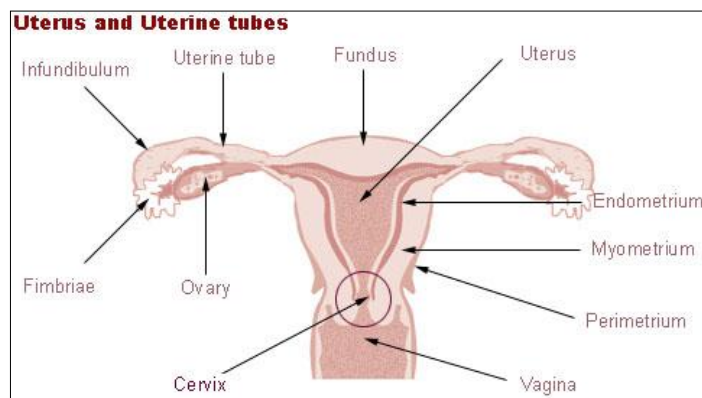
De Graeve Margot 20100881

UA; 1032FBDBMW: Bachelorproef; academiejaar 2013-2014

Baarmoederhalskanker, veroorzaakt door het humaan papillomavirus, is wereldwijd de tweede meest voorkomende vorm van kanker bij vrouwen. Ondanks preventieve screenings- en vaccinatieprogramma's worden er jaarlijks nog meer dan 450 000 nieuwe diagnoses vastgesteld. Om baarmoederhalskanker efficiënter te kunnen opsporen, is men op zoek naar alternatieve screeningsmethoden, zoals biomerkers analyseren uit het cervicovaginaal vocht. Biomerkers zijn meestal eiwitten die een indicatie geven over de fysiologische staat van een cel of weefsel. Een biomarker moet sensitief en specifiek zijn zodat fysiologische veranderingen vroegtijdig gedetecteerd kunnen worden. Door gebruik te maken van longitudinale stalen waarbij men de virustiter en het proteoom analyseert, werden er veertien eiwitten uit het cervicovaginale vocht gevonden welke mogelijks correleren met de virustiter. De literatuur van zeven van deze merkers wordt hier onderzocht naar hun link met het humaan papillomavirus, het cervixepitheel, baarmoederhalskanker of andere gynaecologische tumoren. Nadien zal verder onderzoek moeten uitwijzen of deze biomerkers ook effectief gebruikt kunnen worden bij de screening naar baarmoederhalskanker.

Inleiding

Baarmoederhalskanker (CC) is een gynaecologische kanker (figuur 1) (Kitchener, 1999). Met jaarlijks meer dan 450 000 nieuwe diagnoses en meer dan 275 000 sterfgevallen wereldwijd is het de tweede meest voorkomende kanker bij vrouwen. Daarnaast is het de vierde grootste doodsoorzaak van kanker bij datzelfde geslacht (Bodily en Laimins, 2011). Door een toegenomen blootstelling aan het hoog-risico humaan papillomavirus (hrHPV) en door een minder effectieve screening is de incidentie en het sterfterisico van baarmoederhalskanker groter in ontwikkelingslanden dan in de westerse wereld (Dijkstra et al., 2014).



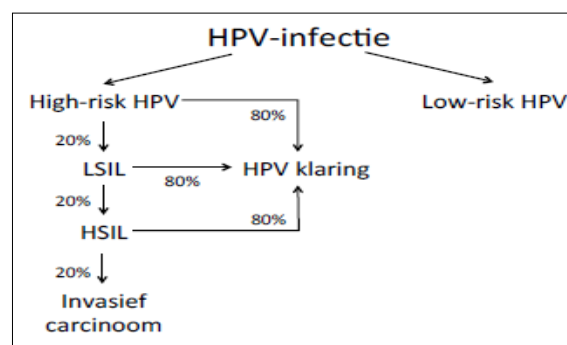
Figuur 1. Baarmoederhalskanker is een gynaecologische kanker. Andere gynaecologische tumoren zijn: ovariumcarcinomen (eierstokcarcinomen), eileidercarcinomen, uterus carcinomen, vulvacarcinomen en vaginale tumoren. Funduscarcinomen en endometriumcarcinomen worden mee ingedeeld bij de uterus carcinomen (baarmoedertumoren). Tumoren van het myometrium worden leiomyosarcomen genoemd, maar komen niet vaak voor. Folliculaire infundibulumcarcinomen zijn meestal basale celtumoren en behoren tot de eileidertumoren (www.healthbase.com).

De overdracht van het humaan papillomavirus (HPV) gebeurt voornamelijk via seksueel contact (Stanley, 2010). Zo zal wereldwijd 80% van de vrouwen ooit een infectie met HPV doormaken. Toch kan 40-70% van de geïnfecteerde vrouwen deze infectie subklinisch klaren. Dit wil zeggen dat het immuunsysteem de infectie zonder waarneembare symptomen uit het lichaam verwijdert (Erickson et al., 2013). Als een infectie langer dan 18 maanden aanhoudt, wordt deze persistent genoemd. Dit komt bij 10% van de geïnfecteerde vrouwen voor (Bodily en Laimins, 2011).

Papillomavirussen zijn kleine DNA-virussen zonder envelope die plaveiselepitheel of huidepitheel kunnen infecteren. Er zijn meer dan 120 verschillende HPV-types, waarvan 33% de genitale tractus als target heeft. De overige 67% heeft voornamelijk het huidepitheel als target. De groep virussen die de genitale tractus infecteert, kan ingedeeld worden in hoog-risico HPV-types en laag-risico HPV-types (lrHPV) (Bodily en Laimins, 2011). De lrHPV, voornamelijk HPV6 en HPV11,

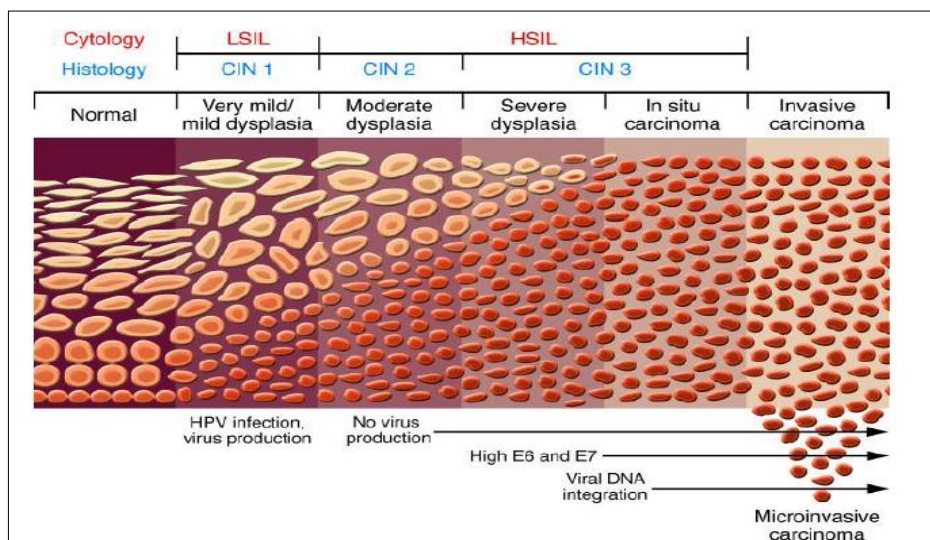
zullen genitale wratten veroorzaken terwijl hrHPV potentieel oncogeen is (Stanley, 2010). De twee belangrijkste types hrHPV: HPV16 en HPV18, zijn in 70% van de gevallen verantwoordelijk voor het ontstaan van een plaveiselcarcinoom in de baarmoederhals (Dijkstra et al., 2014). Om baarmoederhalskanker te ontwikkelen is er een persisterende hrHPV-infectie nodig, waarbij het virus voldoende virale oncoproteïnen produceert (Cuzick et al., 2008). E6 en E7 zijn hiervan de belangrijkste. E6 interageert met onder andere p53 en E7 met pRb (retinoblastomaproteïne). P53 en pRB zijn tumorsuppressoreiwitten die inwerken op de celcyclus en een negatieve invloed uitoefenen op de celdeling (Bodily en Laimins, 2011). Een tumorsuppressoreiwit is een eiwit dat door in te werken op één van de pathways die leidt tot kanker, ongelimiteerde celdeling voorkomt. Zo wordt het ontstaan van een tumor verhinderd (Biegling et al., 2014). E6 bindt en inhibeert p53 waardoor de celcyclus in de S-fase zal stoppen en apoptose vermeden wordt (Deligeoroglou et al., 2013). E7 bindt en inactieveert pRB met tumorgenese tot gevolg. Bij het proces van baarmoederhalskanker spelen E6 en E7 een rol in de maligne transformatie van het cervicale epitheel (Higareda-Almaraz et al., 2011).

Als een infectie niet direct geklaard wordt, kunnen er cervicale intra-epitheliale neoplasieën (CIN) ontstaan. Dit is een potentieel voorstadium van baarmoederhalskanker. Afhankelijk van de ernst van de dysplasie zijn er verschillende graden van laesie: CIN1, CIN2 en CIN3. Als de laesie voornamelijk in de onderste basale lagen van het epitheel gesitueerd is, spreekt men van CIN1 of een lage graad squameuze intra-epitheliale laesie (LSIL). Ondanks het relatief normale uitzicht van de cellen is er hierbij sprake van milde dysplasie. Ongeveer één derde van de cellen in de baarmoederhals zijn abnormaal. CIN1 wordt in 80% van de gevallen nog geklaard door het lichaam (figuur 2) (Martin-Hirsch en Wood, 2011).



