

# VU Research Portal

## Analysis of chromosomal copy number aberrations in gastrointestinal cancer

Haan, J.C.

2014

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

### **citation for published version (APA)**

Haan, J. C. (2014). *Analysis of chromosomal copy number aberrations in gastrointestinal cancer*.

### **General rights**

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

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

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

### Analyse van chromosomale afwijkingen in gastrointestinale tumoren

In het ontstaan van kanker spelen vele moleculaire processen een rol. Deze processen worden in gang gezet door veranderingen in het DNA. Een voorbeeld hiervan is een mutatie, dat wil zeggen een verandering in de DNA code van een gen, waardoor de functie van het gen verandert.

Bij de keuze van de antikankermiddelen waarmee patiënten met gastrointestinale tumoren, zoals kanker van maag, dunne en dikke darm, worden behandeld, wordt op dit moment nog maar in beperkte mate rekening gehouden met de biologische eigenschappen van de tumor. De reden hiervoor is dat we nog onvoldoende kennis hebben over deze eigenschappen om te kunnen voorspellen of een bepaalde tumor zal reageren op een bepaalde behandeling. Met behulp van zogenaamde biomerkers kunnen we in de toekomst mogelijk wel voorspellen hoe een bepaalde tumor zal reageren.

Gastrointestinale tumoren vertonen vaak chromosomale instabiliteit, wat leidt tot een abnormale hoeveelheid (een toe- of afname) van het DNA waaruit deze chromosomen bestaan, en daardoor ook een toe- of afname van genfunctie.

Deze abnormale hoeveelheden van DNA worden ook wel chromosomale afwijkingen genoemd. In dit proefschrift hebben we chromosomale afwijkingen en de daarbij betrokken genen geanalyseerd in gastrointestinale tumoren. Onze werkhypothese daarbij was dat deze afwijkingen invloed kunnen hebben op het verloop van de ziekte en de gevoeligheid voor therapie en daarom als biomerkers kunnen dienen voor het voorspellen van respons op behandeling.

### Kleine chromosomale afwijkingen

Bij gastrointestinale tumoren komen zowel grote als kleine chromosomale afwijkingen voor. Grote chromosomale afwijkingen bevatten honderden genen, waardoor het lastig is de daadwerkelijke kankergelateerde genen aan te wijzen. Kleine chromosomale afwijkingen bevatten door hun beperkte omvang slechts één of zeer weinig genen. Dit beperkte aantal vergemakkelijkt het identificeren van de genen die echt een rol hebben in het kanker proces. In het eerste deel van dit proefschrift (**hoofdstuk 2**) toonden we aan dat kleine chromosomale afwijkingen in stadium II dikke darmtumoren relatief veel kankergelateerde genen bevatten. In totaal hebben we 81 kleine chromosomale afwijkingen geïdentificeerd, die bij elkaar 177 kandidaat kankergelateerde bevatten. Ook vonden we voor sommige van deze genen aanwijzingen voor veranderde expressie. Dit ondersteunt de theorie dat kleine chromosomale afwijkingen biologische relevant zijn voor de ontwikkeling van de tumor.

### **Dunne darmkanker**

Dunne darmkanker komt t.o.v. dikke darmkanker relatief weinig voor. Als gevolg hiervan kan er nauwelijks onderzoek gedaan worden naar de behandelingsmethodes van deze patiënten. Momenteel wordt in de praktijk voor deze patiënten ofwel voor een dikke darm ofwel voor een maagkanker behandelingschema gekozen. In **hoofdstuk 3** hebben we aangetoond dat de patronen van chromosomale afwijkingen in dunne darmkanker vaak meer lijken op die van de dikke darmkanker dan die van de maagkanker. Deze moleculaire gelijkenissen tussen dikke- en dunne darmkanker kunnen een aanwijzing zijn voor vergelijkbare biologie tussen deze twee kanker types. Gebaseerd op de theorie dat respons op behandeling wordt bepaald door de biologie van de tumor, zouden patiënten met dunne darmkanker meer baat hebben bij behandelingschema's voor dikke darmkanker dan voor maagkanker.

### **Drugtargets in maagkanker**

Nieuwe antikankermiddelen zijn steeds vaker gericht op specifieke biologische doelwitten. Een eiwit, dat in een abnormaal grote hoeveelheid voorkomt t.o.v. een gezonde cel en daarbij een selectievoordeel oplevert voor de tumor, zou een interessant doelwit kunnen zijn voor een antikankermiddel. Een abnormaal grote hoeveelheid van een eiwit kan veroorzaakt worden door een toename van het aantal kopieën van een gen dat codeert voor dat eiwit. In **hoofdstuk 4** hebben we alle genen in kaart gebracht, waarvan een zeer hoog aantal kopieën aanwezig was, met als doel genen te identificeren die coderen voor een al bekend of een potentieel doeleiwit. Deze genen zouden dan kunnen dienen als aangrijpingspunt voor de selectie van het best werkende antikankermiddel voor een bepaalde patiënt met maagkanker of voor de ontwikkeling van nieuwe antikankermiddelen.

