

## Samenvatting

In Nederland staat kanker van de dikke- en endeldarm (colorectaal carcinoom) bij mannen op de derde plaats en bij vrouwen op de tweede plaats van de meest voorkomende tumoren. Deze ziekte is de tweede meest voorkomende doodsoorzaak door kanker. Colorectaal carcinoom (CRC) wordt veroorzaakt door een opeenstapeling van genetische en epigenetische afwijkingen, die genexpressie beïnvloeden en leiden tot een afwijkende eiwitexpressie of zelfs tot een niet-functionerend eiwit waardoor cellen ongecontroleerd gedrag en groei gaan vertonen. In sporadische CRC is chromosomale instabiliteit, gekenmerkt door numerieke en structurele chromosomale veranderingen, de meest voorkomende vorm (85%) van genomische instabiliteit.

In dit proefschrift hebben we onderzocht of chromosomale afwijkingen in CRC en voorstadia hiervan, de adenomen, bijdragen aan de maligne ontaarding van adenomen, van invloed zijn op de prognose van patiënten met primaire CRC en het mogelijk maken respons op therapie in gemetastaseerd CRC te voorspellen. Hierbij is gebruik gemaakt van 'comparative genomic hybridization' (CGH), deze techniek kan chromosomale afwijkingen detecteren in het hele genoom in één enkel experiment, zonder dat celkweek nodig is. Een ander voordeel van deze techniek is dat DNA van formaline gefixeerd, paraffine ingebed weefsel gebruikt kan worden. In hoofdstuk 2-5 werd gebruik gemaakt van 'chromosome-based' CGH, wat een resolutie heeft van ongeveer 10 Mb. In hoofdstuk 6 - 8 is ingezoomd op de belangrijkste chromosomale regio's met behulp van 'array-based' CGH. Deze techniek heeft een hogere resolutie (0.1 Mb-1 Mb) en sensitiviteit waardoor we in staat waren om 'DNA copy number' afwijkingen van specifieke genen te detecteren.

**Hoofdstuk 2** bevat een uitgebreide studie naar chromosomale veranderingen in colorectaal tumoren in verschillende stadia van ontwikkeling, gericht op afwijkingen die geassocieerd zijn met de progressie van adenoom naar carcinoom. Aangezien van alle colorectale adenomen slechts 5 procent ooit kwaadaardig wordt, was het eerste doel de genetische afwijkingen te vinden die kunnen discrimineren tussen adenomen met een hoog risico en adenomen die zich niet verder ontwikkelen tot carcinoom. Het tweede doel was bestaande modellen van de adenoom-carcinoom progressie bij colorectaal kanker te verbeteren. Het totale aantal chromosomale afwijkingen correleerde met dysplasie, maar niet met mutaties in *APC* of *KRAS*. Opeenstapeling van deleties van 8p21-pter, 15q11-q21, 17p12-p13 en 18q12-q21, en van gains van 8q23-qter, 13q14-q31 en 20q13 was sterk geassocieerd met progressie van adenoom naar carcinoom, onafhankelijk van de mate van dysplasie. Dit gegeven zou kunnen worden gebruikt als een marker voor hoog risico. Hierarchische cluster analyse onthulde 3 verschillende, frequent voorkomende combinaties van

genetische afwijkingen, namelijk 17p deletie met *KRAS* mutatie, gains van 8q en 13q, en deletie van 18q met gain van 20q. Dit toont aan dat de combinatie van een beperkt aantal afwijkingen wellicht belangrijker is voor tumorprogressie dan de opeenstapeling van afwijkingen als zodanig. Verder vormen de resultaten een aanwijzing dat er meerdere onafhankelijke routes van tumorprogressie bestaan, welke mogelijk op verschillende wijze dezelfde biologische processen, zoals proliferatie, differentiatie, apoptose en invasie verstoren.

