



Chapter 14

Summary in Dutch

14.1 SAMENVATTING

Ondanks de dalende incidentie cijfers van maagkanker is het wereldwijd nog steeds de op een na meest frequente oorzaak van sterfte aan kanker. Patiënten kunnen alleen genezen worden wanneer bij operatie de hele tumor kan worden verwijderd. Maagkanker geeft meestal pas symptomen wanneer de ziekte al een vergevorderd stadium heeft bereikt, waardoor volledige operatieve verwijdering van de tumor vaak niet meer mogelijk is. Een van de belangrijkste factoren die bijdragen aan een hoger risico op maagkanker is infectie met de bacterie *H. pylori*. Deze infectie leidt tot chronische actieve ontsteking van het maagslijmvlies, gevolgd door atrofie van dit slijmvlies, intestinale metaplasie en intraepitheliale neoplasie. Dit zal uiteindelijk leiden tot een invasief carcinoom. Naast infectie met *H. pylori* zijn er andere omgevingsfactoren, bijvoorbeeld in de voeding, en erfelijke factoren bekend die het risico op maagkanker beïnvloeden.

Maagtumoren vertonen vaak chromosomale instabiliteit, wat resulteert in verlies of toename van delen van een chromosoom of soms zelfs hele chromosomen in tumor celkernen. Maagkanker is een heterogene ziekte op genomisch niveau en verschillende patronen van het aantal DNA kopieën kunnen ten grondslag liggen aan verschillen in klinisch gedrag en overleving van de patiënt. Array comparative genomic hybridization (array CGH) is een uitermate geschikte techniek om patronen van afwijkingen in het aantal DNA kopieën in kankercellen te bestuderen. Array CGH is een kostbare techniek en daarom is het belangrijk om vooraf te kunnen inschatten of de kwaliteit van het te onderzoeken DNA goed genoeg is. Hoge kosten beperken de toepassing van de techniek. DNA afkomstig van formale gefixeerde en in paraffine ingebed (FFPE) materiaal kan namelijk van suboptimale kwaliteit zijn en daardoor ongeschikt voor het verkrijgen van hoge kwaliteit array CGH resultaten. *Hoofdstuk 2* beschrijft dat isothermale amplificatie een betrouwbare voorspeller is om genomische DNAs te selecteren die goede array CGH resultaten zullen opleveren. In *hoofdstuk 3* beschrijven we een manier van uitvoeren van array CGH experimenten die het hybridiseren van een referentie kanaal in elk experiment overbodig maakt. Op deze manier kunnen experimentele kosten worden gereduceerd. We hebben aangetoond dat het mogelijk is om twee test monsters te hybridiseren op één array en dat het referentie kanaal van een andere array kan worden gebruikt om profielen van aantallen DNA kopieën te verkrijgen. Deze methode kan worden gebruikt om afwijkingen in kopie aantallen (CNAs) en variaties in kopie aantallen (CNVs) te onderscheiden. Dit is in toenemende mate belangrijk geworden aangezien CNVs makkelijker detecteerbaar zijn geworden met de huidige hoge resolutie oligonucleotide gebaseerde platformen, in tegenstelling tot bijvoorbeeld de BAC array platformen die tot dusver zijn gebruikt, ook in dit proefschrift.

In *hoofdstuk 4* hebben we array CGH gecombineerd met mRNA expressie analyse met behulp van microarrays, om nieuwe kandidaat tumor suppressor genen te ontdekken die betrokken zijn bij maagkanker. Door het gebruik van siRNAs gericht tegen *UPF1*, een van de sleutel regulatoren van het 'nonsense-mediated decay' (NMD) systeem, hebben we het NMD mechanisme in twee maagkanker cellijnen geremd. Dit heeft geresulteerd in de opeenstapeling van vermoedelijk getrunceerde (d.w.z. gemuteerde) transcripten. We hebben microarray expressie analyses uitgevoerd door cellen die waren getransfecteerd met siRNA gericht tegen *UPF1* te hybridiseren tegen cellen die waren getransfecteerd met niet-specifieke siRNA duplexes (CVII). Genen die verschillend tot expressie komen in deze monsters zijn mogelijk kandidaat gemuteerde tumor suppressor genen. We hebben bij 11 genen met behulp van sequencing onderzocht of er inderdaad specifieke mutaties aanwezig waren, maar we hebben deze niet kunnen vinden.