Figuur 2. De infectie kan in alle stadia van het ziekteverloop nog geklaard worden uit het lichaam. HSIL: hoge graad squameuze intra-epitheliale laesie. LSIL: lage graad squameuze intra-epitheliale laesie (Van de Velde L., niet gepubliceerd).

Naarmate de laesie meer in de middelste tot bovenste epitheliale lagen van de cervix voorkomt, spreekt men van CIN2. Hierbij treedt matige dysplasie op, ongeveer twee derde van de cervixcellen zijn abnormaal. Bij CIN3, wanneer bijna alle cervixcellen abnormaal zijn, spreekt men van ernstige dysplasie. De cellen hebben een abnormaal uitzicht. Dit is een hoge graad squameuze intra-epitheliale laesie (HSIL). CIN1 kan bij een persisterende infectie met hrHPV verder ontwikkelen tot CIN2 en CIN3 en ten slotte tot een maligne cervixcarcinoom (figuur 3). Dit hele ontwikkelingsproces duurt meer dan tien jaar (Martin-Hirsch en Wood, 2011).



Figuur 3. De verschillende stadia vanaf een persisterende hrHPV infectie tot een invasief cervixcarcinoom. CIN: cervicale intra-epitheliale neoplasie. E6 en E7: de belangrijkste virale oncoproteïnen. HSIL: hoge graad squameuze intra-epitheliale laesie. LSIL: lage graad squameuze intra-epitheliale laesie (Lowy en Schiller, 2006).

Door de hoge prevalentie van HPV kunnen vrouwen zich laten screenen op het virus. Dit gebeurt meestal via een cytologisch uitstrijkje of een PAP-test (Papanicolaou test). Bij een uitstrijkje zoekt men naar afwijkende cellen in het slijmvlies van de overgangscervix (Baker, 2013). Als het resultaat negatief is, moet er pas na drie jaar een nieuw uitstrijkje afgenomen worden. Als er toch afwijkende cellen aanwezig zijn (LSIL), wordt er binnen het jaar een nieuw uitstrijkje opgevraagd. Omdat het lichaam het virus zelf kan klaren zal het tweede uitstrijkje in 80% van de gevallen weer normaal zijn (figuur 2). Als er echter sprake is van HSIL, zal de patiënt direct worden doorverwezen naar een gynaecoloog. Die zal de patiënt verder opvolgen door middel van een colposcopie. Verder zal hij een genotypering van het virus uitvoeren door middel van een PCR-test. Colposcopie is een gynaecologische onderzoekstechniek waarbij de baarmoedermond wordt onderzocht met een tien tot twintig maal vergrotende camera. Hierdoor worden ook kleine afwijkingen makkelijk gezien en kan indien nodig het beschadigde weefsel preventief worden gebiopteerd (Lowy et al., 2008). Door het invoeren van deze screening is er een sterke daling in het aantal cervixcarcinomen opgetreden. Desondanks zijn valse negatieve resultaten geen uitzondering, waardoor vrouwen na screening toch nog baarmoederhalskanker kunnen ontwikkelen. Als verklaring wordt de verminderde sensitiviteit van de PAP-test voor de detectie van CIN2 en CIN3 gegeven. Deze is namelijk maar 53,0% ten opzichte van andere HPV-DNA-testen met een sensitiviteit van 96,1% (Cuzick et al., 2006).

Voor vrouwen die nog nooit met hrHPV besmet zijn geweest, bestaan er tegenwoordig twee vaccins ter preventie van baarmoederhalskanker: Gardasil® (Merck) en Cervarix® (GlaxoSmithKline) (Han en Sin, 2013). Deze vaccins hebben een doeltreffendheid van meer dan 99%, maar zijn enkel behulpzaam als vrouwen, welke nog nooit met HPV zijn geïnfecteerd, worden ingeënt. Vandaar dat men het vaccin toedient nog voor hun eerste seksuele contact (Armstrong, 2010). Verder geven de huidige vaccins enkel bescherming tegen HPV16 en HPV18 en niet tegen andere types. De nood aan alternatieve screeningsmethoden die een hogere sensitiviteit voor baarmoederhalskanker hebben, blijft dus bestaan. Het gebruik van biomerkers uit het cervicovaginaal vocht (CVV) wordt daarom overwogen als sensitief en gebruiksvriendelijk alternatief voor het uitstrijkje.

Bekomen biomerkers en hun p-waarde

Biomerkers uit het cervicovaginaal vocht

Biomerkers zijn meestal eiwitten die een indicatie geven over de biofysiologische staat waarin een cel of weefsel verkeert. Zo kan er een onderscheid gemaakt worden tussen verschillende fysiologische condities in een bepaald (ziekte)proces (Silberring en Ciborowski, 2010). Een biomarker moet zeer sensitief en specifiek zijn. Sensitiviteit van een test wil zeggen dat zieke patiënten door de test ook als ziek worden aangeduid. Het zijn het aantal baarmoederhalskankerpatiënten met een verhoging van expressie van een merker ten opzichte van alle baarmoederhalskankerpatiënten in de populatie. Specificiteit van een test wordt verklaard als het aantal niet zieke personen met een negatieve test voor deze merkers ten opzichte van alle gezonde personen in de populatie. Het zijn dus personen die niet ziek zijn en ook zo door de test worden aangeduid. Verder moet het aantal valse positieve resultaten in een studie met de merker laag zijn. Valse posities zijn personen die gezond zijn maar door de test toch incorrect als ziek worden geïdentificeerd (Tambor et al., 2010).

De biomerkers in deze literatuurstudie zijn afkomstig uit het cervicovaginaal vocht dat is verzameld via een lavage tijdens de colposcopie. Omdat CVV in direct contact staat met het cervixepitheel zal het proteoom specifiek en minder complex zijn dan bij biomerkers die verkregen zijn via bloedafname. Bovendien is het volume dat via een lavage verkregen wordt kleiner dan dat van bloedplasma, waardoor de proteïnen minder verdund worden. Een nadeel van het gebruik van biomerkers uit het CVV is wel dat deze onderhevig kunnen zijn aan grote inter- en intra-individuele variabiliteit door infecties, leeftijd, hormonale veranderingen tijdens de menstruele cyclus of het gebruik van anticonceptiva (Zegels et al., 2009). Het cervicovaginaal vocht heeft als doel om de genitale tractus te beschermen tegen verschillende micro-organismen. Het CVV heeft dan ook een rol als eerste natuurlijke verdedigingsbarrière (Cole, 2006).

Om nieuwe biomerkers voor baarmoederhalskanker te ontdekken wordt gebruik gemaakt van longitudinale stalen van het CVV. Dit zijn minimaal drie stalen van CVV die van éénzelfde persoon afkomstig zijn, maar gespreid in de tijd worden afgenomen. De opeenvolgende stalen werden afgenomen bij vijftien vrouwen waarbij een afwijkend gynaecologisch onderzoek is vastgesteld. De vrouwen werden halfjaarlijks tot jaarlijks opgevolgd door middel van een colposcopie waarbij telkens een lavage werd uitgevoerd die kan gebruikt worden voor proteoomanalyse. Via deze vorm van staalafname kan men een verband zoeken tussen de proteïne-identificatie enerzijds, en het al dan niet aanwezig zijn van een HPV-infectie, de graad van de HPV-infectie, het HPV-genotype, de cytologie van het weefsel en de latere klaring of persistentie van de infectie anderzijds. Door gebruik te maken van longitudinale stalen zal de inter-individuele variatie binnen de stalen uitgesloten worden. Van elk staal wordt de virustiter door PCR bepaald. Zo kan men op basis van de veranderingen in virustiter een beeld krijgen van het type en verloop van een HPV-infectie. Uit het onderzoek blijkt dat er zowel multiple- als single infecties met een al dan niet wisselend HPV-genotype kunnen optreden. Bij patiënten waarbij het eerste staal positief en het laatste staal negatief is voor een HPV-infectie spreekt men over klaring. Als een infectie met één bepaald genotype over verschillende opeenvolgende stalen terugkomt, spreekt men bij die patiënt over een persistentere infectie van dat genotype. Patiënten met wisselende infecties van verschillende genotypes en met zeer schommelende virustiters worden transiënte patiënten genoemd. Buiten de virustiter worden er ook gemiddeld 173 proteïnen per patiënt geïdentificeerd door proteoomanalyse. In de studie worden in totaal 2419 eiwitanalyses uitgevoerd, waarbij 443 unieke eiwitten gevonden worden. Er wordt een indeling gemaakt van de patiënten/stalen door te kijken naar het verloop van de HPV-infectie, de aan-/afwezigheid van de infectie, de cytologie (normaal/LSIL/HSIL/cervixcarcinoom) en de oncogeniciteit van de hrHPV-genotypes. Verder wordt er gekeken naar het verloop van de verschillende proteïnen in de verschillende stalen: stijgend, dalend of constant aangezien een stijgende of dalende expressie van een bepaald eiwit zou kunnen correleren met een bepaalde cytologische conditie (Van de Velde L., niet