Initiatie en progressie van kanker gaat naast genetische veranderingen ook gepaard met epigenetische veranderingen zoals DNA methylering. Echter de exacte timing en relatie tussen deze veranderingen in de carcinogenese van CRC is nog niet volledig verklaard. **Hoofdstuk 3** beschrijft op welk moment promotor methylering optreedt en zijn relatie tot mutaties en chromosomale afwijkingen in normale darmmucosa, colorectale adenomen en carcinomen. De promotor methylering status van 9 tumor suppressor genen en DNA reparatie genen, die zijn geassocieerd met de ontwikkeling van CRC, werd geanalyseerd met 'methylation-specific' PCR (MSP) in dezelfde dataset als gebruikt in hoofdstuk 2. Het bleek dat promotor methylering in de meerderheid van deze genen al in grote mate aanwezig is in adenomen zonder enige histologische kenmerken van progressie en dat deze mate van methylering gelijk bleef gedurende tumorprogressie. Zelfs in morfologisch normale darmmucosa van CRC patiënten, werd promotor methylering voor de meerderheid van de bestudeerde genen gezien, alleen in een lagere frequentie dan in carcinomen. We concludeerden dat promotor methylering een vroege afwijking is tijdens het ontstaan van CRC, die eerder optreedt dan chromosomale veranderingen. Het is verleidelijk te speculeren dat promotor methylering van celcyclus controle genen geassocieerd zou zijn met initiatie van chromosomale instabiliteit. Echter voor bijvoorbeeld het celcyclus regulator gen *p16<sup>INK4A</sup>* en mitose checkpoint controle gen *CHFR* werd geen associatie gevonden tussen promotor methylering status en chromosomale instabiliteit. De laatste 10 jaar is het duidelijk geworden dat naast de poliep-kanker sequentie er een alternatieve route naar colorectaal carcinoom bestaat met een ander fenotype, het vlakke adenoom. In vergelijking met adenomateuze poliepen van dezelfde grootte, is bij vlakke adenomen vaker submucosale invasie en hooggradige dysplasie gerapporteerd. Gebaseerd op het concept dat het fenotype van een tumor wordt gedreven door zijn genotype, onderzochten we of vlakke adenomen verschillen van adenomateuze poliepen in hun patronen van chromosomale afwijkingen.

In **hoofdstuk 4** werden vlakke adenomen en carcinomen geanalyseerd en hun 'copy number' profielen werden vergeleken met die van poliepeuze adenomen geanalyseerd in hoofdstuk 2. Vlakke tumoren werden gekenmerkt door een hogere prevalentie van 18q loss en 20q gain. De combinatie 18q loss en 20q gain werd ook al gezien in een subgroep van poliepeuze colorectale tumoren in hoofdstuk 2, en de aanwezigheid van deze chromosomale afwijkingen correleerde met een hogere graad van dysplasie en een groter risico op progressie naar carcinoom. 'Multiplex

ligation-dependent probe amplification' (MLPA) werd gebruikt om afwijkingen in aantal DNA kopieën van specifieke genen op chromosoom 20 te identificeren in vlakke en poliepeuze tumoren. Het bleek dat vlakke en poliepeuze colorectale tumoren met een gain van chromosoom 20q dezelfde patronen van DNA kopieën hadden voor de individuele genen.

Adjuvante chemotherapie voor dikke darm kanker patiënten met ongunstige kenmerken, zoals aanwezigheid van lymfkliermetastasen (TNM stadium III), is succesvol gebleken. Echter adjuvante chemotherapie voor stadium II dikke darm kanker blijft controversieel. Deze groep patiënten bestaat uit een heterogene populatie, waarvan een subgroep op den duur metastasen ontwikkelt. Deze patiënten zouden baat hebben bij adjuvante chemotherapie. In **hoofdstuk 5** onderzochten we in een kleine groep colorectale carcinomen, welke chromosomale afwijkingen gerelateerd zijn aan patiënt overleving. In deze serie tumoren bleken carcinomen met een 20q gain een significant slechtere overleving te hebben in vergelijking met tumoren zonder 20q gain. We concludeerden dat 20q gain een kandidaat marker is om een slechte klinische uitkomst te voorspellen bij CRC patiënten en dat deze observatie klinisch relevant kan zijn, met name bij patiënten met stadium II dikke darm kanker.

