

Deep infiltrating endometriosis environment, genetics, epigenetics

Citation for published version (APA):

Kaam, K. J. A. F. (2012). *Deep infiltrating endometriosis environment, genetics, epigenetics*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20120524kk>

Document status and date:

Published: 01/01/2012

DOI:

[10.26481/dis.20120524kk](https://doi.org/10.26481/dis.20120524kk)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting

Endometriose is één van de meest voorkomende goedaardige gynaecologische aandoeningen en treft naar schatting ongeveer 10% van alle vrouwen in de vruchtbare leeftijd. Het wordt gedefinieerd als de aanwezigheid van functioneel endometrium, bestaande uit klierbuisjes en stroma, op ectopische locaties buiten het cavum uteri. Voorkeurslokalisaties zijn de ovaria, de fossa ovarica, de sacro-uteriene ligamenten en het cavum Douglasi. Dysmenorroe, dyspareunie, ernstige en chronische buikpijn en subfertiliteit zijn de belangrijkste symptomen.

Op dit moment is de retrograde transplantatie theorie van Sampson wereldwijd de meest geaccepteerde theorie betreffende de ontstaanswijze van endometriose. Volgens deze theorie vindt er tijdens de menstruatie reflux van vitale endometriumcellen plaats via de tubae naar de buikholte, waarna deze cellen hechten, implanteren en verder groeien op en in het peritoneum ter plaatse. Retrograde menstruatie is echter een veel voorkomend fenomeen, en kleine endometriose laesies worden vaak gezien bij asymptomatische vrouwen in de vruchtbare leeftijd. Hierdoor wordt milde peritoneale endometriose steeds vaker beschouwd als een fysiologisch verschijnsel dan als een ziekte.

In 1990 werd diep invasieve endometriose geïntroduceerd als een nieuwe, separate entiteit. Diep invasieve endometriose wordt gedefinieerd als het voorkomen van endometriale klierbuisjes en stroma >5 mm onder het peritoneumoppervlak. Omdat diep invasieve laesies het sterkst geassocieerd zijn met symptomen als dysmenorroe, diepe dyspareunie, chronische pijn in het kleine bekken en pijnlijke defaecatie wordt dit type endometriose als pathologisch beschouwd, in tegenstelling tot oppervlakkige peritoneale endometriose. Ook vertoont diep invasieve endometriose morfologisch gelijkenis met adenomyosis uteri (d.w.z de aanwezigheid van endometriale klierbuisjes en stroma in het myometrium van de uterus).

De factoren die ervoor zorgen dat endometriose zich in de ene vrouw wel tot een pathologische entiteit ontwikkelt en in de andere niet, zijn nog grotendeels onopgehelderd. Zowel omgevingsfactoren als genetische en epigenetische factoren worden verondersteld hierbij een rol te spelen. Het doel van dit proefschrift was om meer inzicht te verkrijgen in de invloed van elk van deze drie factoren op het ontstaan en de progressie van diep invasieve endometriose.

Een overzicht van de klinische achtergrond en huidige inzichten betreffende de pathogenese van endometriose wordt gegeven in **Hoofdstuk 1**. Vervolgens worden de verschillende moleculaire pathways die onderzocht werden in dit proefschrift in detail beschreven. Tenslotte worden de onderzoeksvragen en een overzicht van de hoofdstukken in dit proefschrift vermeld.

Het eerste gedeelte van dit proefschrift beschrijft de rol van de lokale omgeving bij het ontstaan en de instandhouding van diep invasieve endometriose laesies. In **Hoofdstuk 2** werd (1) het fibromusculaire weefsel dat aanwezig is in diep invasieve endometriose

laesies gekarakteriseerd met behulp van immunohistochemische markers van gladde spiercel differentiatie, (2) de herkomst van gladde spiercellen in endometriose laesies onderzocht in de naakte muis en (3) een mogelijke rol van het cytokine transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in dit proces onderzocht met behulp van immunohistochemische markers van TGF- β 1 signaling.

Het fibromusculaire weefsel dat diep invasieve endometriose laesies omgeeft bevat myofibroblasten die meerdere markers van gladde spiercel differentiatie tot expressie brengen, zoals alpha-smooth muscle actine (ASMA), desmine en smooth muscle myosin heavy chain. Dit komt overeen met de situatie bij pathologische wondgenezing en ziekten die gekarakteriseerd worden door fibrose en contractie van weefsel. In de naakte muis toonden we aan dat de expressie van ASMA wordt geïnduceerd in het gastheerweefsel na de implantatie van humane endometriumfragmenten. Dit suggereert dat de aanwezigheid van gladde spiercel-achtig weefsel in endometriose laesies het gevolg is van een reactie van de lokale omgeving op de aanwezigheid van ectopisch gelokaliseerd endometrium, en niet van gladde spiercel metaplasie van het ectopische endometrium zelf. Immunohistochemische expressie van TGF- β receptor 1, TGF- β receptor 2 en phospho-Smad2 (een marker voor actieve TGF- β 1 signaling) was aanwezig in zowel de endometriale als de fibromusculaire component van de laesies maar was meer uitgesproken in de endometriale component, wat uitwijst dat TGF- β 1 signaling hoofdzakelijk plaatsvindt in het endometrium en niet in het gastheerweefsel. Het is daarom onwaarschijnlijk dat de hoeveelheid fibromusculair weefsel in diep invasieve endometriose laesies verklaard wordt door TGF β signaling alléén.