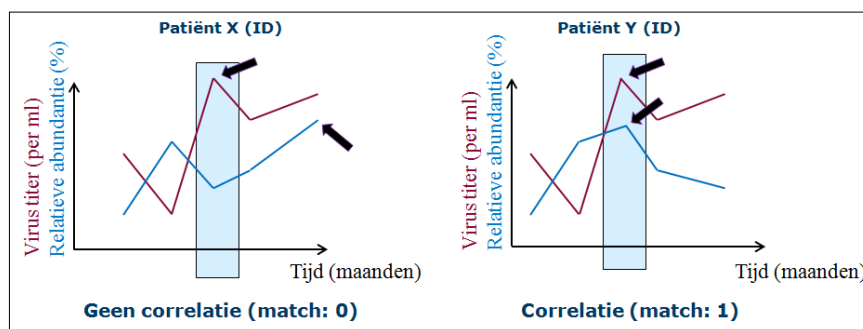
gepubliceerd). Van de 443 eiwitten worden deze die bij meer dan één van de vijftien patiënten voorkomen gegroepeerd en gegevens worden verzameld. Van deze eiwitten wordt, op basis van de iTRAQ-gegevens uit de proteoomanalyse, in elk longitudinaal staal de relatieve abundantie, in procent, berekend. Dit is de relatieve concentratie van het eiwit op een bepaald tijdstip. Daarnaast wordt ook bij elke patiënt en in elk staal de virale load (viruspartikels per ml) gemeten. De volgende stap van de analyse is het onderzoeken van het al dan niet aanwezig zijn van een match, op een gemeenschappelijk tijdstip, tussen de maximale relatieve abundantie van een bepaald eiwit enerzijds en de maximale virale load anderzijds (tabel 1). Als beide op hetzelfde tijdstip maximaal zijn spreekt men van een match en is er een onderlinge correlatie tussen het eiwit en het virus (figuur 4) (Van Ostade X., niet gepubliceerd).

Tabel 1. Match tussen virale load en maximale relatieve abundantie bij één bepaald eiwit (PSME1)

ID	value	gene.short	maxABday	viralload	maxVLday	match?
1 (Y)	1,8	PSME1	t4	454	t4	1
7 (Y)	1	PSME1	t0	415,2452	t0	1
8 (Y)	1,2	PSME1	t1	100045	t1	1
10 (X)	3,8	PSME1	t4	3479	t5	0
11 (Y)	1	PSME1	t0	631	t0	1
13 (Y)	3,9	PSME1	t1	110	t1	1
15 (Y)	4,8	PSME1	t1	10003	t1	1
nMatch						6

In de tabel worden de gegevens van alle patiënten waarbij PSME1 in het cervicovaginaal vocht is terug gevonden, verzameld. Deze patiënten worden opgesomd in de kolom ID. De value geeft per patiënt de maximale relatieve abundantie weer: value 1 = 100%. Verder wordt er door de maxABday het tijdstip weergegeven waarop de relatieve abundantie maximaal is. De maxABday wordt uitgedrukt ten opzichte van het aantal longitudinale stalen per persoon. Tussen de afname van stalen zit gemiddeld een half jaar tijd en het eerste staal wordt weergegeven als tijdstip nul (t0). De virale load wordt ook weergegeven in partikels/ml. Het tijdstip waarop het aantal viruspartikels het hoogst is, wordt weergegeven door de maxVLday. Als de virale load enerzijds, en de relatieve abundantie anderzijds, op het zelfde tijdstip maximaal zijn spreekt men van een match. Match=1. Dit is het geval bij patiënten: 1, 7, 8, 11, 13 en 15. Bij patiënt 10 vallen deze tijdstippen niet samen en is er dus geen sprake van een match. Match=0 (zie ook figuur 4). Voor PSME1 werden er in totaal 6 matches gevonden bij de patiënten uit de studie (Bewerking van Van Ostade X., niet gepubliceerd).

Enkel de eiwitten die bij verschillende patiënten een match vertonen, worden verder in het onderzoek meegenomen. Om deze groep eiwitten nog te reduceren wordt er een tweede statistisch onderzoek uitgevoerd (tabel 2) (Van Ostade X., niet gepubliceerd).



Figuur 4. Als de virale load enerzijds, en de relatieve abundantie anderzijds, op het zelfde tijdstip maximaal zijn spreekt men van een match. Match=1. Dit is het geval bij patiënt Y. Bij patiënt X vallen deze tijdstippen niet samen en is er dus geen sprake van een match. Match=0. De virale load of de virustiter geeft het aantal viruspartikels per ml weer. De relatieve abundantie wordt uitgedrukt in procent en geeft de eiwitconcentratie op elk tijdstip weer. De longitudinale stalen werden halfjaarlijks afgenomen dus de tijd wordt in maanden uitgedrukt. De pijlen geven het tijdstip aan waarop de virustiter en de relatieve abundantie maximaal zijn en de blauwe kader geeft het tijdstip aan waarop de virale load maximaal is (Bewerking van Van Ostade X., niet gepubliceerd).

Berekening van de p-waarde

Maar is het aantal bekomen matches per eiwit wel hoog genoeg om niet over toeval te spreken? Dit wordt onderzocht via een statistische analyse. De analyse wordt voor elk van de eiwitten in de gereduceerde groep uitgevoerd. Het aantal longitudinale stalen per patiënt wordt hiervoor ook in rekening gebracht (tabel 2 en tabel 3) (Van Ostade X., niet gepubliceerd).

Tabel 2. Totaal aantal stalen per patiënt waarbij de maximale load voor PSME1 wordt weergegeven

Tijdstip	ID1	ID7	ID8	ID10	ID11	ID13	ID15	totalcomb
t0	0	1	0	0	1	0	0	22680
t1	0	0	1	0	0	1	1	
t2	0	0	0	0	0	0	0	
t3	0	0		0			0	
t4	1			1			0	
t5				0			0	
t6				0				

De patiënten zijn dezelfde als in tabel 1. Op deze tabel wordt het aantal afgenomen stalen weergegeven. Het minimum aan stalen per persoon is drie. Door middel van 0/1 wordt het tijdstip waarop de relatieve abundantie van PSME1 maximaal is, weergegeven. Het aantal mogelijke combinaties tussen tijdstippen van maximale abundantie per patiënt wordt aangeduid met de totalcomb. Deze is bekomen door het aantal longitudinale stalen per patiënt te vermenigvuldigen met elkaar. ($5 \times 4 \times 3 \times 7 \times 3 \times 3 \times 6 = 22680$). Dit is het voorbeeld met PSME1, deze analyse werd ook voor de andere eiwitten uitgevoerd (Bewerking van Van Ostade X., niet gepubliceerd).

Via een daaropvolgende statistische analyse wordt nagekeken hoeveel keer een bepaald aantal matches (0-7) kan voorkomen bij een willekeurige verdeling van de tijdstippen met hoogste virustiter ten opzichte van de vastgestelde tijdstippen met hoogste eiwitabundantie. Deze waarden zijn voor elk eiwit verschillend aangezien elk eiwit kan voorkomen in (gedeeltelijk) andere patiënten die elk op zich ook nog een verschillend aantal tijdstippen hebben waarop de stalen werden gecollecteerd. De volgende stap is het delen van de kans op het gevonden aantal matches per eiwit door de totalcomb. Dit geeft de p-waarde (fraction) weer voor dat eiwit. De p-waarde is een maat voor de waarschijnlijkheid dat het gevonden resultaat berust op toeval. De p-waarde geeft weer of de nulhypothese ten onrechte is verworpen en de resultaten van de gevonden biomerkers dus in werkelijkheid op toeval gebaseerd zijn. Toch wordt deze p-waarde niet gebruikt in het verdere onderzoek. Men werkt namelijk met de cumulatieve waarde. Dit is de p-waarde waarbij zowel rekening wordt gehouden met de fraction van het aantal bekomen matches voor dat eiwit enerzijds en de kans op meer matches voor dat eiwit anderzijds. Door deze berekeningen kan het aantal gevonden eiwitten nog gereduceerd worden, want enkel eiwitten met een significante cumulatieve p-waarde ($\leq 0,05$) worden verder onderzocht. Aan de hand van hun significantie werden er veertien biomerkers gevonden die hier worden besproken. Een voorbeeld van een statistische analyse wordt gegeven aan de hand van PSME1. Dit proces werd voor alle biomerkers uitgevoerd. De cumulatieve p-waarde wordt steeds vermeld bij de bespreking van de biomarker (tabel 3) (Van Ostade X.; niet gepubliceerd).

Tabel 3. De (cumulatieve) p-waarde voor PSME1 bij zes matches.

Var1	Freq	fraction	cumul
0	2880	0,1269841	1
1	7056	0,3111111	0,8730159
2	7216	0,3181658	0,5619048
3	3984	0,1756614	0,243739
4	1280	0,0564374	0,0680776
5	239	0,0105379	0,0116402
6	24	0,0010582	0,0011023
7	1	4,409E-05	4,409E-05
Sum	22680		

In tabel 1 en 2 werd er al aangetoond dat er voor PSME1 zes matches zijn gevonden en dat er 2880 mogelijkheden zijn om een maximale relatieve abundantie te verkrijgen. Tabel 3 geeft de relatie tussen voorgaande gegevens weer. Door de kans op een aantal matches (freq) te delen door de totalcomb wordt de p-waarde (fraction) berekend. PSME1 heeft zes matches dus heeft een fraction van 0,0010582 ($24/22680$). Omdat men werkt met de cumulatieve p-waarde wordt de kans op zes of meer matches nog bij de fraction geteld. Als er zeven matches zijn, zijn er natuurlijk ook zes (Bewerking van Van Ostade X.; niet gepubliceerd).

