

In dit proefschrift worden studies beschreven die tot doel hebben de relatie tussen humane papillomavirussen (HPV's) en plaveiselcelcarcinomen uit het hoofd-halsgebied op te helderen.

Uit eerder onderzoek naar baarmoederhalskanker is gebleken dat bepaalde, zogenaamde kwaadaardige HPV typen zeer frequent voorkomen in baarmoederhalscarcinomen. Verdere studies naar deze virussen hebben geleid tot de ontdekking van oncogene eigenschappen, waardoor het aannemelijk is dat deze virussen een rol spelen bij het ontstaan van baarmoederhalskanker.

De hoofdstukken II en III beschrijven de ontwikkeling van methodieken die het mogelijk maken een breed spectrum aan verschillende HPV typen aan te kunnen tonen. De HPV groep bestaat immers uit meer dan 60 typen en het was op voorhand niet te traceren welke van deze typen konden voorkomen in hoofd-halscarcinomen. Tevens kon de mogelijkheid dat onbekende, nog niet geïdentificeerde HPV typen voorkomen in deze carcinomen niet worden uitgesloten. Derhalve werd ruime aandacht besteed aan de ontwikkeling van gevoelige, universele HPV detektiemethoden. Hiervoor werd de recent ontwikkelde polymerase kettingreactie (PCR) gebruikt. Deze methode is in staat om heel specifiek kleine fragmenten van het virale erfelijke materiaal, het DNA, te vermeerderen. De mate waarin deze vermeerdering plaatsvindt is dusdanig, dat theoretisch één HPV DNA molecuul kan worden aangetoond. De moeilijkheid voor het gebruik van de PCR methode als universele HPV detektiemethode lag op het niveau van de selectie van geschikte algemene primers. Primers zijn korte, synthetische DNA moleculen die als "starters" fungeren voor de vermeerderingsreactie en bepalen welke DNA moleculen kunnen worden vermeerderd. De basenvolgorde van een primer moet geheel of grotendeels overeenkomen met die van het te vermeerderen DNA molecuul. Aangezien van de meeste HPV typen geen basenvolgorde bekend is, moesten algemene HPV primers worden geselecteerd aan de hand van de basenvolgorde van een beperkt aantal HPV's. Het universele karakter van deze primers werd vervolgens proefondervindelijk vastgesteld door een breed panel aan HPV typen te onderwerpen aan de PCR. In hoofdstuk II wordt het succesvolle gebruik van twee algemene primercombinaties (GP5/6 en GP11/12) beschreven, die het mogelijk maakten om HPV typen voorkomend in respectievelijk afwijkingen van de slijmvliezen en huidafwijkingen aan te tonen. Hoofdstuk III beschrijft het gebruik van één primercombinatie (GP17/18) die reageerde met alle HPV typen die zijn onderzocht. Inherent aan het gebruik van deze primercombinatie is echter een gereduceerde gevoeligheid zodat klinisch materiaal moet worden voorgeselecteerd alvorens een PCR met deze primers toe te passen. Hoofdstuk IV behandelt de verdere uitwerking van de GP5/6-PCR methode zoals deze is beschreven in hoofdstuk II. Door de basenvolgorden van GP5/6-PCR produkten, afkomstig van verschillende HPV typen, te vergelijken, kon een HPV specifieke regio (consensus) alsmede een heterogene regio worden vastgesteld. Tensamen maken deze regio's het mogelijk om zowel de virale herkomst van een GP-PCR produkt te bevestigen als onderscheid te maken tussen verschillende HPV typen.

In het onderzoek beschreven in hoofdstuk V is de PCR methode gebruikt om het voorkomen van HPV- en EBV-DNA te bestuderen in orale weefsels, waaronder bipten van harige leukoplakie, van HIV-seropositieve patiënten. Geen samenhang tussen harige

leukoplakie en de aanwezigheid van HPV DNA kon worden aangetoond. Wel werd een sterke associatie van harige leukoplakie met EBV DNA aangetoond.

In hoofdstuk VI is het gebruik van de GP-PCR methode beschreven om het voorkomen van HPV te bestuderen in plaveiselcelcarcinomen van de tonsil (amandel). Alle tonsilcarcinomen die zijn onderzocht (n=10), vertoonden positiviteit voor HPV DNA. Typering met behulp van HPV type-specifieke PCR analyse gaf aan dat het in 4 gevallen HPV 16 DNA betrof, terwijl 3 carcinomen HPV 33 DNA bevatten. Daarnaast werd een HPV 16/HPV 33 dubbelinfectie aangetoond alsmede een geval met een HPV X/HPV 33 dubbelinfectie en een geval met HPV X DNA, waarbij X een nog onbekend HPV type aanduidt. De positiviteit voor HPV 16 en HPV 33, typen die ook voorkomen in baarmoederhalscarcinomen, kon in een aantal gevallen worden bevestigd met behulp van genomische Southern blot hybridisatie. Nadere analyse van de PCR produkten afkomstig van de HPV X'en leerde dat deze typen verschillen van 28 HPV typen die eerder konden worden aangetoond met de GP-PCR methode en reeds waren gekarakteriseerd. Verdere analyse van HPV 16 en HPV 33 bevattende carcinomen gaf aan dat deze typen RNA, coderend voor de virale onco-eiwitten, tot expressie brengen en RNA *in situ* analyse heeft aangetoond dat deze expressie beperkt is tot de carcinoomcellen.

Hoofdstuk VII beschrijft de analyse van transcripten uit het vroege gebied van HPV 33 in een tonsilcarcinoom. Dit leidde tot de identificatie van zogenaamde E6* mRNA's en tevens werd een tweede polyadenyleringssignaal in het vroege gebied van HPV 33 ontdekt.

In hoofdstuk VIII werd bekeken of HPV 16 en HPV 33 transcripten in tonsilcarcinomen, die coderen voor het E6-E7 gebied, afkomstig zijn van extrachromosomaal viraal DNA of van viraal DNA dat is geïntegreerd in het gastheer DNA. E6-E7 RNA kon worden aangetoond in zowel gevallen met geïntegreerd DNA als gevallen met extrachromosomaal DNA.

De resultaten verkregen uit bovengenoemde studies maken het aannemelijk dat HPV typen een rol spelen bij het ontstaan van tonsilcarcinoom.