Gain van chromosoom 20q is, zoals hierboven beschreven één van de meest voorkomende chromosomale afwijkingen tijdens progressie van adenoom naar carcinoom, in adenomen geassocieerd met agressiever klinisch gedrag, en in carcinomen gerelateerd aan een slechtere patiënt overleving. Om de belangrijkste oncogenen gelocaliseerd op dit chromosoom te identificeren hebben we in **hoofdstuk 6** een serie van 149 colorectale tumoren met behulp van array CGH en expressie microarrays geanalyseerd om gen-dosis effecten te bestuderen. Chromosoom 20q bleek frequent afwijkend in de 'progressed' adenomen en carcinomen (in 60% van de gevallen) terwijl in de 'nonprogressed' adenomen 20q gain maar in 20% van de gevallen werd gedetecteerd. Deze data bevestigen de rol van 20q gain in de progressie van adenoom naar carcinoom, zoals al eerder werd beschreven in hoofdstuk 2. Verdere analyse van 20q gain met behulp van array CGH leverde 3 belangrijke regio's op: één op 20q11.22-q11.23, en de andere twee op 20q13.32-q13.33 en 20q13.33. Analyse van veranderde mRNA expressie van genen in deze gebieden resulteerde in 7 genen (*C20orf24*, *AURKA*, *RNPC1*, *TH1L*, *ADRM1*, *C20orf20* en *TCFL5*) op chromosoom 20q die significante overexpressie vertoonden in carcinomen in vergelijking met adenomen, als gevolg van 20q gain. Toegenomen mRNA expressie van deze genen werd bevestigd met qRT-PCR en toegenomen eiwit expressie van *AURKA* (aurora kinase A) met behulp van immunohistochemie. Deze genen zouden daarom wel eens zeer belangrijk kunnen zijn in chromosomale instabiliteit gerelateerde progressie van adenoom naar carcinoom en kunnen dienen als prognose markers voor CRC. Met name *AURKA* is interessant, aangezien dit gen betrokken is in celcyclus regulatie en overexpressie is geassocieerd met centrosoom amplificatie en aneuploidie.

Ongeveer 50 procent van alle CRC patiënten ontwikkelt metastasen op afstand en zal uiteindelijk overlijden aan deze ziekte. Hoewel nieuwe therapieën hebben geleid tot betere overleving, zijn behandelingsschema's nog voor het merendeel gebaseerd op de 'one size fits all' benadering, en onvoldoende geïndividualiseerd. Voorspellende markers zijn dus ook nodig om de patiënten die een goede respons zullen hebben op deze therapieën van de rest te onderscheiden. CRC is biologisch een heterogene ziekte en juist deze heterogeniteit zou de respons op therapie kunnen beïnvloeden. In **hoofdstuk 7** werden 32 primaire tumoren van patiënten met gemetastaseerde dikke darm kanker geanalyseerd met behulp van array CGH. Het doel was profielen van DNA afwijkingen van deze tumoren te correleren met respons op eerste-lijn chemotherapie, bestaande uit een combinatietherapie van capecitabine en irinotecan. Ongesuperviseerde hiërarchische cluster analyse leverde 2 clusters van tumoren op en 'cluster membership' liet een significante correlatie met respons status zien. Patiënten die geen respons hadden op chemotherapie hadden minder chromosomale afwijkingen, met name minder losses, in vergelijking met patiënten die wel respons toonden. De meest opvallende verschillen tussen de 2 groepen waren deleties van de regio's 18p11.32-q11.2 en 18q12.1-q23, deze werden vaker in de responders aangetroffen. Deze resultaten duiden op heterogeniteit in aantal DNA kopieën over het gehele genoom binnen de groep patiënten met gemetastaseerd CRC, en suggereren dat deze verschillen relevant zijn voor de respons op chemotherapie.

Het is recent gebleken dat CRC patiënten met een *KRAS* mutatie in het tumorweefsel een slechte respons hebben op therapie met EGFR remmers, zoals cetuximab en panitumumab. Het aantal CRC patiënten met wild-type *KRAS* dat wel respondeert is echter laag. Hieruit blijkt dat er nog andere factoren naast het hebben van een *KRAS* mutatie van invloed zijn op de respons op EGFR remmers. In **hoofdstuk 8** onderzochten we of er verschillen zijn in DNA 'copy number' profielen in CRC met en zonder *KRAS* mutatie en of we konden bepalen of in de groep carcinomen met een wild-type *KRAS* heterogeniteit bestaat op het niveau van veranderingen in DNA kopieën. Daarvoor werden 64 primaire colorectale carcinomen geanalyseerd met behulp van array CGH en 34 van deze tumoren met behulp van mRNA expressie arrays. Er werd gekeken of er een associatie was van DNA kopie veranderingen met *KRAS* mutatie status, en gen-dosis effecten werden onderzocht voor relevante genen. Kandidaat markers werden gevalideerd in een onafhankelijke serie van 35 colorectale carcinomen. De meest significant verschillende regio tussen CRC patiënten met en zonder *KRAS* mutatie was op chromosoom 8q23.3-q24.3, waar *MYC* en *FAK* gelokaliseerd zijn. DNA 'copy number' gains van *MYC* en *FAK* waren significant vaker aanwezig in wild-type *KRAS* tumoren. Van deze 2 genen bleek alleen *FAK* een positieve correlatie te tonen tussen 'copy number' gain en mRNA overexpressie. *FAK* is een regulator van de RAS signalerings route. Dit zou kunnen betekenen dat continue geactiveerde RAS signaling in CRC niet alleen door *KRAS* mutatie kan

worden geïnduceerd, maar ook door FAK overexpressie als resultaat van een gen-dosis effect. Dit leidt tot de hypothese dat CRC patiënten met een wild-type *KRAS* en een 'copy number' gain van *FAK* mogelijk niet zullen responderen op anti-EGFR therapie, net als CRC patiënten met een *KRAS* mutatie.