In *hoofdstuk 5* hebben we voorloper laesies van maagkanker, die de potentie hebben om maligne te ontaarden, bestudeerd met array CGH om de moleculaire pathogenese van maagkanker beter te leren begrijpen. We hebben twee morfologisch verschillende type maag adenomen, te weten intestinaal-type en 'pyloric gland' adenomen, bestudeerd om te onderzoeken of verschillende biologische mechanismen ten grondslag liggen aan het ontstaan van deze twee adenoom types. We hebben aangetoond dat 'gains' op chromosomen 8, 9q, 11q en 20, en 'losses' op chromosomen 5q, 6, 10 and 13 al in een vroeg stadium van maagkanker ontwikkeling ontstaan. Bovendien hebben we aangetoond dat, ondanks de morfologische verschillen, deze twee types adenomen vergelijkbaar zijn in afwijkingen in het aantal DNA kopieën.

Volgens de Laurén classificatie zijn twee belangrijke histologische type maagtumoren te onderscheiden. Het is nog steeds omstrede of deze twee histologische types verschillen in afwijkingen in het aantal DNA kopieën. Sommige studies hebben verschillen in patronen van chromosomale afwijkingen beschreven en andere studies vergelijkbare patronen. Naast deze types kan er een derde histologisch type, het 'mixed' type, worden onderscheiden, dat een tweevoudig differentiatie patroon vertoont. In *hoofdstuk 6* hebben we de afwijkingen in het aantal DNA kopieën in beide componenten binnen het 'mixed' type maagkanker afzonderlijk geanalyseerd met behulp van array CGH. We hebben vergelijkbare patronen van chromosomale afwijkingen gevonden in beide histologische componenten binnen een tumor, wat aantoont dat de morfologische verschillen niet worden veroorzaakt door veranderingen in het aantal DNA kopieën.

Hoewel maagkanker vooral voorkomt in de leeftijdsgroep van 50-70 jaar, krijgt een aanzienlijk aantal patiënten maagkanker op jonge leeftijd. *Hoofdstuk 7* brengt de genetische verschillen tussen maagtumoren van jonge en oudere patiënten in kaart. We hebben maagtumoren van 17 jonge (<50 jaar) en 29 oudere (>70 jaar) patiënten geanalyseerd met behulp van array CGH. Hierarchische cluster analyse resulteerde in drie clusters met verschillende profielen van afwijkingen in het aantal DNA kopieën die significant correleerden met leeftijdsgroep. Cluster 1 bestond voornamelijk uit jonge patiënten en clusters 2 en 3 vooral uit oudere patiënten. We hebben aangetoond dat de chromosomale regio's 11q23.3 en 19p13.3 de meeste bijdrage leveren aan de verschillen in genomische profielen met betrekking tot de leeftijd van het ontstaan van maagkanker. Deze bevindingen vormen een aanwijzing dat het pathogenetische mechanisme van maagtumoren van jonge en oudere patiënten verschillend is.

In *hoofdstuk 8* hebben we bestudeerd of maagtumoren afkomstig van Zuid Afrikaanse en West Europese patiënten verschillen in patronen van genetische instabiliteit. De prevalentie van infectie met *H. pylori* is hoog, maar de incidentie van maagkanker is laag in Zuid Afrika. Dit fenomeen wordt het Afrikaanse enigma genoemd. Er bleek een hogere frequentie van microsatelliet instabiliteit aanwezig in maagtumoren van Zuid Afrikaanse patiënten dan in maagtumoren van West Europese patiënten. Door middel van array CGH en hiërarchische cluster analyse hebben we verschillende patronen van veranderingen in het aantal DNA kopieën geobserveerd. Dit kan betekenen dat patiënten afkomstig uit verschillende geografische gebieden een verschillend mechanisme van maagkanker ontwikkeling hebben.

