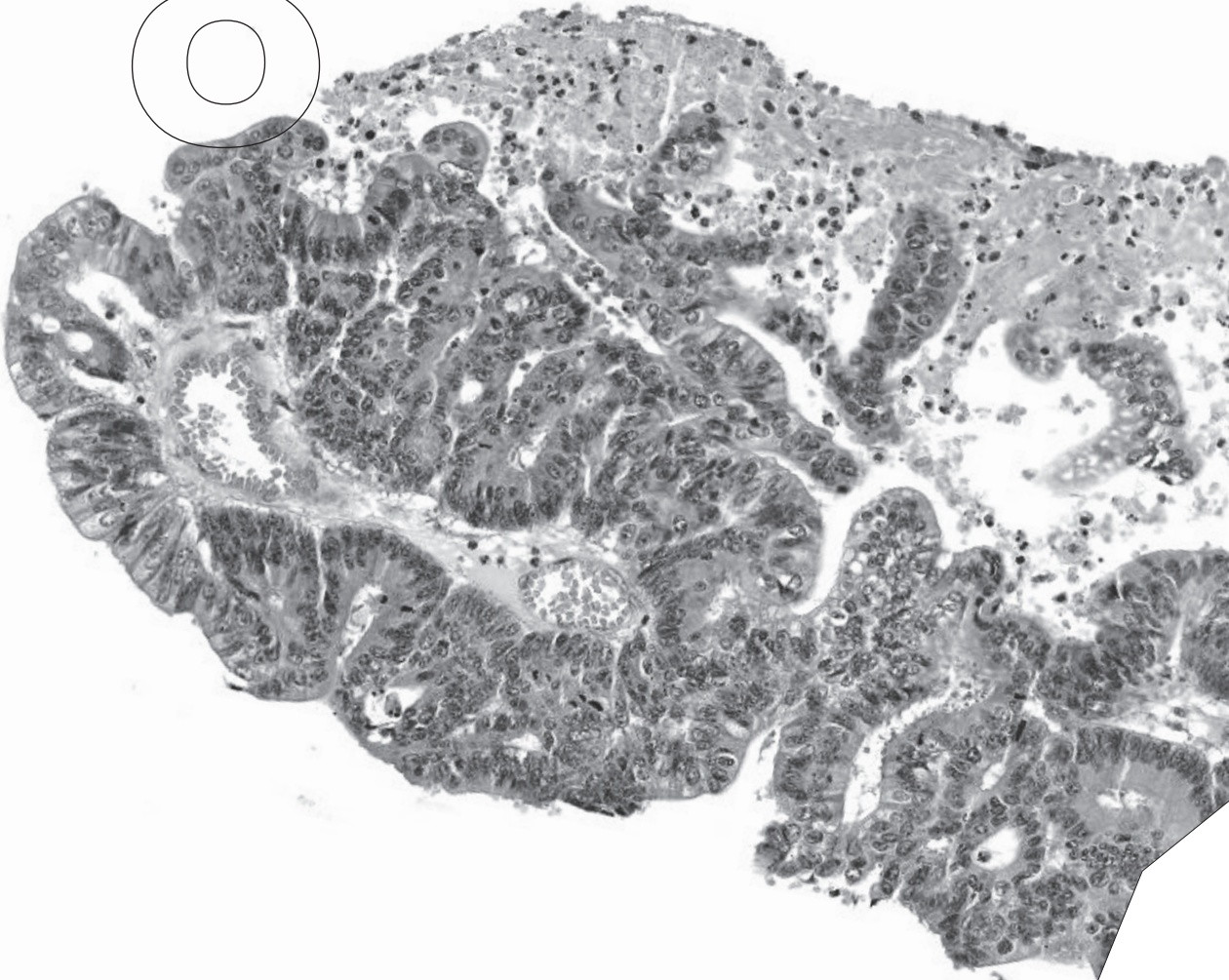