PSME1 (cumulatieve p-waarde: 0,001)*Biologische functie*

Het proteasoom activator complex 1 (PSME1 of PA28) is opgebouwd uit 3 subunits: α , β en γ . Het speelt een rol bij de MHC-klasse-I antigeen aanbieding en zal de snelheid van de hydrolytische reactie van het proteasoom verhogen. Hierdoor komen er op korte tijd meer epitopen vrij die kunnen worden aangeboden aan de cytotoxische T-cellen (Ossendorp et al., 2005).

PSME1 als kankerbiomarker

Er is nog geen verband tussen PSME1 en baarmoederhalskanker aangetoond, echter wel al tussen PSME1 en eierstokkanker (OVC). Daar onderdrukt PSME1 de detectie van de tumor door het immuunsysteem (El et al., 2010). PSME1, met name het terminaal fragment van de α -subunit, kan gebruikt worden als biomarker bij de opsporing van de verschillende fasen van eierstokkanker. De merker, die geanalyseerd werd via MALDI (een vorm van massaspectrometrie), heeft een prevalentie van 80,5% voor stadium I van OVC (tumor enkel in de eierstok) en een prevalentie van 81,3% voor stadium III-IV (tumor is uitgezaaid buiten de pelvis, met mogelijke metastasen op de lever). Bij een herhal van de patiënt voor OVC is de prevalentie van PSME1 zelfs 88%. De grootte van de tumor hangt ook samen met de aanwezigheid van de hoeveelheid PSME1 (Spirina et al., 2010). De merker heeft een epitheliale cellocatie en komt bij maligne cellen vooral voor in het cytoplasma, terwijl het eiwit bij gezonde cellen terug te vinden is in de kern. Dit kon aangetoond worden via een immunohistochemische kleuring (Longuespee et al., 2012).

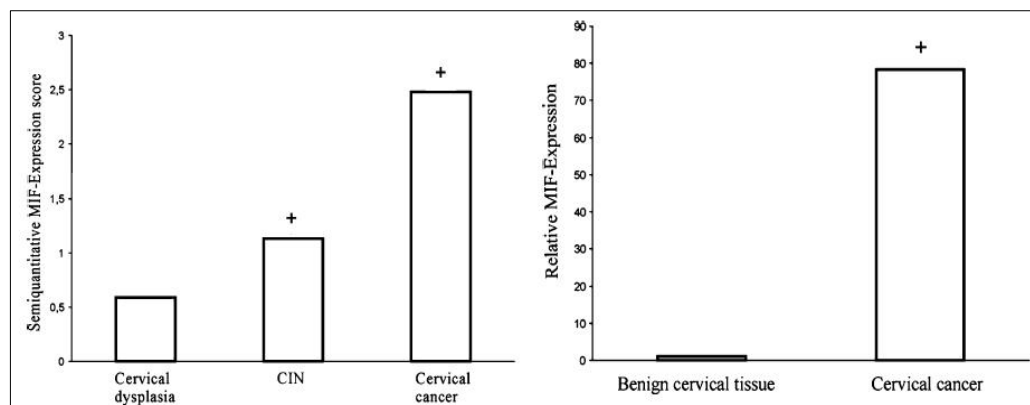
MIF (0,010)

Biologische functie

De macrofaag migratie inhibitie factor (MIF) is een glycoproteïne dat voornamelijk geproduceerd wordt door monocyten/macrofagen. Niet enkel cellen van het immuunsysteem kunnen MIF vrijstellen, ook endotheel-, epitheel- en endocriene cellen hebben deze capaciteit (Grieb et al., 2010). MIF heeft verschillende functies, zo is het een pro-inflammatoir cytokine dat betrokken is bij de aangeboren immuunrespons. MIF komt dus vooral tot expressie op de plaats van inflammatie. Het zal daar de macrofaag sturen in haar functies zoals fagocytose, aanhechting, verspreiding, metabolisatie en productie van andere cytokines. MIF heeft buiten een immunologische en inflammatoire functie ook nog een rol in de celproliferatie en differentiatie bij de wondheling. Het is ook betrokken bij de embryonale ontwikkeling (Babu et al., 2012).

MIF als kankerbiomarker

MIF werd reeds gekoppeld aan verschillende soorten kankers zoals deze van de maag, darm, long, prostaat, eileider en baarmoederhals (Babu et al., 2012). Bij een persoon met baarmoederhalskanker zal MIF een toegenomen expressie vertonen, terwijl deze expressie bij een gezonde persoon laag tot afwezig zal zijn (figuur 5 links). Met een histochemische kleuring kan de expressie van MIF in cervicale dysplasie, cervicale intra-epitheliale neoplasie (CIN) en cervicale carcinomen procentueel worden weergegeven. De expressie van MIF zal toenemen naarmate het ontwikkelingsproces van kanker vordert (figuur 5 rechts) (Krockenberger et al., 2010).



Figuur 5. Links: MIF-expressie in cervicale dysplasieën, CIN en cervicale carcinomen. Score 0: geen expressie, score 1: zwakke expressie, score 2: gemiddelde expressie en score 3: sterke MIF expressie (Krockenberger et al., 2010). Rechts: de MIF-expressie vergeleken tussen baarmoederhalskankerweefsel en normaal baarmoederhalsweefsel. Er is een hogere expressie in het kankerweefsel (Krockenberger et al., 2010).

MIF heeft verschillende directe en indirecte effecten op een tumor. Zo speelt het een rol bij de interactie met p53 en p21, tumorgroei, angiogenese en het ontstaan van hypoxie (Babu et al., 2012).

Een eigenschap van een tumor is dat deze ongecontroleerd kan delen. De controle op celdelingen en het induceren van apoptose gebeurt normaal gezien door p21 en p53. De overexpressie van MIF leidt tot een vermindering in expressie van p21 en p53. Hierdoor zal de apoptose die normaal door p53 wordt geïnduceerd niet op gang komen en blijft de baarmoederhals tumor ongecontroleerd verder delen (Grieb et al., 2010). Bij een overexpressie van MIF zal de tumor dus een proliferatief voordeel ondervinden (Xiao et al., 2011).

Door de snelle groei van de cervicale tumor zal er hypoxie ontstaan waardoor de transcriptie van hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) zal toenemen. HIF-1 induceert expressie van genen zoals die van erythropoëetine (EPO), GLUT-transporters, vasculaire endotheliale groeifactor (VEGF) en MIF. Door middel van een positief feedbackmechanisme zal overexpressie van MIF op zijn beurt ook weer een stijging in expressie van HIF-1 induceren. Onder normale omstandigheden heeft p53 als effect dat HIF-1 wordt gedegradeerd. Echter, omdat MIF de activiteit van p53 zal reduceren, blijft de expressie van HIF-1 toch hoog. Deze hoge HIF-1- en MIF-expressie beïnvloeden ook de angiogenese van de tumor. Beide factoren zullen de transcriptie van

VEGF'en doen stijgen waardoor angiogenese kan ontstaan die de hypoxie in de cervicale tumor zal reduceren (Babu et al., 2012).

MIF is een goede biomarker voor de diagnose van baarmoederhals- en andere tumoren, omdat MIF in alle grote stadia van kanker voorkomt. MIF speelt dan ook een belangrijke rol in de groei, proliferatie, angiogenese en metastase van de tumor. Het zou dus een goed target kunnen zijn bij een kankerbehandeling (Babu et al., 2012).

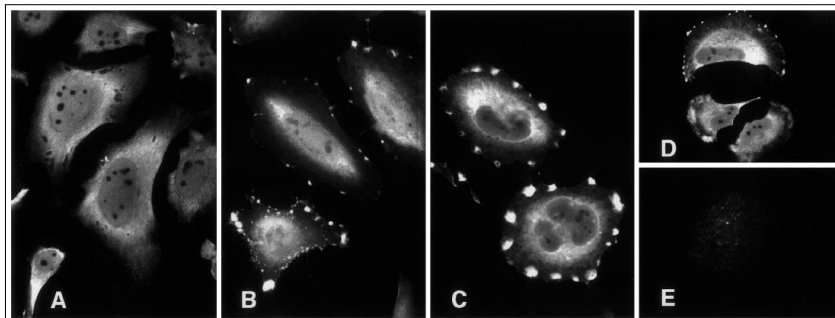
S100A6 (0,016)

Biologische functie

Bij een gezond persoon zal S100A6 of calyculine functioneren als een calciumsensor en modulator. Calyculine draagt ook bij in de reorganisatie van het actinecytoskelet van de cel (Lesniak et al., 2009). Het eiwit wordt in hoge concentraties tot expressie gebracht door epitheliale cellen waarbij veel differentiatie optreedt en die een hoge proliferatieve activiteit hebben (Nowotny et al., 2000).