Vervolgens hebben we onderzocht of chromosomale afwijkingen in maagkanker kunnen worden gebruikt om subgroepen van patiënten te identificeren die een goede prognose hebben en mogelijk geen baat hebben bij intensieve therapieën, zoals uitgebreide operatieve lymfklier verwijdering of (neo)adjuvante chemo- of radiotherapie. Vorige studies, die gebruik hebben gemaakt van array CGH



en hiërarchische cluster analyse, leverden aanwijzingen voor een significante correlatie tussen het patroon van DNA kopie afwijkingen en lymfklier status. In *hoofdstuk 9* hebben we 206 maagtumoren met behulp van array CGH geanalyseerd om een overzicht te krijgen van de afwijkingen in aantallen DNA kopieën in maagkanker en om te achterhalen welke chromosomale afwijkingen correleren aan lymfklier metastasering en overleving van de patiënt. We hebben gevonden dat 'losses' op chromosoom 5q, 10q en 14q significant vaker voorkomen in maagtumoren die niet zijn uitgezaaid naar de lymfklieren. We hebben een subgroep van maagtumoren gevonden, gemarkeerd door 'losses' op chromosomen 5q11-q31.3 en 14q32.11-q32.33, die een goede overleving hebben na alleen operatieve behandeling.

In *hoofdstuk 10* hebben we profielen van veranderingen in aantal DNA kopieën van 63 maagtumoren geanalyseerd door middel van array CGH en Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) om gen-specifieke afwijkingen in aantallen DNA kopieën te detecteren. Deze gen-specifieke afwijkingen hebben we gecorreleerd aan klinisch pathologische data. In deze studie vonden we dat 'gain' op chromosoom 20 een significante correlatie vertoond met het histologische type van de tumor en met lymfklier metastasering. 'Gain' in DNA kopie aantal van het gen *ZNF217*, gelokaliseerd op chromosoom 20q13.2, was gedetecteerd in intestinaal en 'mixed' type maagkankers, maar niet in diffuus type maagkankers. 'Gain' in DNA kopie aantal van het gen *TNFRF6B*, gelokaliseerd op 20q13.3, was significant gecorreleerd aan lymfklier metastasen in maagkankers.

In de hoofdstukken 11 en 12 hebben we andere prognostische 'markers' voor maagkanker patiënten beschreven. In *hoofdstuk 11* hebben we DNA ploïdie status gebruikt om de prognose van maagkanker patiënten te voorspellen. We hebben 221 maagtumoren geanalyseerd door middel van DNA flow cytometrie en DNA beeld cytometrie. We hebben aangetoond dat DNA ploïdie status verkregen door middel van DNA beeld cytometrie beter is in het voorspellen van prognose vergeleken DNA ploïdie status verkregen door middel van DNA flow cytometrie. Bovendien hebben we gevonden dat DNA ploïdie status in combinatie met TNM (tumor-node-metastase) classificatie beter is in het voorspellen van overleving dan beide variabelen alleen. In *hoofdstuk 12* hebben we laten zien dat promotor hypermethylering status van *MAL* kan worden gebruikt als prognostische marker. We hebben aangetoond dat promotor hypermethylering van dit gen correleert met verminderde expressie van het mRNA. Dit suggereert dat *MAL* een kandidaat tumor suppressor gen is, betrokken bij maagkanker.

