

Samenvatting proefschrift: Molecular-Cytogenetic Characterization of Head and Neck Cancer

De incidentie van kanker is de laatste 50 jaar significant gestegen. Bewoners van de geïndustrialiseerde wereld hebben vandaag de dag een 45% kans om gedurende hun leven kanker te krijgen. Vijftig procent van de patiënten met kanker sterft aan de ziekte, voornamelijk ten gevolge van beperkingen in de vroeg-diagnostiek en klinische behandeling van de ziekte. Ondanks 30 jaar intensief onderzoek zijn deze mortaliteitscijfers nauwelijks ten goede veranderd. Het is derhalve niet reëel een significante verbetering van de kankeroverleving te verwachten voordat het moleculaire raamwerk van de ziekte grondig in kaart is gebracht. Kanker ontstaat als normale cellen specifieke veranderingen in hun genetische informatie verkrijgen die hen in staat stelt normale groeiregulatie mechanismen te ontduiken, omgevende weefselstructuren te vernietigen en uit te zaaien naar organen elders in het lichaam. Genetische veranderingen die kanker induceren leiden enerzijds tot verhoogde activiteit van genen verantwoordelijk voor celgroei, aanleg van toevoerende bloedvaten (angiogenese), cellulaire dissociatie van het omgevende weefselverband en cellulaire migratie (proto-oncogenen), en anderzijds tot inactivatie van genen die zulke processen remmen of geprogrammeerde celdood induceren (tumorsuppressor genen). Activatie van een proto-oncogen kan verkregen worden door overrepresentatie van de betreffende genetische locus (bijvoorbeeld door chromosomale vermenigvuldiging of genetische amplificatie), chromosomale translocatie of activerende puntmutaties in de DNA sequentie van het gen. Inactivatie van een tumorsuppressor gen is meestal een gevolg van deletie van de betreffende chromosomale locus, inactiverende punt mutaties in het tumorsuppressor gen of hypermethylering van de tumorsuppressor promotorsequentie. Normale cellen kunnen oncogene mutaties enerzijds verkrijgen op basis van familiale overerving via de kiemlijn. Anderzijds ondergaan alle normale cellen een significant aantal somatische mutaties gedurende hun bestaan. Dit als gevolg van de fysiologische onbalans tussen de inherente onzorgvuldigheid van DNA replicatie en de invloed van externe mutagene factoren (roken, radioactieve straling) enerzijds, en de limitaties van intrinsieke DNA reparatiemechanismen anderzijds. Op basis van het samenspel van deze factoren is mutagenese een op toeval gebaseerd proces en is de kans op het verkrijgen van oncogene mutaties recht evenredig aan de hoogte van de mutatielast. Dit verklaart het verhoogd ontstaan van kanker in de context van bepaalde familiale syndromen, in situaties van verhoogde expositie aan externe mutagene invloeden, of in geval van verminderde functie van DNA reparatiemechanismen. Echter, verschillende onderzoekers hebben de afgelopen jaren betwist of de intrinsieke mutatiegevoeligheid van normale cellen voldoende is om het immens hoge aantal genetische mutaties in kankercellen te verklaren (> 12.000 individuele mutaties). Deze twijfel wordt ondersteund door recent onderzoek naar de moleculaire samenstelling van colorectale tumoren. Deze tumoren kunnen vroeg in hun ontwikkeling de kans op het verkrijgen van cruciale genetische mutaties verhogen door eliminatie van intrinsieke beschermingsmechanismen die de stabiliteit van hun genoom waarborgen. Een van de belangrijke vormen van genetische instabiliteit in colorectaal carcinoom is chromosomale instabiliteit. Chromosomale instabiliteit in deze tumoren is een gevolg van verkregen defecten in intrinsieke DNA reparatiemechanismen of processen betrokken bij de celdeling zoals mitotische spoelformatie en chromosomale segregatie. Chromosomale instabiliteit verhoogt de genetische heterogeniteit binnen een gegeven populatie cellen en legt daarmee de basis voor een continue darwinistische selectie en klonale uitgroei van cellen met de sterkste genetische opmaak (survival of the fittest). Deze dynamiek verklaart de continue adaptatie aan inhiberende omgevingsfactoren die het biologisch gedrag van kanker kenmerkt. Op basis van de oorzakelijke rol van genetische afwijkingen in carcinogenese moge het duidelijk zijn dat het in kaart brengen van 8 mechanismen verantwoordelijk voor het ontstaan van genetische afwijkingen en het uitwerken van het effect van deze mechanismen essentieel is voor het begrijpen en modificeren van het klinisch gedrag van kanker. Hoofd-hals kanker is een breed begrip dat verwijst naar een uiteenlopende verzameling van maligne tumoren die ontstaan binnen de anatomische grenzen van het hoofd- en halsgebied. Het plaveiselcelcarcinoom van de bovenste luchtwegen en het adenocarcinoom van de schildklier zijn de twee meest voorkomende maligne tumoren van het hoofd-hals gebied. Vergelijkbaar met het colorectaal carcinoom is een enorme hoeveelheid chromosomale afwijkingen aangetoond in het genetisch bestel van beide tumortypes. Echter, de mechanismen verantwoordelijk voor deze rijkdom aan chromosomale veranderingen zijn tot nog toe onduidelijk gebleven. Om deze mechanismen beter in kaart te brengen hebben wij een mogelijke rol van