Het tweede gedeelte van het proefschrift behandelt de vraag of genetische varianten zoals single nucleotide polymorphisms (SNPs) met functionele consequenties in twee geselecteerde kandidaatgenen de vatbaarheid voor het ontwikkelen van diep invasieve endometriose beïnvloeden. In **Hoofdstuk 3** werd de mogelijke associatie tussen het -509C/T polymorfisme van het TGF- β 1 gen en het risico op het ontwikkelen van diep invasieve endometriose onderzocht. Er waren geen statistisch significante verschillen in de frequentie van het -509C/T polymorfisme tussen 72 diep invasieve endometriose patiënten en twee separate controlegroepen bestaande uit 95 gynaecologische patiënten zonder symptomen van endometriose en 93 gezonde vrouwen. Het -509C/T polymorfisme van het TGF- β 1 gen lijkt daarom het risico op diep invasieve endometriose niet te modifieren.

De mogelijke associatie tussen twee polymorfismen in het progesteron receptor (PR) gen, PROGINS en +331G/A, en diep invasieve endometriose werd onderzocht in **Hoofdstuk 4**. De frequentie van het PROGINS polymorfisme verschilde niet tussen de groepen en lijkt daarom het risico op diep invasieve endometriose niet te beïnvloeden. De frequentie van het polymorfe allel +331A was lager in 72 vrouwen met diep invasieve endometriose (3.0%) en in 40 vrouwen met adenomyosis uteri (2.6%) vergeleken met 93 gezonde vrouwen (18.3%). De aanwezigheid van het polymorfe allel +331A was geassocieerd met

een statistisch significante reductie van het risico op het hebben van het fenotype diep invasieve endometriose (OR 0.22; 95% CI 0.06-0.77) of adenomyosis uteri (OR 0.12, 95% CI 0.02-0.95). Opmerkelijk was dat deze afname in risico op het ontwikkelen van diep invasieve endometriose alleen statistische significantie bereikte wanneer vrouwen met diep invasieve endometriose werden vergeleken met een controlegroep met gezonde vrouwen uit de algemene populatie, maar niet wanneer zij vergeleken werden met een controlegroep bestaande uit 102 gynaecologische patiënten zonder symptomen van endometriose (frequentie polymorfe allel +331A: 8.8%). Dit geeft aan dat een controlegroep die representatief is voor de algemene populatie geschikter is voor dit type onderzoek dan een controlegroep bestaande uit gynaecologische patiënten, omdat bij deze laatste groep het risico op de introductie van bias verhoogd is.

Het derde gedeelte van dit proefschrift behandelt de vraag of epigenetische mechanismen zoals DNA methylering betrokken zijn bij de regulatie van groei en differentiatie in het endometrium en bij de differentiële expressie van genen in endometriose patiënten. In **Hoofdstuk 5** onderzochten we (1) de expressie van de epigenetische markers DNA methyltransferases (DNMTs) en methyl-CpG-binding domain proteins (MBDs) in humaan endometrium gedurende de menstruele cyclus en in eutopisch en ectopisch endometrium van endometriose patiënten, en (2) het effect van behandeling met de steroid hormonen estradiol (E2) en progesteron (P) op de expressie van DNMTs en MBDs in explant kweken van proliferatief endometrium. De expressie van DNMTs en MBDs werd onderzocht met behulp van kwantitatieve real-time PCR (qRT-PCR).

De expressie van DNMT1 en MBD2 was significant hoger in secretoir endometrium (n=12) dan in proliferatief (n=8) en menstrueel endometrium (n=3). Daarnaast werd de expressie van DNMT1 en MBD2 significant ge-upreguleerd in endometrium dat behandeld was met een combinatie van E2+P, wat een rol voor DNMTs en MBDs bij de cyclische groei en differentiatie van het humane endometrium suggereert. Tenslotte was de expressie van verschillende DNMTs en MBDs significant lager in ectopische endometriose laesies dan in eutopisch endometrium van endometriose patiënten en controles zonder endometriose. Dit zou kunnen verklaren waarom veranderingen in promotor methylering van bepaalde genen gezien worden in ectopische endometriose laesies. Ook wordt het idee dat endometriose een epigenetische ziekte zou kunnen zijn door deze resultaten ondersteund.

In **Hoofdstuk 6** werd de hypothese getest dat de sterke up- of downregulatie van genen in eutopisch endometrium van endometriose patiënten in een eerder uitgevoerde microarray studie het gevolg is van methylering van de promotor. De door ons onderzochte genen werden geselecteerd op basis van biologische plausibiliteit en de aanwezigheid van een significant CpG eiland in de promotor van het gen. Zowel de expressie van mRNA als de methyleringsstatus van de onderzochte gebieden in het promotor CpG eiland van de genen PRIM2A, TGFβ3, EFN1, TAF6L, SHB, ITGA2, BENE, Rap1GAP, OGG1 en PRB was niet significant verschillend tussen eutopisch endometrium

van endometriose patiënten en eutopisch endometrium van controles. Vanwege recente nieuwe inzichten op het gebied van DNA methylering en het belang van zogenaamde “core regions” voor de regulatie van genexpressie is het op basis van deze resultaten helaas niet mogelijk om definitief een uitspraak te doen over de regulatie van deze genen door (promoter) methylering. Hiertoe bevelen we het opnieuw testen van onze hypothese aan met gebruikmaking van moderne, sensitieve, core region-specifieke technieken voor de detectie van DNA methylering aan in een grotere groep eutopische endometrium samples.

In **Hoofdstuk 7** worden de belangrijkste bevindingen samengevat en bediscussieerd in de context van recente literatuur. De beperkingen van onze studies en aanbevelingen voor toekomstig onderzoek worden vermeld.