14.2 CONCLUSIES EN TOEKOMSPERSPECTIEVEN

Biologische mechanismen en profileren van maagkanker

Kennis over de moleculaire pathogenese van maagkanker is beperkt. Meer inzicht in de biologische mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van maagkanker is belangrijk voor de ontwikkeling van preventieve maatregelen, voor het vinden van 'markers' voor vroege opsporing van maagkanker, voor betere classificatie van maagkanker in relatie tot de therapie keuze en voor het vinden van nieuwe aangrijpingspunten voor nieuwe geneesmiddelen met als doel de mortaliteit door maagkanker te verminderen.

Chromosomale instabiliteit is een van de kenmerken van solide tumoren, waaronder maagkanker, en resulteert in 'gains' en 'losses' van delen van chromosomen of zelfs hele chromosomen, ook wel DNA kopie veranderingen genoemd. Microarray comparative genomic hybridization (array CGH) is een recent ontwikkelde krachtige techniek om deze patronen van afwijkingen van het

aantal DNA kopieën te bestuderen. In één experiment kan op hoge resolutie informatie worden verkregen over het hele genoom. Bovendien kan array CGH worden toegepast op DNA afkomstig van formaline gefixeerde en in paraffine ingebed (FFPE) weefsels. Dit maakt het mogelijk om grote series klinisch archief materiaal te bestuderen met vaak gedetailleerde klinische pathologische informatie en gegevens over klinisch beloop. Hoge experimentele kosten zijn een van de belangrijkste beperkingen voor het gebruik van array CGH. Daarom hebben we, in *hoofdstuk 2 en 3*, verschillende strategieën toegepast om experimentele kosten te reduceren om op die manier array CGH meer geschikt te maken voor het bestuderen van grote series klinisch materiaal. Ondanks dat array CGH erg geschikt is om afwijkingen in aantallen DNA kopieën te bestuderen, levert deze techniek geen informatie over afwijkingen die niet resulteren in numerieke DNA afwijkingen, zoals mutaties, translocaties en verlies van heterozygositeit (LOH). Andere technieken kunnen worden gebruikt om deze afwijkingen te bestuderen.

Op het gebied van 'high throughput genomics' zijn veel ontwikkelingen gaande. Methoden die nog zeer geavanceerd waren aan het begin van dit promotie traject, zoals BAC arrays, zijn vervangen door nieuwe platformen zoals hoge resolutie oligonucleotide gebaseerde array CGH. Het feit dat de grote studies van dit promotie project zijn gedaan op BAC arrays en tegelijkertijd methodologische vernieuwingen worden beschreven gebruik makend van oligonucleotide arrays, illustreert deze situatie. Nieuwe methoden om DNA kopie aantallen te meten worden met hoge snelheid ontwikkeld, vergelijkbaar met de ontwikkeling van computers in de jaren 90 van de vorige eeuw.

De laatste genoom-brede technologieën op het gebied van de genomics betreft 'massively parallel sequencing' (MSP). Deze techniek biedt de mogelijkheid om het hele genoom te bestuderen op numerieke DNA afwijkingen, punt mutaties, inserties, deleties en translocaties, in een enkel experiment. De beperkingen door experimentele kosten zijn voor MSP echter nog meer uitgesproken dan voor array CGH. In de nabije toekomst zal deze techniek ook op tumor materiaal worden toegepast, wat een heel nieuw inzicht in biologische kennis over het kanker genoom zal geven.

Maagkanker is het resultaat van een wisselwerking tussen genetische en epigenetische veranderingen die leiden tot ontregeling van cruciale biologische processen in de cel. Genetische veranderingen leiden vaak tot chromosomale 'gains' en 'losses' en kunnen leiden tot het activeren van oncogenen en het uitschakelen van tumor suppressor genen, die vervolgens leiden tot maagkanker ontwikkeling en progressie. Er is grote variatie in maagkanker patiënten wat betreft tumor type en genetische en omgevingsfactoren. Daarom ontwikkelt maagkanker in verschillende patiënten niet volgens precies hetzelfde biologische mechanisme, wat kan leiden tot verschillen in fenotype en klinisch beloop. In dit proefschrift hebben we aangetoond dat patronen van chromosomale afwijkingen significant correleren met leeftijd en afkomst van maagkanker patiënten. Bovendien hebben we met behulp van array CGH in voorloper laesies van maagkanker patronen van DNA afwijkingen gevonden. Dit suggereert dat de onderliggende veranderingen waarschijnlijk vroeg in de ontwikkeling van maagkanker plaatsvinden.