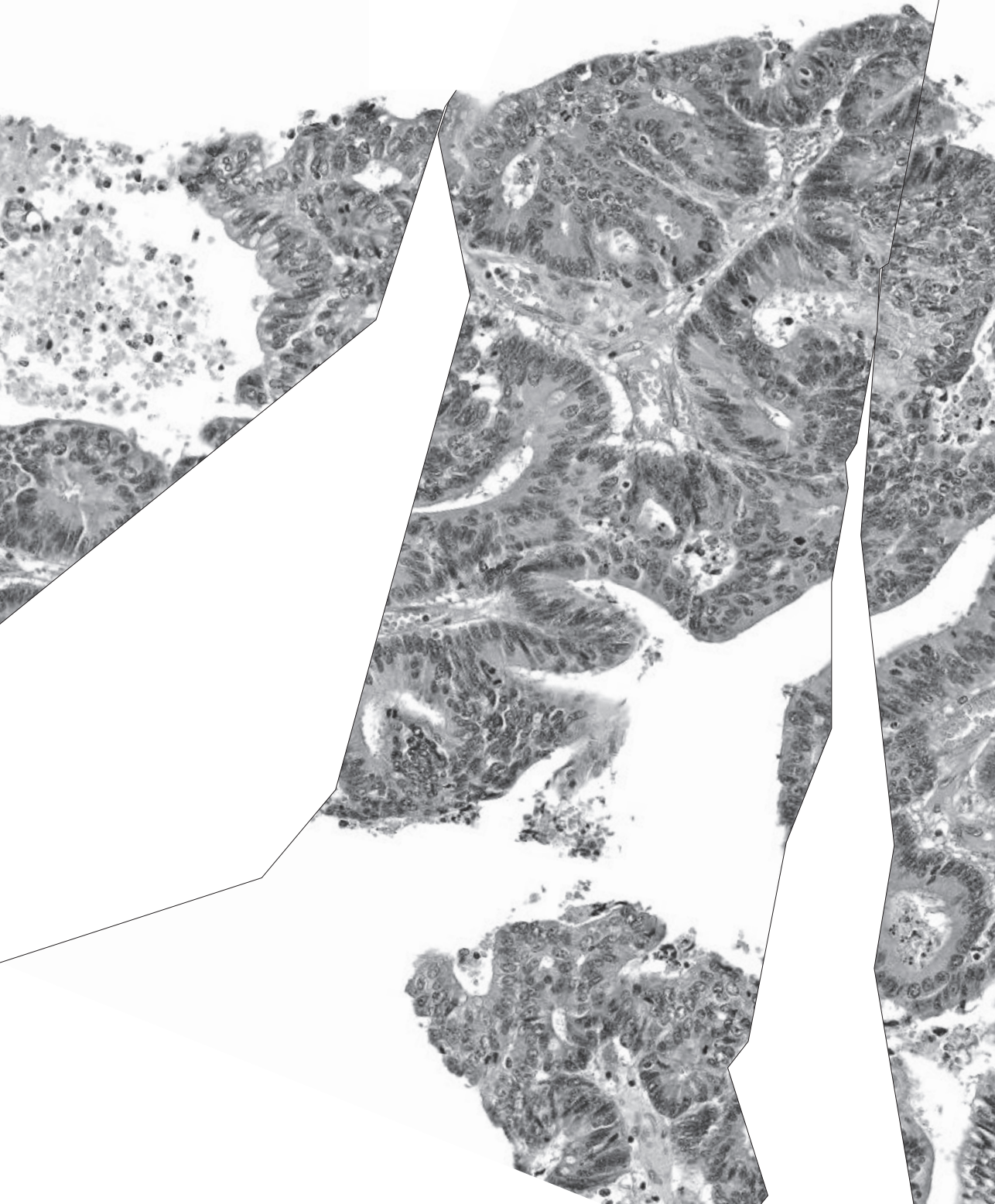