S100A6 als kankerbiomarker

Het S100A6-gen heeft een calyclusafhankelijke expressie. Het gen heeft een maximale expressie tijdens de transitie naar de G0-fase in de celcyclus (Nowotny et al., 2000). S100A6 heeft een belangrijke functie bij de celgroei, proliferatie en metastase. Via ELISA, een enzyme immunoassay techniek, werd namelijk aangetoond dat calyculine in competitie kan treden met p300 (Graczyk et al., 2013). p300 reguleert de p53-afhankelijke apoptose na DNA-schade bij kanker. Omdat calyculine de bindingsplaats voor p300 bezet, zal p53 geïnactiveerd worden waardoor de apoptose niet doorgaat (Iyer et al., 2004). In tumorcellen speelt calyculine ook een rol bij de Ca^{2+} -homeostase. Er is al een verband aangetoond met borst-, huid- en pancreaskanker (Lesniak et al., 2009). Voor baarmoederhalskanker is enkel de locatie van S100A6 in HeLa-cellen al aangetoond. Calyculine is daar aanwezig in het celcytoplasma, met afnemende mate naar de periferie van de cel. Door immunofluorescentie werd aangetoond dat er bij stijgende Ca^{2+} -concentraties een herlokalisatie van calyculine optreedt naar vesikelstructuren in het plasmamembraan. Als de Ca^{2+} -concentratie daarna terug daalt, zal ook het verspreidingspatroon van S100A6 weer normaliseren (figuur 6) (Mueller et al., 1999).



Figuur 6. De immunolokalisatie van S100A6 bij HeLa cellen. A: normale Ca^{2+} -concentratie. B-D: toegenomen Ca^{2+} -concentratie met herlokalisatie naar de vesikels bij verschillende vergrotingen. E: negatieve controle met anti-S100A6 serum (Mueller et al., 1999).

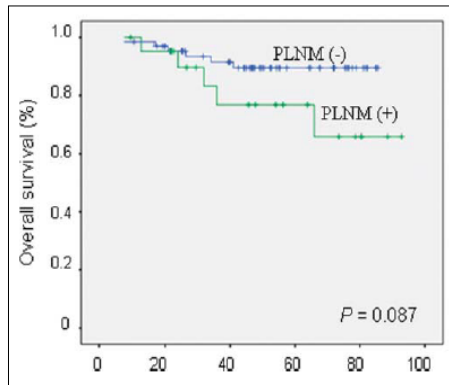
LDHA (0,017)

Biologische functie

Lactaat dehydrogenase A (LDHA) is het enzyme dat de laatste stap van de anaerobe glycolyse verzorgt. Het katalyseert daar de omzetting van pyruvaat en NADH tot lactaat en NAD^+ , waarna NAD^+ kan hergebruikt worden (Fan et al., 2011). LDHA komt voornamelijk voor in skeletspierweefsel, terwijl in hartspierweefsel lactaat dehydrogenase B (LDHB) aanwezig is. LDHB zet lactaat om in pyruvaat, dat dan verder geoxideerd wordt (Le et al., 2010).

LDHA als kankerbiomarker

Kankercellen verbruiken meer glucose dan normaal. Hierdoor delen ze sneller en zal er hypoxie ontstaan. Omdat de promotors van de LDHA genen een bindingsplaats hebben voor HIF-1, zal de transcriptie van deze genen onder deze omstandigheden toenemen (Semenza et al., 1996). Zo wordt de snelheid van de tumorgroei gereguleerd via de NADH/NAD⁺ balans (Le et al., 2010). Er is een verhoogde expressie van LDHA bij gynaecologische kankers (Koukourakis et al., 2009). LDHA wordt ook gebruikt als één van de elf markers bij de detectie van pelvische lymfekliermetastasen (PLNM) bij baarmoederhalskanker. Deze detectie gebeurt via gelelektroforese. De elf markers hebben een accuraatheid van 91%, een sensitiviteit van 90,9% en een specificiteit van 93,3% voor het voorspellen van metastases. Bij patiënten met een toegenomen concentratie aan deze elf markers zal de kans op sterfte ook hoger zijn. Deze resultaten worden weergegeven via een statistische test, de Kaplan-Meier analyse (figuur 7). De Kaplan-Meier analyse laat de overlevingskans van de patiënten zien, maar houdt er ook rekening mee dat niet alle patiënten op hetzelfde moment aan de studie zijn begonnen en dat niet alle patiënten de studie hebben afgemaakt. Dit kan zijn door sterfte van de patiënt, of omdat patiënten om welke reden dan ook uit de studie zijn gestapt. Dit wil zeggen dat de patiënten niet allemaal het gewenste einddoel van de studie bereiken. Het einddoel is in dit geval het krijgen van PLNM bij baarmoederhalskanker. De Kaplan-Meier analyse wordt ook wel de overlevingsanalyse genoemd (Huang et al., 2011).



Figuur 7. Baarmoederhalskankerpatiënten met pelvische lymfekliermetastasen (PLNM) waarbij de elf merkers aanwezig zijn (PLNM+), waaronder LDHA, hebben een verminderde overlevingskans dan patiënten zonder deze merkers (PLNM-). Deze resultaten worden aangetoond door middel van een Kaplan-Meier analyse (Huang et al., 2011).

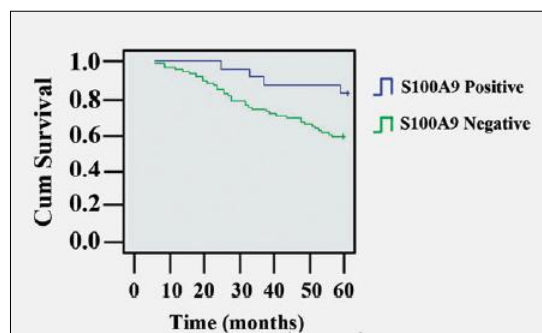
S100A9 (0,023)

Biologische functie

Calgranuline B of S100A9 is een Ca^{2+} -bindingseiwit dat een belangrijke rol speelt in de regulatie van inflammatoire processen en bij de aangeboren immuunrespons. Bij de aangeboren immuunrespons is het eiwit voornamelijk belangrijk voor de neutrofielen. Het zal de chemotaxis induceren, fagocytose stimuleren en de degranulatie van de neutrofielen regelen. De inflammatoire taken zijn vooral het aantrekken van leukocyten, cytokineproductie stimuleren en de adhesie van leukocyten bevorderen (Qin et al., 2010).

S100A9 als negatieve kankerbiomarker

S100A9 komt vooral voor in de nucleus van de cervixcel, maar is ook terug te vinden in het cytoplasma. Via immunohistochemische kleuring werd aangetoond dat de expressie van S100A9 gradueel afneemt van normaal baarmoederhalsweefsel naar CIN en naar een carcinoom. Zo bedraagt de expressie van S100A9 bij CIN1 80,0%, bij CIN2 77,4%, bij CIN3 27,3% en bij een cervixcarcinoom nog maar 20,2%. De expressie in normaal baarmoederhalsweefsel bedraagt 100% (Zhu et al., 2013a). Patiënten met een negatieve kleuring voor S100A9 hebben ook een verminderde vijf jaar overlevingskans dan patiënten met een positieve kleuring (figuur 8) (Zhu et al., 2013b). S100A9 is dus een negatieve biomarker voor baarmoederhalskanker, want het hebben van deze merker zorgt voor een positief effect op het verloop van het ziekteproces.



Figuur 8. De vijf jaar overlevingskans bij patiënten met baarmoederhalskanker stijgt bij de aanwezigheid van S100A9 (S100A9+). Deze resultaten worden aangetoond door middel van een Kaplan-Meier analyse (Zhu et al., 2013b).

Bij de aanwezigheid van S100A9 is er een verminderde kans op PLNM. Dit komt omdat S100A9 de celmotiliteit gedeeltelijk onderdrukt waardoor de tumor minder invasief wordt. S100A9 onderdrukt de werking van matrixmetalloproteases (MMP's), eiwitten die betrokken zijn bij de degradatie van het basaal membraan van de cellulaire matrix. Deze degradatie tegengaan, is een belangrijke stap bij vertraging van infiltratie en metastasering van tumorcellen in het omliggende weefsel. MMP's zijn ook belangrijk bij de tumorgroei omdat het de proliferatie van capillaire endotheliale cellen induceert en zo de vorming van angiogenese stimuleert. De aanwezigheid van S100A9 zorgt dus voor een vermindering in tumorgroei en metastase (Qin et al., 2010).

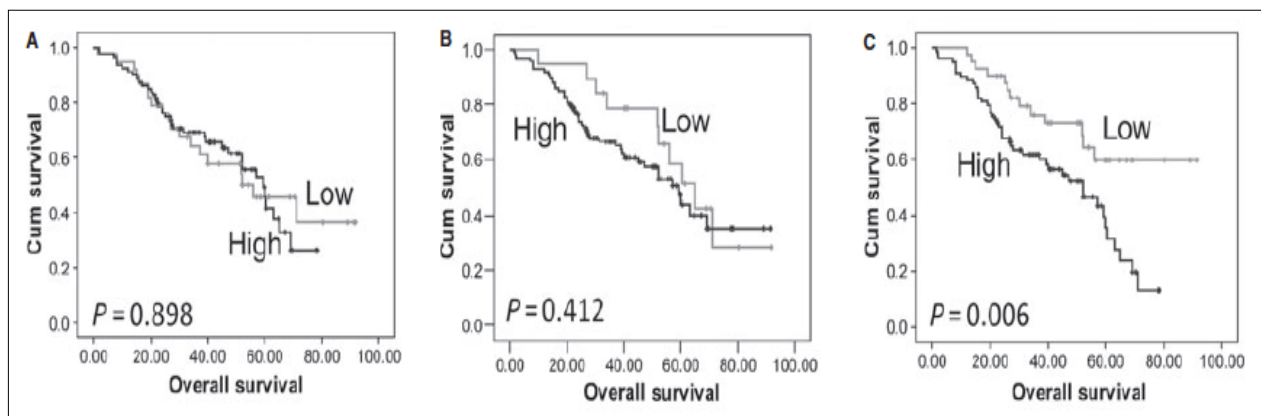
ICAL (0,025)

Biologische functie

Calpastatine (ICAL) is een specifieke endogene inhibitor van calpain I en II, calcium-afhankelijke cysteine proteases. In de aanwezigheid van calcium zal ICAL aan een calpain binden en zijn protease-activiteit inhiberen. Calpains hebben een functie bij signaaltransductie, differentiatie en de regulatie van genexpressie (Salehin et al., 2010). Calpastatine, calpain I en calpain II vormen samen het calpain systeem. Dit systeem speelt een rol in verschillende processen zoals apoptose, necrose en ischemie (Salehin et al., 2011).