chromosomale instabiliteit in de pathogenese van hoofd-hals kanker onderzocht. Als eerste hebben we de kankerincidentie en -distributie in een populatie patiënten met een aangeboren defect in chromosomale instabiliteit, te weten Fanconi anemie (FA), in kaart gebracht (Hoofdstuk 1 en 2).

Dit onderzoek laat zien dat FA patiënten een minstens 500-keer verhoogde kans op het ontwikkelen van plaveiselcelcarcinoom in het hoofd-hals en anogenitaal gebied hebben, in vergelijking tot de algemene populatie. De overgrote meerderheid van FA patiënten roken niet en drinken geen alcohol (bekende risicofactoren voor het ontwikkelen van hoofd-hals en anogenitaal plaveiselcelcarcinoom). Op basis van dit fenomeen rees het vermoeden dat het humaan papilloma virus (HPV) een carcinogene rol zou spelen bij de ontwikkeling van hoofd-hals en anogenitaal carcinoom in deze patiënten, een oncogeen virus dat kan bijdragen aan chromosomale instabiliteit en maligne transformatie van hoofd-hals en anogenitale mucosa in de algemene populatie (Hoofdstuk 3). De experimenten die hierop volgen laten inderdaad zien dat plaveiselcelcarcinomen in de FA populatie veel vaker zijn geassocieerd met een HP V-positief phenotype vergeleken met de normale populatie. Plaveiselcel carcinomen in FA patiënten zijn ook significant minder vaak gekenmerkt door mutaties van het p53 tumorsuppressor gen (Hoofdstuk 3), wat in overeenstemming is met het bewezen vermogen van HPV om de tumorsuppressieve functie van het p53 eiwit uit te schakelen. Als een mogelijk compromitterende factor voor de hoge proportie HPV-geïnduceerde plaveiselcelcarcinomen in de FA populatie, suggereert ons werk een verhoogd voorkomen van het genetisch Arg72 polymorfisme in het p53 gen onder de FA populatie met plaveiselcelcarcinomen, een kenmerk wat in eerder onderzoek werd geassocieerd met een verhoogde gevoeligheid van het p53 eiwit voor HPV-geïnduceerde inactivatie (Hoofdstuk 3).

Onze resultaten suggereren sterk dat chromosomale instabiliteit een belangrijk onderliggend mechanisme vormt voor kwaadaardig nieuwvormingen van plaveiselcellen in de mens, en verhogen de bewijslast tegen het HPV virus als oorzaak van hoofd-hals en anogenitaal plaveiselcelcarcinoom. Buiten deze biologische implicaties heeft de identificatie van FA als nieuwe risicofactor voor het ontstaan van plaveiselcelcarcinoom belangrijke medische consequenties. Dit resulteert in de noodzaak van grondige keel-, neus- en oorheelkundige en gynaecologische controle van FA patiënten, de noodzaak de diagnose FA te vermoeden in jonge patiënten met plaveiselcelcarcinoom en mogelijkheden voor HPV vaccinatie van FA patiënten. Om chromosomale instabiliteit in het sporadisch (niet erfelijke) hoofd-hals plaveiselcelcarcinoom (HHPCC) aan te tonen hebben wij ons in vervollexperimenten gericht op de dynamiek van chromosomale veranderingen in HHPCC en een mogelijke oorzakelijke rol van defecten in het mitotische apparaat en tabaksexpositie (Hoofdstuk 4 en 5).