8



Nederlandse samenvatting



Diagnose en behandeling van colorectaal kanker

Dikkedarmkanker, ook wel colorectaal kanker genoemd, is een veel voorkomende ziekte. Wereldwijd worden er jaarlijks meer dan 1,3 miljoen nieuwe patiënten gediagnostiseerd. Ongeveer de helft van deze patiënten zal aan de gevolgen van de ziekte overlijden. Om de prognose van de patiënten in te schatten, wordt in de kliniek een tumor classificatie systeem gehanteerd die gebruik maakt van de grootte van de tumor en aanwezigheid van uitzaaiingen naar lymfeklieren en/of andere organen. Deze classificatie van tumoren staat bekend als het TNM-systeem. De in te zetten therapie wordt voornamelijk bepaald door het ziektestadium die gebaseerd is op de TNM classificatie. Omdat uitgezaaide tumoren een slechtere overleving voor de patiënt geven in vergelijking met colorectaal kanker in een vroeger stadium, is het van belang om de kanker vroeg op te sporen. Het bevolkingsonderzoek voor opsporing van colorectaal kanker, dat recent in Nederland is ingevoerd, beoogt deze vroege en nog goed te behandelen opsporing van tumoren.

Tumoren die niet zijn uitgezaaid, stadium I-II, worden over het algemeen chirurgisch behandeld zonder dat aanvullende chemotherapie noodzakelijk is. De kans op overlijden aan de ziekte bij een gediagnosticeerd stadium II colorectale tumor is ongeveer 20%. Wanneer de tumor is gemetastaseerd (= uitgezaaid) naar de lymfeklieren (stadium III) is deze kans op overlijden aan de ziekte binnen 5 jaar na behandeling gestegen tot ongeveer 40%. Deze tumoren worden meestal behandeld met conventionele chemotherapie naast chirurgische behandeling. Patiënten die niet meer voor operatie in aanmerking komen door gemetastaseerde ziekte (stadium IV) kunnen eventueel aanvullend behandeld worden met medicijnen gericht op specifieke tumormoleculen (bijv. anti-EGFR). Het effect van deze behandeling kan vooraf worden ingeschat op basis van DNA mutatie analyse van het gen waarop de therapie is gericht (bijv. KRAS).

Afwijkingen in het genoom van colorectaal kanker

De meeste colorectale tumoren ontstaan vanuit de cellen die de binnenzijde van de dikke darm bekleden. Dit wordt veroorzaakt door veranderingen in het DNA. Colorectaal kanker wordt daarom ook wel een genetische ziekte genoemd. Algemeen wordt aangenomen dat een maligne colorectaal carcinoom (=kwaadaardige en dus invasief groeiende tumor) ontwikkelt via een benigne (=goedaardige) tumor, een adenoom. Dit proces wordt gekenmerkt door een toename van mutaties (=afwijkingen) in het DNA van de tumor cel. De DNA mutaties kunnen de normale functie van genen beïnvloeden wat vervolgens kan leiden tot progressie van de ziekte. De veranderingen in het DNA ontstaan door instabiliteit van het genoom. Op dit moment worden op basis van verschil in genoom instabiliteit twee groepen van colorectale tumoren onderscheiden. Deze onderverdeling is relevant omdat deze tumoren verschillen in tumorbiologie en prognose. Ongeveer 15% van de colorectale kankers is microsatelliet instabiel (MSI). Bijna alle tumoren die microsatelliet stabiel (MSS) zijn, zijn chromosomaal instabiel (CIN). Mutaties in het DNA kunnen *small nucleotide variants* (SNVs; tot enkele baseparen) betreffen, maar ook grote delen van chromosomen waarbij het aantal kopieën van een of meerder chromosomen afwijkend is, ook wel *copy number aberrations* (CNAs) genoemd. Bij CNAs is mogelijk ook de structuur van het chromosoom

afwijkend, een *structural variants* (SV), doordat het chromosoom gebroken is en eventueel door het reparatie mechanisme weer is samengevoegd met een ander deel dan het originele deel.

In colorectaal kanker zijn genen die aangedaan zijn door chromosomale breuken nog weinig bestudeerd. Het in kaart brengen van deze gen afwijkingen zou een beter inzicht kunnen verschaffen in het gedrag van individuele tumoren. Bovendien kan deze informatie in de toekomst mogelijk worden gebruikt om beter onderscheid te maken tussen colorectaal kanker patiënten met een slechte dan wel een goede prognose. Ook zou op basis van het profiel aan DNA afwijkingen bepaalde therapieën kunnen worden geselecteerd waarop de tumor goed zal reageren.

Doel van dit proefschrift

Dit proefschrift heeft tot doel om DNA afwijkingen in colorectale tumoren te bestuderen met de focus op genen met chromosomale breuken en het biologische en klinische effect daarvan op de ziekte ontwikkeling.