Onder de genen die in kopieaantal waren toegenomen, waren inderdaad reeds bekende doelwitten en doelwitten voor antikankermiddelen die momenteel in ontwikkeling zijn. Daarnaast vonden we 4 genen die aangrijpingspunt zijn voor middelen tegen andere ziektes, maar die ook interessant zouden kunnen zijn als antikankermiddel.

### **Respons op chemotherapie bij dikke darmkanker**

In **hoofdstuk 5** onderzoeken we chromosomale afwijkingen in een subgroep van dikke darm- en endeldarmkankerpatiënten met uitzaaiingen. Hiervoor gebruikten we dikke darm- en endeldarmkanker weefsel van patiënten die hebben deelgenomen aan twee fase III klinische studies (CAIRO en CAIRO2). De patiënten werden behandeld met drie verschillende behandelingschema's, namelijk 1) capecitabine monotherapie (CAP), 2) capecitabine plus irinotecan (CAPIRI) of 3) met capecitabine, oxaliplatin en bevacizumab (CAPOX-B). Om te bepalen of een bepaalde afwijking een goede dan wel een slechte voorspeller is voor het verloop van de ziekte in combinatie met een van deze drie behandelingen hebben we alle chromosomale afwijkingen gecorreleerd aan de uitkomst van de behandeling. De uitkomst van de behandeling was gedefinieerd als de progressie vrije overleving. Afwijkingen die significant correleren met progressievrije overleving zouden dan als biomarker kunnen dienen bij nieuwe patiënten, waarvan we de uitkomst van de behandelingschema's nog niet weten.

We hebben 187 chromosomale afwijkingen geïdentificeerd die significant geassocieerd waren met progressievrije overleving bij ten minste één van de behandelingschema's. Voor de patiënten die behandeld waren met CAP vonden we dat een afname van het aantal kopieën van chromosoom op 5q12.1-q12.3 was geassocieerd met een slechtere progressievrije overleving. Voor de patiënten die behandeld waren met CAPIRI vonden we dat een afname van het aantal kopieën van chromosoom 18q21.33-q22.3 geassocieerd was met een betere overleving. Voor de patiënten behandeld met CAPOX-B vonden we dat een afname van het aantal kopieën van chromosoom 5q34 geassocieerd was met een slechtere progressievrije overleving.

Om in te zoomen op genen die op deze chromosomale regio's liggen hebben we data uit de wetenschappelijke literatuur gebruikt. Met deze data konden we onderzoeken of er een relatie was tussen een toe- of afname van het aantal kopieën DNA en de toe- of afname van expressie van de genen op deze gebieden. Voor 608 van de 1744 genen vonden we een positieve correlatie tussen het aantal DNA kopieën en de hoeveelheid gen expressie.

### Uitzaaiingen

In de vorige hoofdstukken beschrijven we chromosomale gebieden als potentiële biomerkers voor therapieselectie en genen als potentiële doelwitten voor antikankermiddelen. Deze potentiële biomerkers en doelwitten werden gevonden op basis van chromosomale afwijkingen in primaire tumoren. Echter, de meerderheid van de sterfgevallen door dikke darm- en endeldarmkanker zijn het gevolg van uitzaaiingen. Om die reden bestudeerden we in hoofdstuk 6 en 7 patronen van chromosomale afwijkingen in uitzaaiingen. Twintig procent van alle dikke darmkankerpatiënten heeft al uitzaaiingen op het moment van diagnose en tot 50% van de patiënten ontwikkelt deze later alsnog. Dikke darmkanker zaait het vaakst naar de lever uit (bij ongeveer 80% van dikke darmkankerpatiënten). In 40-50% van deze patiënten komen ook uitzaaiingen buiten de lever voor. Chromosomale afwijkingen zouden de voorkeur van een tumor om naar een bepaald orgaan uit te zaaien kunnen verklaren. In **hoofdstuk 6** laten we zien dat bij patiënten met dikke darm- en endeldarmkanker een toename van het chromosoom 20p11 werd geassocieerd met leverspecifieke uitzaaiingen.

Voor deze studie werden patiënten geselecteerd op basis van de locatie van de uitzaaiingen, oftewel hepatisch (naar de lever) of extrahepatisch (buiten de lever). Patiënten met een combinatie van hepatisch en extrahepatische uitzaaiingen werden uitgesloten van de studie.

Hoewel de frequenties van chromosomale afwijkingen zeer vergelijkbaar waren voor patiënten met hepatische en extrahepatische uitzaaiingen, werden er toch enkele verschillen gevonden. Patiënten met hepatische uitzaaiingen hadden significant vaker een toename van het chromosomale gebied 20p11 en significant vaker een afname van 5q12 in vergelijking met patiënten met extrahepatische uitzaaiingen. In een validatie set konden we de significant vaker voorkomende toename van 20p11 bevestigen, maar niet de afname van 5q12.