ICAL als kankerbiomarker

Het verband tussen ICAL en baarmoederhalskanker is nog niet bewezen, maar al wel voor ICAL en endometriumkanker (EC), eierstokkanker en borstkanker. Via immunohistochemische kleuring werd aangetoond dat het calpain systeem is gelokaliseerd in het cytoplasma van de eierstokkercellen. Toch is er specifiek voor calpastatine een verhoogde nucleaire aankleuring. Eierstoktumoren vertonen een verhoogde expressie van het calpain systeem, dus zowel van calpastatine, calpain I en calpain II. Omwille van resistentie is verhoogde calpain II expressie nadelig voor de behandeling van tumoren door middel van platinum chemotherapie, de meest gebruikte therapie voor eierstokkanker. Eierstokkankerpatiënten met een hoge expressie van calpain II hebben ook een verminderde overlevingskans (figuur 9). Calpastatine en calpain I hebben geen invloed op de overlevingskans (Storr et al., 2012).



Figuur 9. De rol van calpain I, calpain II en calpastatine op de overlevingskans bij patiënten met eierstokkanker. A: een hoge of lage concentratie calpastatine heeft geen invloed op de overlevingskans. B: een hoge of lage concentratie calpain I heeft geen invloed op de overlevingskans. C: een hoge concentratie aan calpain II heeft een sterke daling in de overlevingskans tot gevolg. Deze resultaten worden aangetoond door middel van een Kaplan-Meier analyse (Storr et al., 2012).

Net zoals bij OVC is er ook bij endometriumkanker een verband gevonden met de expressie van calpastatine. Via een immunohistochemische kleuring werd een verhoogde expressie van calpastatine aangetoond ten opzichte van het benigne endometriumweefsel. De verhoogde expressie is niet gecorreleerd met het stadium waarin de tumor zich bevindt. Calpain I en II hebben geen invloed op het ontwikkelen van endometriumkanker. Toch zal hun expressie evenredig verlopen met de expressie van calpastatine (Salehin et al., 2010).

CYTB (0,036)

Biologische functie

Cystatine B (CYTB) is een cysteine protease-inhibitor (Lee et al., 2008). CYTB zal zo het lekken van intracellulaire cysteineproteases uit de lysosomen tegengaan (Gashenko et al., 2013).

CYTB als kankerbiomarker

Tumorcellen secreteren zowel proteases als hun inhibitoren om zichzelf te beschermen tegen proteolyse. CYTB wordt gecontroleerd door het cytokinetransforming growth factor- β (TGF- β). Onder normale omstandigheden heeft dit eiwit anti-proliferatieve eigenschappen, omdat TGF- β synthese van p21 veroorzaakt. Hierdoor stopt de celcyclus in de G1-fase en zo ook de celproliferatie. Echter, wanneer een cel muteert tot een kankercel, zal een deel van de TGF- β signaalpathway worden getransformeerd. Dit heeft als gevolg dat de controle van TGF- β op de celcyclus wegvalt, er meer proliferatie zal optreden en de tumor meer invasief wordt. De getransformeerde TGF- β signaalpathway zal ook zijn controle op het CYTB verliezen. Hierdoor kan CYTB metastasebevorderend optreden omdat de proteases de afbraak van de extracellulaire matrix zullen stimuleren. Zo beïnvloeden cystatines de tumorgroei en metastasevorming. Bij eierstokkanker is er ook een mutatie in TGF- β gevonden (Wang et al., 2014). Er is nog geen verband gevonden tussen CYTB en baarmoederhalskanker zelf, maar dus wel tussen CYTB en ovariumkanker. Bij ovariumkanker is de cystatine B concentratie namelijk 1,7 keer toegenomen ten opzichte van de afwezige, normale concentratie in gewoon eierstokweefsel (Gashenko et al., 2013). Door middel van een immunohistochemische kleuring wordt duidelijk dat er een overexpressie van cystatine B is bij kwaadaardige ovariumcarcinomen. Bij benigne ovariumcarcinomen is de aankleuring zwakker en bij normaal ovariumweefsel is deze negatief. De kleuring is niet gecorreleerd met de tumorgrootte, lymfekliermetastasen, of stadia waarin de tumor zich bevindt (Wang et al., 2014).

Conclusie en perspectieven

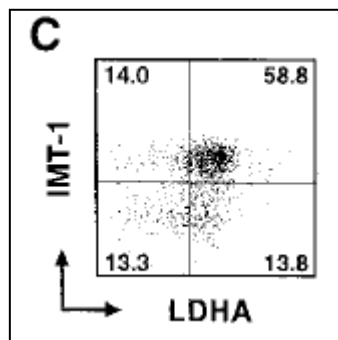
Zijn deze zeven biomerkers bruikbaar als alternatieve screeningsmethode voor baarmoederhalskanker? De aanwezigheid van sommige van deze biomerkers kan al verklaard worden, maar voor andere ligt dit nog moeilijk. Dit komt omdat het moleculaire proces van baarmoederhalskanker nog niet volledig wordt begrepen. Toch kunnen de besproken biomerkers hierbij helpen. De biomerkers worden nu besproken in functie van het ontwikkelingsproces van baarmoederhalskanker.

PSME1: dit eiwit zorgt voor een verhoogde hydrolytische reactie van het proteasoom van een cel. Hierdoor zullen er op korte tijd meer epitopen op het celoppervlak geëxprimeerd kunnen worden. Deze epitopen kunnen dan via MHC-klasse-I antigeen aanbieding aan de cytotoxische T-cellen worden aangeboden (Ossendorp et al., 2005). Omdat MHC-klasse-I niet tot expressie komt bij gezonde cellen, is PSME1 een goede biomarker voor de verhoogde activatie van het immuunsysteem ten gevolge van de infectie met het humaan papillomavirus (Kumai et al., 2014). Dit eiwit wordt dus geïnduceerd door de cel als afweer tegen het virus. Er zal nog onderzoek nodig zijn, omdat deze biomarker in theorie enkel aan eierstokkanker is gelinkt.

MIF: MIF wordt voornamelijk geproduceerd door macrofagen en speelt een rol bij de aangeboren immuunrespons. Omdat het virus een verhoogde expressie van MIF induceert, zal de activatie van macrofagen, en dus de immuunrespons tegen het virus, verhinderd worden (Babu et al., 2012). Het eiwit wordt dus geïnduceerd door het virus omdat het helpt bij de virusoverleving. Verder heeft de overexpressie van MIF tot gevolg dat er een verminderde expressie van p53 zal zijn. Hierdoor komt de apoptose die normaal door p53 wordt geïnduceerd niet op gang en blijft de baarmoederhalskankertumor ongecontroleerd delen (Grieb et al., 2010). MIF is dus een goede biomarker voor baarmoederhalskanker.

S100A6: calcycline wordt in hoge concentraties geëxprimeerd door epitheliale cellen die een hoge proliferatieve activiteit hebben of bij cellen waarbij veel differentiatie optreedt (Nowotny et al., 2000). S100A6 heeft een belangrijke functie bij de celgroei, proliferatie en metastase. Calcycline zal indirect p53 inactiveren waardoor apoptose na DNA-schade niet doorgaat en een tumor ongecontroleerd blijft verder delen (Iyer et al., 2004). Calcycline komt tot expressie als gevolg van een secundaire mutatie, want dit eiwit speelt geen rol bij de virus- of celoverleving gekoppeld aan het immuunsysteem. Deze biomarker kan enkel gebruikt worden als het cervixweefsel al in matige tot vergevorderde dysplasie verkeert.

LDHA: lactaat dehydrogenase A is het enzyme dat voorkomt bij de laatste stap van de glycolyse (Fan et al., 2011). Omdat kankercellen sneller delen dan normaal, zal er ook meer glucoseverbruik optreden. Als de nood aan glucose in de tumor hoger is dan het aanbod, zal er hypoxie ontstaan. Onder deze omstandigheden zal de expressie van HIF-1 toenemen, omdat de promotoren van de LDHA-genen hiervoor een bindingsplaats hebben (Semenza et al., 1996). LDHA kan dus gebruikt worden als biomarker voor het cervixcarcinoom, maar wordt nu al gebruikt bij de detectie van pelvische lymfekliermetastase bij baarmoederhalskanker. Daarvoor heeft de merker al een accuraatheid van 91%, een sensitiviteit van 90,9% en een specificiteit van 93,3% (Huang et al., 2011). Verder heeft LDHA een rol in het immuunsysteem, bij het maturatieproces van thymocyten. Op het celoppervlak van immature thymocyten wordt immatuur thymocyt antigen-1 (IMT-1) geëxprimeerd. Mature thymocyten verliezen deze expressie. IMT-1 zal het ontwikkelingsproces tot mature T-cellen sturen (Kishi et al., 1998). De expressie van IMT-1 moet in een co-expressie met LDHA gebeuren. Er werd aangetoond dat 81% van de IMT-1 positieve thymocyten ook LDHA expresseren op hun celoppervlak (figuur 10) (Fujishiro et al., 2000). Omdat LDHA het maturatieproces van thymocyten versterkt, kan het dus ook geïnduceerd worden door de cel als afweer tegen HPV.