## Toekomstperspectieven

In dit proefschrift werden 7 kanker geassocieerde DNA 'copy number' veranderingen beschreven, die sterke indicatoren zijn voor progressie van colorectale adenomen naar maligniteit en daardoor als hoog risico markers gebruikt kunnen worden.

De meest interessante chromosomale afwijking is gain van chromosoom 20q, omdat dit niet alleen een van de meest frequente chromosomale afwijkingen in de progressie van adenoom naar carcinoom is, maar ook geassocieerd is met een groep van poliepeuze en vlakke adenomen met een agressiever fenotype. Bovendien hadden patiënten met een 20q gain een slechtere overleving. Dus genen gelokaliseerd op 20q, of hun eiwit, kunnen mogelijk fungeren als markers voor vroege detectie van CRC in ontlasting of bloed. Anderzijds kunnen ze ook fungeren als mogelijke nieuwe targets voor farmacologische interventie. In hoofdstuk 6 vonden we 7 genen (*C20orf24*, *AURKA*, *RNPC1*, *THIL*, *ADRM1*, *C20orf20* en *TCFL5*) gelokaliseerd op chromosoom 20q die overexpressie tonen op basis van een gen-dosis effect. *AURKA* overexpressie werd bevestigd op eiwit niveau met behulp van immunohistochemie. Ten tijde van deze studie waren er voor de eiwitten van de 6 andere genen helaas nog geen voor immunohistochemie geschikte antilichamen. Momenteel worden antilichamen tegen deze eiwitten ontwikkeld. Tevens zijn er functionele studies gaande om de biologische relevantie van deze 7 genen te onderzoeken.

CRC is biologisch een heterogene ziekte op DNA, RNA en eiwit niveau en dat kan respons op chemotherapie beïnvloeden. Onze data en die van anderen laten zien dat respons op therapie voorspelt kan worden aan de hand van DNA 'copy number' profielen. In hoofdstuk 7 beschreven we dat CRC patiënten met loss van chromosoom 18 een betere respons hadden op combinatietherapie van capecetabine en irinotecan. Chromosoom 18 bevat echter vele genen en welke van deze verantwoordelijk zijn voor het respons fenotype is niet bekend. Een uitgebreide validatie studie is momenteel gaande om te bevestigen of onze observaties ook echt van waarde kunnen zijn in de klinische praktijk bij selectie van patiënten voor chemotherapie. In deze validatie studie wordt gebruik gemaakt van een array CGH platform met een nog hogere resolutie, zodat we meer in detail kunnen kijken welke genen afzonderlijk geassocieerd zijn met respons op therapie. In hoofdstuk 8 ontdekten we dat in CRC met wild-type *KRAS* 'copy number' gain van *FAK* een potentiële marker

is voor respons op EGFR remmers. Ook deze observatie moet verder gevalideerd worden in een serie van CRC patiënten die behandeld zijn met cetuximab of panitumumab om te bewijzen of 'copy number' gain van *FAK* ook echt respons op deze therapie kan voorspellen.

Hoewel histopathologie altijd de hoeksteen van de diagnostiek zal blijven, zullen biologische kenmerken van tumoren onvermijdelijk belangrijk worden als diagnostische, prognostische en voorspellende markers. De nieuwe techniek 'massively parallel sequencing' (MSP) zal array CGH waarschijnlijk gaan verdringen als de methode van keuze voor high throughput genomics. MSP biedt de mogelijkheid om in één enkel experiment het gehele genoom te screenen op puntmutaties, DNA copy number afwijkingen en rearrangements. In de nabije toekomst, zal het mogelijk worden om de complexiteit van de biologie van CRC nog dieper te doorgronden en van de verkregen informatie gebruik te maken om kosten effectieve testen te ontwikkelen voor betere diagnostiek en op maat gemaakte behandelingschema's.