Met BAC array CGH worden vooral grote genomische regio's met een 'gain' of 'loss' gedetecteerd. Dit maakt het moeilijk om individuele genen aan te wijzen die bijdragen aan de ontwikkeling of progressie van maagkanker. Een eerste stap richting het aanwijzen van kandidaat genen is beschreven in *hoofdstuk 10 en 12*. Door middel van MLPA analyse hebben we aangetoond dat binnen een regio van chromosomale 'gain' specifieke genen vaker een toename in aantal DNA kopieën vertonen in vergelijking tot andere genen in die regio. 'Gain' in het aantal DNA kopieën



van specifieke genen konden worden gecorreleerd met klinische pathologische data. De volgende stap is om te onderzoeken of deze gen-specifieke DNA afwijkingen een biologisch effect hebben op mRNA of eiwit expressie niveau.

Een andere benadering in het ontrafelen van vermoedelijk tumor suppressor genen betrokken bij maagkanker, is het bestuderen van epigenetische veranderingen, zoals promotor hypermethylering. We hebben aangetoond dat promotor hypermethylering van het gen *MAL* correleert met verminderde mRNA expressie van dit gen. Om de biologische rol van vermoedelijke oncogenen of tumor suppressor genen verder te onderzoeken, zijn functionele studies noodzakelijk. Op dit moment zijn we functionele studies aan het uitvoeren voor het *MAL* gen in maagkanker cel lijnen. Door maagkanker cellen te behandelen met 5-aza-2'-deoxycytidine verwachten we dat het *MAL* gen wordt gedemethyleerd met overexpressie als gevolg. Dit zou het bewijs leveren dat 'silencing' van het gen een gevolg is van promotor hypermethylering. Tevens zijn we studies aan het opzetten om maagkanker cel lijnen te transfecteren met een vector die het *MAL* gen bevat, zodat we kunnen onderzoeken of overexpressie van *MAL* de mogelijkheid tot verankeringonafhankelijke groei, migratie en invasieve groei van maagkanker cellen beperkt. Om de functie van *MAL* als tumor suppressor gen in vivo te bewijzen, zullen we uiteindelijk maagkanker cel lijnen die zijn getransfecteerd met *MAL* in muizen moeten injecteren om te kunnen evalueren of deze cellen de mogelijkheid hebben verloren tot tumorvorming.

Klinische implicaties

Secundaire preventie, of vroege opsporing, kan worden gebruikt om de hoge sterfte door maagkanker te reduceren. In landen met hoge prevalentie, zoals Japan, wordt een vorm van bevolkingsonderzoek toegepast met behulp van endoscopie om maagkanker sterfte te reduceren. In andere landen, zoals Nederland, is de incidentie van maagkanker lager, waardoor een bevolkingsonderzoek niet opportuun is. Mogelijk zou het wel relevant zijn om specifieke risicogroepen, zoals patiënten met intestinale metaplasie van het maagslijmvlies, frequent te controleren. Echter, strategieën om maagkanker sterfte te verminderen in Nederland zijn vooral gericht op het verbeteren van therapeutische interventies zoals chirurgie en (neo)adjuvante chemo- of chemoradiotherapie.