Figuur 10. Er is een co-expressie van LDHA en IMT-1 bij immature thymocyten aanwezig. De thymocyten werden aangekleurd met anti-LDHA ab en met anti-IMT-1. Immature thymocyten zijn dus zowel positief voor LDHA en IMT-1. De resultaten werden uitgezet aan de hand van een dotplot (Fujishiro et al., 2000).

S100A9: dit eiwit wordt in de literatuur beschreven als een negatieve biomarker voor baarmoederhalskanker. Dit wil zeggen dat de aanwezigheid van deze merker in relatie staat met een gestegen vijf jaar overlevingskans bij baarmoederhalskanker. Toch werd er in het onderzoek van de onderzoeksgroep van prof. Dr. Xaveer Van Ostade gevonden dat dit een positieve biomarker is voor baarmoederhalskanker. Deze schijnbare tegenstrijdigheid kan verklaard worden doordat het programma dat de identificaties uit de spectra van de massaspectrometer haalt, zich vergist heeft in eiwit. De eiwitidentificaties gebeuren namelijk op basis van een aantal peptiden, afkomstig van het eiwit, die gevonden worden in het staal. Maar S100A9 behoort tot een grote groep van S100-eiwitten. Binnen deze S100-groep zijn er een aantal proteïnen die een sterke gelijkheid (een aminozuursequentie homologie) vertonen met S100A9. S100A12 is hier zo één van. Dit eiwit is voor 47% identiek aan S100A9 (Yang et al., 2001). Aangezien het hier gaat om kleine eiwitten, zijn er weinig peptiden waarop het programma zich

kan baseren, dus mogelijk baseert het zijn identificatie op 1 of 2 peptiden die ook in S100A12 voorkomen (Van Ostade X., niet gepubliceerd).

S100A12 of calgranuline C is een calcium-, zink- en koper-bindingseiwit. Het speelt een belangrijke rol in de regulatie van inflammatoire processen en bij de immuunrespons. De pro-inflammatoire activiteit van het eiwit bestaat uit het aantrekken van leukocyten, stimulatie van cytokineproductie en het regelen van de leukocytenmigratie en adhesie (Ji et al., 2004). Het heeft maar een zwakke inwerking op neutrofielen en lymfocyten (Yang et al., 2001).

Verder onderzoek naar beide merkers, S100A9 en S100A12, is noodzakelijk. Als S100A9 het correcte eiwit is, dan wordt dit eiwit geïnduceerd door het virus omdat de concentratie aan het eiwit daalt naarmate het proces van baarmoederhalskanker vordert. Aangezien het eiwit wordt geproduceerd in neutrofielen, zal het aantal neutrofielen ook dalen waardoor de HPV-infectie zich kan blijven manifesteren (Gebhardt et al., 2006). Als het eiwit uit de analyse toch S100A12 moest zijn, dan speelt dit eiwit een rol in de afweer van de cel tegen de HPV-infectie door in te werken op de leukocytenmigratie.

ICAL: calpastatine is een specifieke endogene inhibitor van calpain I en II, calcium-afhankelijke cysteine proteases. In de aanwezigheid van calcium zal ICAL aan een calpain binden en zijn protease-activiteit inhiberen. Calpastatine, calpain I en calpain II vormen samen het calpain systeem. Dit systeem speelt een rol bij apoptose (Salehin et al., 2011). Er is al geweten dat calpain I en calpastatine ook voor apoptose bij neutrofielen zullen zorgen. Als calpastatine daarbij onderdrukt wordt, zal apoptose geïnduceerd worden. Aangezien er in deze studie werd aangetoond dat er een verhoogde expressie van calpastatine aanwezig is, zal het proces van apoptose bij de neutrofielen vertraagd worden. Dit zorgt ervoor dat de neutrofielen hun functie langer kunnen uitvoeren en het lichaam beter beschermd wordt tegen de HPV-infectie (Squier et al., 1999). Calpastatine wordt dus geïnduceerd door de cel als afweersysteem. Verder onderzoek is toch noodzakelijk want over deze biomarker is nog maar weinig geweten, ook qua functie.

CYTB:cystatine B wordt gecontroleerd door TGF- β . Wanneer een cel muteert tot een kankercel zal een deel van de TGF- β signaalpathway worden getransformeerd. Dit heeft als gevolg dat de controle van TGF- β op de celcyclus wegvalt, er meer proliferatie zal optreden, apoptose niet geïnduceerd wordt en de tumor meer invasief wordt. Om deze reden spelen cystatines een belangrijke rol bij tumorgroei en metastases. Het eiwit wordt geïnduceerd als secundaire mutatie ten gevolge van de precancereuze staat waarin de cellen zich bevinden. CYTB is daarom mogelijk een goede biomarker voor baarmoederhalskanker, al zal er nog onderzoek moeten gebeuren, omdat er enkel een link is gemaakt met ovariumkanker.

Tabel 4. Samenvattende tabel biomarkers

Merker	Virus	Cel	Tumor	Onderzocht in deze studie	Opmerking
PSME1		X		OVC	/
MIF	X			CC, OVC	Aanwezigheid ook al aangetoond bij andere kankers: long, darm, maag, prostaat
S100A6			X	CC	Aanwezigheid ook al aangetoond bij andere kankers: borst, huid en pancreas
LDHA		X		CC	Wordt al gebruikt bij de detectie van PLNM bij baarmoederhalskanker
S100A9	X			CC	Mogelijk foute analyse door massaspectrometer
(S100A12)		X		/	Mogelijk foute analyse door massaspectrometer
ICAL		X		EC, OVC	Wordt al gebruikt bij de platinum chemotherapie bij OVC
CYTB			X	OVC	/

De merkers kunnen ofwel door het virus worden geïnduceerd omdat dit eiwit helpt bij de virusoverleving. Dit is het geval bij MIF en S100A9. De merker kan ook in het proces van baarmoederhalskanker worden geïnduceerd en helpt als afweer tegen de HPV-infectie. Dit is het geval bij PSME1, LDHA, (S100A12) en ICAL. De laatste groep merkers zijn eiwitten die pas geëxprimeerd worden als secundaire mutatie ten gevolge van het onstabiele tumorweefsel. Dit is het geval bij S100A6 en CYTB. CC: cervixcarcinoom. EC: endometriumcarcinoom. OVC: eierstokcarcinoom

Dankwoord

Graag zou ik mijn promotor Prof. Xaveer Van Ostade bedanken voor zijn hulp bij het schrijven van deze bachelorscriptie. Dankzij de goede feedback, nuttige startliteratuur en sturing waar nodig, kon ik steeds verder met mijn draften. Verder bedank ik Prof. Bartold Marescau en Dr. Alain Labro voor hun opmerkingen en tips over de algemene richtlijnen van de bachelorproef. De mensen die mijn bachelorscriptie hebben nagelezen op zinsbouw, spelling en grammatica bedank ik hierbij ook. Ten slotte bedank ik Karl Celis die mij geholpen heeft bij de opmaak en de figuren.