Onze analyses hebben voor het eerst sporen van chromosomale instabiliteit in sporadisch HHPCC aangetoond en suggereren dat dit geassocieerd is met dysfunctie van het mitotisch apparaat van HHPCC. In contrast met eerder onderzoek konden we geen verband aantonen tussen chromosomale instabiliteit en tabaksexpositie in patiënten met HHPCC. Omdat expositie aan radioactieve straling in eerder onderzoek werd geassocieerd met inductie van chromosomale instabiliteit onderzochten we de chromosomale constitutie van schildklierkankers ontstaan als gevolg van het ongeluk met de kernreactor in Chernobyl in 1986 (Hoofdstuk 6).

Echter, geen spoor van chromosomale instabiliteit kon worden aangetoond in deze tumoren. Naast het in kaart brengen van mechanismen die het ontstaan van genetische afwijkingen bevorderen, is ook identificatie van de genetische afwijkingen zelf een belangrijk doel van kankeronderzoek. Op basis van de directe link tussen het moleculaire profiel van een tumor en diens biologisch gedrag bevat de genetische opmaak van kanker sterke prognostische factoren die een ideaal doelwit kunnen vormen voor nieuw te ontwikkelen behandelingsstrategieën. Het meest overtuigende voorbeeld van de klinische relevantie van kanker genetica is gegeven door een recente doorbraak in de behandeling van chronische myeloïde leukemie (CML). Identificatie van de kern mutatie van CML (BCR-ABL translocatie) heeft geleid tot ontwikkeling van een curatieve behandelingsmethode met het nieuwe medicijn Gleevec. Op basis van het toevalsgewijze patroon van de cellulaire mutagenese is de meerderheid van genetische mutaties in kankercellen gelocaliseerd in niet coderende genetische gebieden of in genen wier functie niet van oncogeen belang is. Om deze reden is de belangrijkste uitdaging van genetische analyse de identificatie van cruciale carcinogene mutaties te midden van de grote hoeveelheid genetische ruis. Recentelijk is dramatische vooruitgang geboekt op het gebied van

(oncologische) genetische analyse. In het bijzonder heeft de voltooiing van de "Human Genome Sequencing Project" in 2002 kankeronderzoekers het ideale genetisch referentiekader geleverd. Tegelijk met deze ontwikkeling heeft de introductie van efficiëntere en snellere genetische evaluatiemethodes significante vooruitgang bewerkstelligd in genetische analyse. Op basis van deze vooruitgang mag worden verondersteld dat ons begrip van de moleculaire-oncologische pathogenese enorm verbeterd zal worden in de komende jaren. In onze studies hebben we ons gericht op de identificatie van biologisch relevante genetische afwijkingen in HHPCC. Met behulp van moderne genetische evaluatie methodes zoals spectrale karyotypering (SKY), comparatieve genomische hybridizatie (CGH) en cDNA microarray analyse hebben we de moleculaire opmaak van HHPCC en schildklierkanker in kaart gebracht, en de gevonden genetische afwijkingen gecorreleerd met het klinisch gedrag van de ziekte (Hoofdstuk 7 tot 17).

Ons werk heeft een grote hoeveelheid genetische afwijkingen geïdentificeerd zoals overrepresentaties, amplificaties, deleties en structurele afwijkingen. In de analyse van HHPCC was het mogelijk om gevonden genetische afwijkingen direct te correleren met ziekte beloop na conventionele therapeutische behandelingen. Deze analyse brengt verschillende genetische afwijkingen aan het licht die geassocieerd zijn met agressieve tumor kenmerken en onfortuinlijk klinische ziektebeloop (Hoofdstuk 10 tot 13).

Deze afwijkingen vormen belangrijke speerpunten die in aanmerking komen voor nadere analyse ter verbetering van de prognostische stratificatie en geassocieerde behandelingskeuze voor HHPCC.