Detectie en relevantie van chromosomale breekpunt genen in colorectaal kanker

In dit proefschrift hebben we voor het vaststellen van genen die aangedaan zijn door chromosomale breuken gebruik gemaakt van DNA CNA profielen van colorectale tumoren. Deze DNA CNA profielen zijn bepaald door gebruik te maken van een platform met ongeveer 180.000 meetpunten (*array-comparative genomic hybridisation*; aCGH). Wanneer tussen delen van hetzelfde gen een verschil in het aantal aanwezige kopieën (CNAs) is te zien en het gen dus is geassocieerd met een chromosomaal breekpunt, noemen we dit aangedane gen een breekpunt gen. Om identificatie van breekpunt genen systematisch uit te kunnen voeren, hebben we een algoritme ontwikkeld (**hoofdstuk 2**). Dit algoritme omvat zowel de identificatie van chromosomale breuken, de aangedane genen alsook de statistiek om vast te stellen welke veranderingen in een grote groep tumoren non-random voorkomen (vaker dan op basis van toeval het geval zou zijn). Dit algoritme, GeneBreak, is ook gebruikt voor de analyse van de tumoren beschreven in de **hoofdstukken 3-5**.

In **hoofdstuk 3** hebben we in een groep van 352 colorectale tumoren gekeken welke genen er non-random zijn aangedaan door chromosomale breekpunten. Dit leverde een totaal van 748 genen op die vaker dan op basis van een toevalbevinding gebroken zijn. Van deze 748 genen waren er 170 in meer dan 3% van de tumoren aangedaan, wat laat zien dit type afwijking vaak voorkomt in colorectaal kanker. Naast het detecteren van de breekpunt genen, hebben we in dit hoofdstuk ook laten zien dat een deel van deze afwijkingen mogelijk functioneel bijdraagt aan het ontstaan van de tumor, naast de bekende belangrijke DNA afwijkingen, in plaats van dat deze breekpunten toch het 'bijproduct' zijn van de instabiliteit van het genoom zonder impact op tumorontwikkeling. Bovendien hebben we laten zien dat met classificatie van deze tumoren op basis van de DNA afwijkingen een van de vier subtypes een slechte overleving laat zien in reeds gemetastaseerde tumoren (stadium IV) die al een slechte prognose hebben.

Binnen de groep patiënten die behandeld zijn voor een stadium II-III MSS tumor verschilt de kans op recidief (=terugkeer van de ziekte). In **hoofdstuk 4** hebben we gekeken of en welke specifieke veelvoorkomende SNVs, CNAs en/of breekpunt genen geassocieerd zijn met een hoge kans op tumor recidief. Hiervoor hebben we een geselecteerde groep van 57 stadium II en 57 stadium III MSS colorectale tumoren geanalyseerd. Geen van deze stadium II en alle patiënten met stadium III ziekte werden behandeld met een veel gebruikt chemotherapeutisch 5-fluorouracil (5FU). Mutaties in *APC*, het bekende darmkanker gen dat een belangrijke rol speelt bij het ontstaan van de ziekte, bleek van voorspellende waarde te zijn of de ziekte terugkwam bij patiënten met een 5FU behandelde stadium III tumor. Wanneer in de analyse de *APC* mutatie status gecombineerd werd met een ander bekend belangrijk gen voor colorectaal kanker ontwikkeling, *KRAS*, was het effect op ziekte-vrije overleving nog groter. Ook lijkt een mutatie in *APC*, dat vroeg optreedt in de tumorontwikkeling, bij te dragen aan instabiliteit van het tumorgenoom (aantal CNAs en breekpunten per tumor). Een afwijking die wel was geassocieerd met terugkeer van de ziekte, maar niet met ziekte-vrije overleving, was het verlies van een deel van de lange arm van chromosoom 18 (18q12.1-18q12.2). Geen van de non-random breekpunt genen bleek een verband te hebben met de kans op terugkeer van de ziekte in deze serie van stadium II-III tumoren. Het opvallende van deze bevindingen is dat de bekende afwijkingen die belangrijk zijn bij het ontstaan van colorectale tumoren ook een belangrijke rol blijken te spelen in progressie van de ziekte.