In Nederland betekent chirurgische behandeling vaak operatieve verwijdering van de maag met een beperkte (D1) lymfklier dissectie, omdat de uitgebreide (D2) lymfklier dissectie is geassocieerd met een hogere morbiditeit en mortaliteit. Een subgroep patiënten met regionale lymfklier metastasering heeft echter mogelijk baat bij een D2 dissectie. Patiënten met maagkanker zonder lymfklier metastasen zullen echter geen voordeel hebben van een D2 dissectie, terwijl ze wel het risico zouden hebben van meer morbiditeit en mortaliteit. Bovendien hebben maagkanker patiënten met een goede overleving nauwelijks baat bij intensieve behandelingen, en zullen waarschijnlijk meer nadelige effecten ondervinden. Het identificeren van deze subgroepen van patiënten met goede overleving kan worden gebruikt om patiënten te selecteren die waarschijnlijk geen voordeel hebben bij aanvullende intensieve behandelingen.

In de kliniek zal uiteindelijk de array CGH techniek misschien niet de techniek van keuze blijken te zijn voor het bepalen van DNA kopie status, maar zal een PCR gebaseerde test, zoals MLPA, mogelijk meer geschikt zijn. Voor MLPA is minder DNA nodig, het is makkelijker uit te voeren en het maakt de detectie van gen-specifieke afwijkingen in het aantal DNA kopieën mogelijk. In *hoofdstuk 10* hebben we laten zien dat deze techniek kan worden gebruikt om gen-specifieke afwijkingen in het DNA te correleren met lymfklier status. Verdere optimalisatie is echter nodig. In *hoofdstuk 9* hebben we aangetoond dat 'losses' op chromosoom 5q en 14q significant vaker worden gedetecteerd in een subgroep van maagtumoren met een goede overleving na alleen operatieve behandeling. Klinisch kan het erg belangrijk worden om deze subgroep te identificeren, en mogelijk ook andere

moleculaire maagkanker subgroepen, zodat de therapeutische behandelingen kunnen worden gebaseerd op de tumor biologie. In dit geval zou dit betekenen het afzien van bijvoorbeeld intensieve chemo- en/of radiotherapie. In de *hoofdstukken 11 en 12* hebben we aangetoond dat het mogelijk is om op basis van DNA ploïdie status en status van promotor hypermethylering de prognose van maagkanker patiënten te voorspellen. Het combineren van 'markers' zou een betere voorspelling van het ziekteverloop kunnen geven en zal verder moeten worden uitgezocht. Bij het gebruik van dergelijke biologische criteria voor het kiezen van de meest optimale behandeling voor de individuele patiënt, moeten we rekening houden met het feit dat er subgroepen patiënten bestaan met verschillende moleculaire achtergronden wat de uitkomst van een dergelijk moleculaire of genetische test kan beïnvloeden. Zoals we in *hoofdstuk 7 en 8* hebben aangetoond, hebben jonge en oudere patiënten verschillende patronen van 'gains' en 'losses', maar ook patiënten van verschillende geografische gebieden hebben verschillende patronen van genomische instabiliteit. Het kan daarom nodig zijn om een moleculaire test te optimaliseren voor elke subgroep patiënten.

De biologische informatie die wordt verkregen uit maagkanker profielen van DNA afwijkingen kan ook worden gebruikt voor het voorspellen van succesvolle therapeutische behandelingen. Recent zijn er gerandomiseerde klinische trials (CRITICS, MAGIC-B) gestart in Nederland en in Groot-Brittannië, waarin de rol van postoperatieve chemo-radiotherapie in combinatie met preoperatieve chemotherapie en verschillende combinaties van chemotherapie worden geëvalueerd. Het correleren van profielen van DNA afwijkingen in het tumorweefsel met de respons op therapie, kan nieuwe diagnostische testen opleveren die kunnen worden gebruikt om de respons op therapie te voorspellen. Deze studies zullen in de toekomst resulteren in meer op maat gemaakte behandelingsschema's, en op die manier naar verwachting bijdragen aan het verminderen van de hoge mortaliteitscijfers van maagkanker en/of negatieve bijwerkingen van de behandeling verminderen.