In Hoofdstuk 14 van ons werk hebben we een opmerkelijk voorbeeld van de veelbelovende mogelijkheden van moderne genetische evaluatietechnieken beschreven. Met behulp van microarraygebaseerde gen-expressie profilering was het mogelijk om naar de longen gemetastaseerde HHPCC te differentiëren van primair plaveiselcel carcinoom van de longen, een pathologisch onderscheid met belangrijke klinische consequenties. Het lang uitgestrekte klinisch beloop van schildklierkanker en de daaraan geassocieerde schaarstee aan definitieve klinische ziekteuitkomsten maakt het gecompliceerd om moleculaire profielen direct te correleren aan klinisch beloop van de ziekte. In een poging deze limitatie te omzeilen hebben wij genetische profielen van opeenvolgende pathologische stadia van schildklierkanker met elkaar vergeleken, te weten goed-gedifferentieerd schildkliercarcinoom, slechtgedifferentieerd schildkliercarcinoom en ongedifferentieerd (anaplastisch) schildkliercarcinoom. Onze analyse suggereert een grote hoeveelheid nieuwe genetische afwijkingen die geassocieerd zijn met schildklierkanker progressie. Prognostische waarde van deze afwijkingen moet gevalideerd worden in toekomstige studies (Hoofdstuk 15).

We hebben de prognostische relevantie van een van deze afwijkingen inderdaad gevalideerd zoals hieronder beschreven. Naast de genetische analyse van schildklierkanker progressie hebben we ons gericht op de classificatie van goed-gedifferentieerd schildklier carcinoom. Genetische analyse van specifieke histologische varianten van goed-gedifferentieerde schildklierneoplasie, te weten papillair schildkliercarcinoom van klassieke en folliculaire variant, folliculair schildklieradenoom en folliculair schildkliercarcinoom suggereert dat de pathogenese van papillair schildkliercarcinoom van de folliculaire variant dichter gelegen is bij de pathogenese van folliculaire schildklierneoplasieën dan bij die van het klassieke papillaire schildkliercarcinoom (Hoofdstuk 17).

Confirmatie van deze vinding in toekomstige studies is van groot belang omdat dit significante implicaties voor het pathologisch onderscheid tussen benigne en maligne schildkliertumoren kan hebben. Onze globale analyse van het kankergenoom heeft verschillende biologisch relevante genetische afwijkingen aan het licht gebracht. In vervolgstudies hebben we ons toegelegd op de verdere karakterisatie van 3q26.3 amplificatie in HHPCC en 1q21 amplificatie in schildklierkanker. Middels toepassing van traditionele positionele kloneringstechnieken zijn we eerst op zoek gegaan naar oncogenen die selectie voor 3q26.3 amplificatie drijven in HHPCC (Hoofdstuk 18 tot 21).

Dit werk heeft amplificatie en overexpressie van een bekend oncogen, PIK3CA, aangetoond in HHPCC, een fenomeen wat recentelijk beschreven is in ovariumkanker en cervix kanker (Hoofdstuk 20).

Belangrijker, ons werk heeft geleid tot identificatie van een niet eerder beschreven oncogen, dat we de naam squamous cell carcinoma-related oncogene (SCCRO) hebben gegeven (Hoofdstuk 21).

In overeenstemming met onze CGH data die een associatie van 3q26.3 amplificatie met agressief klinisch ziektebeloop van HHPCC laten zien, is overexpressie van PIK3CAPIK3CA en SCCRO geassocieerd met een onfortuinlijke ziekteuitkomst (Hoofdstuk 22).

Omdat amplificatie en overexpressie van een gen geen sluitend bewijs vormt voor een rol in oncogenese hebben we de biochemische functie van beide genen in kaart gebracht. Uit onze experimenten blijkt dat PIK3CA amplificatie bijdraagt aan oncogenese van HHPCC, door inductie van resistentie tegen p53-gemedieerde apoptose die onafhankelijk is van de tumorsuppressieve activiteit van PTEN (Hoofdstuk 20).