Omdat slechts een klein deel van alle colorectale adenomen uiteindelijk uitgroeien tot een maligne tumor, is het relevant om te weten waardoor een carcinoom ontstaat uit een adenoom. Zo is bijvoorbeeld bekend dat mutaties in *APC*, *TP53* en *RAS* genen, alsook verschillende CNAs dit proces sturen. Onbekend was wat de eventuele bijdrage van breekpuntgenen in dit proces was. Dit hebben we onderzocht in **hoofdstuk 5**. Hiervoor hebben we non-random breekpunt genen in 466 colorectaal kankers vergeleken met 118 colorectale adenomen. In totaal vonden we 21 genen die statistisch significant vaker aangedaan waren door breekpunten in de carcinomen ten opzichte van de adenomen ($p < 0.05$) en dus waarschijnlijk van belang zijn bij progressie van de ziekte, naast bekende bijdragende afwijkingen in het tumor genoom. Ook waren stadium II-III colon tumoren met breuken in een of meer van deze 21 genen geassocieerd met een slechtere ziekte-vrije overleving ten opzichte van tumoren zonder breuken in deze genen. Opvallend was dat het meest vaak gebroken gen in de carcinomen (in 40% van de tumoren), *MACROD2*, in geen van de 118 adenomen was aangedaan.

In **hoofdstuk 6** hebben we daarom gekeken naar het verschil in overleving tussen patiënten die het eiwit, waar *MACROD2* voor codeert, meer of minder tot expressie brengen. Dit hebben we onderzocht door het aankleuren en scoren van het eiwit op kleine stukjes tumor weefsel van 386 stadium II-III colon tumoren (TMA=tissue microarray). Uit onze studie bleek dat een lage eiwit expressie van *MACROD2* was geassocieerd met een slechte uitkomst van stadium III patiënten die na chirurgisch verwijderen van de tumor waren behandeld met chemotherapie (5FU). Verder onderzoek moet aantonen of deze marker in de klinische praktijk gebruikt kan

worden om in te schatten welke patiënt baat zal hebben bij de behandeling met 5FU gebaseerde chemotherapie. Ondanks dat deze marker was onderzocht naar aanleiding van resultaten op basis van breekpunten in het gen, hebben we geen correlatie kunnen aantonen tussen de mate van expressie van het eiwit en de aanwezigheid van DNA afwijkingen in dit gen. Deze bevinding laat zien dat tumor biologie een complex mechanisme is, maar suggereert wel dat MACROD2 een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van colorectaal kanker.

Algemene conclusie en discussie

Op dit moment wordt de prognose en behandeling van colorectaal kanker patiënten voornamelijk bepaald aan de hand van de tumor karakteristieken zoals bepaald bij het TNM systeem. Het bepalen van DNA afwijkingen in de tumor kan mogelijk de tumor classificatie verbeteren ten aanzien van prognose van colorectaal kanker patiënten alsook de response op bepaalde therapie. In tegenstelling tot de veel uitgebreider bestudeerde SNVs en CNAs, is het effect van genen die gemuteerd zijn door SVs op tumorbiologie en tumorclassificatie weinig onderzocht. Ons onderzoek verschaft een overzicht van genen die aangedaan zijn door breekpunten in het spectrum van benigne tot maligne colorectale tumoren. Het laat zien dat chromosomale breekpunt genen een veel voorkomende DNA afwijking is. Bovendien lijken deze non-random afwijkingen significant bij te dragen aan colorectale tumor ontwikkeling in aanvulling op SNVs en CNAs.

Hoewel we in ons onderzoek veel genen hebben kunnen identificeren die gemuteerd zijn door SVs in colorectaal kanker, is deze lijst niet volledig. Het gebruikte platform in ons onderzoek, aCGH, heeft namelijk een gemiddelde resolutie van ongeveer 17.000 basenparen waardoor kleine afwijkingen niet detecteerbaar zijn. Bovendien hebben we met onze methode alleen breekpunt genen kunnen detecteren die geassocieerd zijn met CNAs. Een relatief nieuwe techniek, *massive parallel sequencing*, maakt het wel mogelijk om op grote schaal met een resolutie op basenpaarniveau breekpunten van CNA-geassocieerde alsook *copy number neutral* SVs te detecteren in het tumor genoom.

Samengevat draagt ons onderzoek bij aan de uitdaging teneinde patiënten met colorectale tumoren beter in te kunnen delen ten aanzien van prognose en behandelopties. De resultaten verkregen met ons onderzoek geven aanleiding voor onafhankelijke validatie om de vermoedelijke biologische en klinische relevantie van breekpuntgenen op colorectaal kanker te bevestigen.