Om in te zoomen op genen met een potentiële rol in leverspecifieke uitzaaiing bij dikke darm- en endeldarmkanker bepaalden wij de effecten van een toename van 20p11 op de

expressie van de op 20p11 gelegen genen met data uit de wetenschappelijke literatuur. Met deze aanpak bleken 12 genen significant meer tot expressie te komen in tumoren met een toename van 20p11 dan zonder een toename van 20p11. Van deze 12 genen gaf C20orf3 de sterkste correlatie tussen het aantal kopieën en de hoeveelheid genexpressie. Vervolgens hebben we het eiwit C20orf3 onderzocht met behulp van immunohistochemische (IHC) kleuringen. Hieruit bleek dat ook het C20orf3 eiwit gecorreleerd was met een toename van 20p11. C20orf3 zou dus in aanmerking kunnen komen als biomarker voor uitzaaiingen naar de lever en als aangrijpingspunt voor therapie om uitzaaiing naar de lever te voorkomen.

Om het proces van uitzaaien beter te begrijpen is het ook belangrijk om verschillen in chromosomale afwijkingen tussen primaire tumoren en uitzaaiingen te bepalen. Hoewel therapieën meestal gericht zijn tegen uitzaaiingen, worden in de praktijk biomarkers voor diagnose en selectie van behandeling getest op gearchiveerd materiaal van de primaire tumor. Ook in dit proefschrift werden DNA profielen van primaire tumoren onderzocht. In **Hoofdstuk 7** hebben we aangetoond dat de patronen van chromosomale afwijkingen tussen primaire dikke darm- en endeldarmkanker en de bijbehorende uitzaaiingen van dezelfde patiënt zeer vergelijkbaar zijn en specifieke verschillen in afwijkingen zeldzaam en meestal niet-terugkerend.

Het bleek dat patronen van chromosomale afwijkingen van de meerderheid van de primaire tumoren veel meer lijken op die van de bijbehorende uitzaaiingen binnen de patiënten dan op die van de andere primaire tumoren tussen de patiënten. Door de profielen van de primaire tumoren af te trekken van de profielen van de uitzaaiingen ontdekten we in 3 uitzaaiingen van 2 patiënten een toename van het aantal kopieën van de chromosomale gebieden 6q21 en 8q24.21 (coamplificatie). Met fluorescentie in situ hybridisatie (FISH) analyse werden de amplificaties van MYC en chromosoom 6q21 bevestigd in de metastasen.

## ALGEMENE CONCLUSIE

In dit proefschrift hebben we onderzoek gedaan naar chromosomale afwijkingen in gastrointestinale tumoren en de klinische implicaties daarvan.

In een kleine serie patiënten met stadium II dikke darmkanker hebben we chromosomale afwijkingen gevonden die zouden kunnen bijdragen aan het selecteren van patiënten voor antikankermiddelen. Verder tonen we aan dat patronen van chromosomale afwijkingen bij dunne darmtumoren meer lijken op dikke darm- dan op maagtumoren, wat het behandelen van dunne darmkanker volgens een behandelingschema voor dikke darmkankerpatiënten ondersteunt. Bovendien hebben we een gedetailleerd genomisch overzicht gemaakt van uitgezaaide dikke- en endeldarm tumoren van patiënten die deel hebben genomen aan een klinische trial. Hierbij hebben we gebieden gevonden die interessante kandidaten zouden zijn om verder te valideren als biomarker voor respons op therapie. Tot slot hebben

we een gen gevonden dat van klinische waarde kan zijn in het beginstadium van dikke darmkanker omdat het met leverspecifieke uitzaaiingen wordt geassocieerd.

Alle bovengenoemde bevindingen hebben het potentieel bij te dragen aan het selecteren van behandelingschema's voor patiënten met gastrointestinale kanker, maar om deze bevindingen te bevestigen zou dit nog uitgebreider getest moeten worden in nieuwe patiëntengroepen. Echter, deze bevindingen zijn gebaseerd op afwijkingen in de primaire tumoren, hoewel antikankermiddelen gericht zijn op de uitzaaiingen. Daarom laten we ook zien dat chromosomale afwijkingen in de primaire tumor zeer vergelijkbaar zijn met die van de uitzaaiingen binnen dezelfde patiënt en dus kan de primaire tumor gebruikt worden om behandelingschema's van antikankermiddelen voor de uitzaaiing te selecteren.

Dit proefschrift is een stap op weg naar een voor de patiënt op maat gemaakte behandeling. Een combinatie van afwijkingen in het aantal DNA kopieën, promoter methylering en mutatie status is waarschijnlijk van toegevoegde waarde om voorspellende biomerkers te identificeren. De komst van "next generation sequencing" heeft dit mogelijk gemaakt. Hierdoor zal een betere keuze voor een bepaalde behandeling bij patiënten met gastrointestinale kanker in de toekomst mogelijk worden.