Gestructureerde analyse van de biochemische functie van SCCRO laat zien dat de overleving van HHPCC cruciaal afhankelijk is van hoge cellulaire concentraties SCCROO zowel in vitro als in vivo. In overeenstemming hiermee functioneert SCCRO als een belangrijke mediator van de wel bekende oncogene "Sonic Hedgehog pathway" (Hoofdstuk 21- 24).

Deze resultaten suggereren een zeer belangrijke rol voor PIK3CA en SCCRO amplificatie in HHPCCC pathogenese en onthullen belangrijke aanwijzingen voor nieuw te ontwikkelen behandelingsstrategieën. Ons eigen werk en dat van anderen suggereert dat afwijkingen in PIK3CA en SCCROSCCRO frequent voorkomen in verschillende zeer vaak voorkomende kankers zoals die van de long en cervix. Exploratie van de therapeutische consequenties van beide genafwijkingen kan daarom zeer belangrijke implicaties hebben voor de behandeling van een groot deel van de kankerpatiënten. . De positionele kloneringstechniek die wij hebben toegepast bij de identificatie van SCCRO en PIK3CA was zeer tijdrovend. Derhalve hebben we bij de analyse van lq21 amplificatie in schildklierkanker moderne cDNA microarray technieken ingezet. Deze toepassing identificeert amplificatie en overexpressie van het bekende oncogen MUC1 (gelokaliseerd in de chromosomale regio lq21) geassocieerd met agressieve schildkliertumoren (Hoofdstuk 25).

Onze analyse laat onafhankelijke prognostische significantie van MUC1 overrepresentatie zien in twee onafhankelijke groepen patiënten met schildklierkanker. Deze experimenten suggereren dat de analyse van MUC11 status agressieve papillaire schildkliercarcinomen identificeert voordat histologische tekenen van agressief klinisch potentieel aanwezig zijn. Dit wijst op een belangrijke rol voor MUC11 veranderingen in de transformatie naar agressief klinisch gedrag van schildklierkanker. Onze vervolg studies naar de functionele rol van MUC1 in schildklierkanker laten zien dat activatie van dit gen schildklierkanker cellen een verhoogd invasieve potentieel geeft, wat consistent is met de rol die MUC1 wordt toebedeeld als belangrijke mediator van cel-cel en cel-extracellulaire matrix interacties. Omdat analyse van MUC1 status technisch ongecompliceerd is, is MUC1 gebaseerde prognostische stratificatie van schildklierkankers mogelijk geschikt voor snelle introductie in de kliniek. De voltooiing van het Human Genome Sequencing Project en de daaraan gekoppelde ontwikkeling van geavanceerde genetische evaluatietechnieken heeft een nieuw tijdperk ingeluid waarin vele nieuwe ontdekkingen elkaar in rap tempo zullen opvolgen. Hand in hand met de identificatie en karakterisatie van nieuwe genetische mutaties zijn vele nieuwe prognostisch en therapeutisch belangrijke factoren ontdekt. Deze vooruitgang heeft nieuwe wegen geopend voor de behandeling van solide tumoren. De recentelijk gepubliceerde associatie van EGFR mutatie met gevoeligheid voor anti-EGFR therapy is een kenmerkend voorbeeld van het nieuwe tijdperk waarin we ons bevinden. Echter, ondanks de hoogte van ons verwachtingspatroon blijft een hoeveelheid significante beperkingen bestaan. The genetische complexiteit van solide tumoren en hun ongelimiteerd schijnende genetische evolutie en adaptatiecapaciteit heeft de volledige karakterisatie van het kankergenoom vertraagd. In overeenstemming hiermee staat de hoeveelheid reeds geïdentificeerde genetische factoren nog steeds in schril contrast tot de status quo van patiëntenbehandeling en kankermortaliteit statistieken. Het werk beschreven in dit proefschrift is een startpunt voor verder onderzoek. Ons werk heeft geleid tot identificatie van nieuwe modellen, identificatie van nieuwe biologisch relevante genetische afwijkingen en ontwikkeling van nieuwe inzichten in de biochemische opmaak van de kanker cel. Wij hopen hiermee bij te kunnen dragen aan de verbetering van ons begrip van de biologie van kanker en uiteindelijk de genezing van patiënten die getroffen zijn door deze dodelijke ziekte te verbeteren.