Referenties

- Armstrong EP: Prophylaxis of cervical cancer and related cervical disease: a review of the cost-effectiveness of vaccination against oncogenic HPV types. *Journal of managed care pharmacy* 16, 217-230, 2010
- Babu SN, Chetal G, Kumar S: Macrophage migration inhibitory factor: a potential marker for cancer diagnosis and therapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention* 13, 1737-1744, 2012
- Baker E: HPV and Pap: shifting roles in cervical cancer screening. *Medical laboratory observer* 45, 24, 26, 2013
- Bieging KT, Mello SS, Attardi LD: Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature reviews cancer*, 2014
- Bodily J, Laimins LA: Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends in microbiology* 19, 33-39, 2011
- Cole AM: Innate host defense of human vaginal and cervical mucosae. *Current topics in microbiology and immunology* 306, 199-230, 2006
- Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, Dillner J, Meijer CJ: Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine* 26 Supplement 10, K29-K41, 2008
- Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P, Iftner T: Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *International journal of cancer* 119, 1095-1101, 2006
- Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, Karountzos V, Vatopoulou A, Dimopoulos K, Creatsas G: HPV infection: immunological aspects and their utility in future therapy. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology* 2013, 540850, 2013
- Dijkstra MG, Snijders PJ, Arbyn M, Rijkaart DC, Berkhof J, Meijer CJ: Cervical cancer screening: on the way to a shift from cytology to full molecular screening. *Annals of oncology*, 2014
- El AM, Bonnel D, Longuespee R, Castelier C, Franck J, Vergara D, Desmons A, Tasiemski A, Kenani A, Vinatier D, Day R, Fournier I, Salzet M: MALDI imaging mass spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers. *Medical science monitor* 16, BR233-BR245, 2010
- Erickson BK, Alvarez RD, Huh WK: Human papillomavirus: what every provider should know. *American journal of obstetrics and gynecology* 208, 169-175, 2013
- Fan J, Hitosugi T, Chung TW, Xie J, Ge Q, Gu TL, Polakiewicz RD, Chen GZ, Boggon TJ, Lonial S, Khuri FR, Kang S, Chen J: Tyrosine phosphorylation of lactate dehydrogenase A is important for NADH/NAD(+) redox homeostasis in cancer cells. *Molecular and cellular biology* 31, 4938-4950, 2011
- Fujishiro Y, Kishi H, Matsuda T, Fuse H, Muraguchi A: Lactate dehydrogenase A-dependent surface expression of immature thymocyte antigen-1: an implication for a novel trafficking function of lactate dehydrogenase-A during T cell development. *European journal of immunology* 30, 516-524, 2000
- Gashenko EA, Lebedeva VA, Brak IV, Tsykalenko EA, Vinokurova GV, Korolenko TA: Evaluation of serum procathepsin B, cystatin B and cystatin C as possible biomarkers of ovarian cancer. *International journal of circumpolar health* 72, 2013
- Gebhardt C, Nemeth J, Angel P, Hess J: S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochemical pharmacology* 72, 1622-1631, 2006
- Graczyk A, Slomnicki LP, Lesniak W: S100A6 competes with the TAZ2 domain of p300 for binding to p53 and attenuates p53 acetylation. *Journal of molecular biology* 425, 3488-3494, 2013
- Grieb G, Merk M, Bernhagen J, Bucala R: Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a promising biomarker. *Drug news and perspectives* 23, 257-264, 2010
- Han KT, Sin JI: DNA vaccines targeting human papillomavirus-associated diseases: progresses in animal and clinical studies. *Clinical and experimental vaccine research* 2, 106-114, 2013
- Higareda-Almaraz JC, Enriquez-Gasca MR, Hernandez-Ortiz M, Resendis-Antonio O, Encarnacion-Guevara S: Proteomic patterns of cervical cancer cell lines, a network perspective. *BMC systems biology* 5, 96, 2011
- Huang L, Zheng M, Zhou QM, Zhang MY, Jia WH, Yun JP, Wang HY: Identification of a gene-expression signature for predicting lymph node metastasis in patients with early stage cervical carcinoma. *Cancer* 117, 3363-3373, 2011
- Iyer NG, Chin SF, Ozdag H, Daigo Y, Hu DE, Cariati M, Brindle K, Aparicio S, Caldas C: p300 regulates p53-dependent apoptosis after DNA damage in colorectal cancer cells by modulation of PUMA/p21 levels. *Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America* 101, 7386-7391, 2004
- Ji J, Zhao L, Wang X, Zhou C, Ding F, Su L, Zhang C, Mao X, Wu M, Liu Z: Differential expression of S100 gene family in human esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research in clinical oncology* 130, 480-486, 2004
- Kishi H, Tong JJ, Nagata T, Muraguchi A: Immature thymocyte marker antigen-1: a novel thymocyte marker discriminating pre- and post-selected thymocytes. *International immunology* 10, 951-960, 1998
- Kitchener HC: Gynaecological cancer. *Postgraduate medical journal* 75, 332-338, 1999
- Koukourakis MI, Kontomanolis E, Giatromanolaki A, Sivrdis E, Liberis V: Serum and tissue LDH levels in patients with breast/gynaecological cancer and benign diseases. *Gynecologic and obstetric investigation* 67, 162-168, 2009
- Krockenberger M, Engel JB, Kolb J, Dombrowsky Y, Hausler SF, Kohrenhagen N, Dietl J, Wischhusen J, Honig A: Macrophage migration inhibitory factor expression in cervical cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* 136, 651-657, 2010
- Kumai T, Ishibashi K, Oikawa K, Matsuda Y, Aoki N, Kimura S, Hayashi S, Kitada M, Harabuchi Y, Celis E, Kobayashi H: Induction of tumor-reactive T helper responses by a posttranslational modified epitope from tumor protein p53. *Cancer immunology and immunotherapy*, 2014
- Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV: Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National academy of sciences* 107, 2037-2042, 2010
- Lee MJ, Yu GR, Park SH, Cho BH, Ahn JS, Park HJ, Song EY, Kim DG: Identification of cystatin B as a potential serum marker in hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research* 14, 1080-1089, 2008
- Lesniak W, Slomnicki LP, Filipek A: S100A6 - New facts and features. *Biochemical and biophysical research communications* 390, 1087-1092, 2009
- Longuespee R, Boyon C, Castelier C, Jacquet A, Desmons A, Kerdraon O, Vinatier D, Fournier I, Day R, Salzet M: The C-terminal fragment of the immunoproteasome PA28S (Reg alpha) as an early diagnosis and tumor-relapse biomarker: evidence from mass spectrometry profiling. *Histochemistry and cell biology* 138, 141-154, 2012
- Lowy DR, Schiller JT: Prophylactic human papillomavirus vaccines. *Journal of clinical investigation* 116, 1167-1173, 2006
- Lowy DR, Solomon D, Hildesheim A, Schiller JT, Schiffman M: Human papillomavirus infection and the primary and secondary prevention of cervical cancer. *Cancer* 113, 1980-1993, 2008
- Martin-Hirsch PL, Wood NJ: Cervical cancer. *Clinical evidence online* 2011, 2011
- Mueller A, Bachi T, Hochli M, Schafer BW, Heizmann CW: Subcellular distribution of S100 proteins in tumor cells and their relocation in response to calcium activation. *Histochemistry and cell biology* 111, 453-459, 1999
- Nowotny M, Bhattacharya S, Filipek A, Krezel AM, Chazin W, Kuznicki J: Characterization of the interaction of calyculin (S100A6) and calyculin-binding protein. *The journal of biological chemistry* 275, 31178-31182, 2000
- Ossendorp F, Fu N, Camps M, Granucci F, Gobin SJ, van den Elsen PJ, Schuurhuis D, Adema GJ, Lipford GB, Chiba T, Sijts A, Kloetzel PM, Ricciardi-Castagnoli P, Melief CJ: Differential expression regulation of the alpha and beta subunits of the PA28 proteasome activator in mature dendritic cells. *The journal of immunology* 174, 7815-7822, 2005
- Qin F, Song Y, Li Z, Zhao L, Zhang Y, Geng L: S100A8/A9 induces apoptosis and inhibits metastasis of CasKi human cervical cancer cells. *Pathology and oncology research* 16, 353-360, 2010
- Salehin D, Fromberg I, Haugk C, Dohmen B, Georg T, Bohle RM, Bauerschlag D, Maass N, Friedrich M: Immunohistochemical analysis for expression of calpain 1, calpain 2 and calpastatin in endometrial cancer. *Anticancer research* 30, 2837-2843, 2010

Salehin D, Fromberg I, Haugk C, Dohmen B, Georg T, Bohle RM, Bauerschlag D, Thill M, Friedrich M: Immunohistochemical analysis for expression of calpain 1, calpain 2 and calpastatin in ovarian cancer. *European journal of gynaecological oncology* 32, 628-635, 2011

Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A: Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *Journal of biological chemistry* 271, 32529-32537, 1996

Silberring J, Ciborowski P: Biomarker discovery and clinical proteomics. *Trends in analytical chemistry* 29, 128, 2010

Spirina LV, Kondakova IV, Choinzonov EL, Sharova NP, Chigevskay SY, Shishkin DA: Activity and subunit composition of proteasomes in head and cervical squamous cell carcinomas. *Bulletin of experimental biology and medicine* 149, 82-85, 2010

Squier MK, Sehnert AJ, Sellins KS, Malkinson AM, Takano E, Cohen JJ: Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *Journal of cellular physiology* 178, 311-319, 1999

Stanley M: Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic oncology* 117, S5-10, 2010

Storr SJ, Safuan S, Woolston CM, Abdel-Fatah T, Deen S, Chan SY, Martin SG: Calpain-2 expression is associated with response to platinum based chemotherapy, progression-free and overall survival in ovarian cancer. *Journal of cellular and molecular medicine* 16, 2422-2428, 2012

Tambor V, Fucikova A, Lenco J, Kacerovsky M, Rehacek V, Stulik J, Pudil R: Application of proteomics in biomarker discovery: a primer for the clinician. *Physiological research* 59, 471-497, 2010

Wang X, Gui L, Zhang Y, Zhang J, Shi J, Xu G: Cystatin B is a progression marker of human epithelial ovarian tumors mediated by the TGF-beta signaling pathway. *International journal of cancer* 44, 1099-1106, 2014

Xiao DZ, Dai B, Chen J, Luo Q, Liu XY, Lin QX, Li XH, Huang W, Yu XY: Loss of macrophage migration inhibitory factor impairs the growth properties of human HeLa cervical cancer cells. *Cell proliferation* 44, 582-590, 2011

Yang Z, Tao T, Raftery MJ, Youssef P, Di GN, Geczy CL: Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. *Journal of leukocyte biology* 69, 986-994, 2001

Zegels G, Van Raemdonck GA, Coen EP, Tjalma WA, Van Ostade XW: Comprehensive proteomic analysis of human cervical-vaginal fluid using colposcopy samples. *Proteome science* 7, 17, 2009

Zhu H, Liu H, Liu L, Wu T, Wu Y, Zeng S, Zeng L: [Expression of galectin-7 and S100A9 and development of cervical squamous carcinoma]. *Journal of Central South university - medical sciences* 38, 888-895, 2013a

Zhu H, Wu TC, Chen WQ, Zhou LJ, Wu Y, Zeng L, Pei HP: Roles of galectin-7 and S100A9 in cervical squamous carcinoma: Clinicopathological and in vitro evidence. *International journal of cancer* 132, 1051-1059, 2013b