



UNIVERSITY OF AMSTERDAM

UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Hypothesis driven gene expression profiling in breast cancer

Nuyten, D.S.A.

Publication date
2010

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Nuyten, D. S. A. (2010). *Hypothesis driven gene expression profiling in breast cancer*. [Thesis, fully internal, Universiteit van Amsterdam].

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, P.O. Box 19185, 1000 GD Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Chapter 8

Summary in Dutch

Samenvatting in het Nederlands

Inzicht in de biologische achtergrond waaruit een tumor ontstaat en aangezet wordt tot groei en vooral het optreden van uitzaaiingen, waardoor kanker in een ongeneselijke fase komt, is een belangrijk onderdeel van kankeronderzoek.

De ontrafeling van de biologische processen in de ontstaanswijze en verdere ontwikkeling van een tumor, kan niet alleen gebruikt worden om patiënten in te delen in prognostische klassen, maar kan ook leiden tot ontdekking van nieuwe behandelingsmogelijkheden voor kanker.

Op basis van verschillende biologische processen, zoals celdeling, bloedvat vorming, celbewegelijkheid en adhesie tussen cellen, is een verband gelegd tussen wondgenezing en kanker. Bovendien hebben epidemiologische studies een verband aangetoond tussen chronische wonden en de ontwikkeling van kanker.

Hoofdstuk 1

Het eerste hoofdstuk van dit proefschrift geeft een kort overzicht van het onderzoek en de klinische vraagstellingen die er aan ten grondslag liggen.

Hoofdstuk 2

Het tweede hoofdstuk geeft een overzicht van de huidige stand van zaken van de microarray techniek op het gebied van borstkanker en radiotherapie-oncologie. Verschillende methoden die worden toegepast om onderzoeksgegevens van microarray onderzoek te analyseren worden besproken, onder anderen gesuperviseerde en ongesuperviseerde methoden en hypothese gedreven analyses. Het hoofdstuk beschrijft verschillende klinische onderzoeksgebieden en geeft een overzicht van de huidige stand van zaken betreffende het gebruik van gen expressie profielen voor het voorspellen van de prognose; het voorspellen van gevoeligheid van tumoren voor preoperatieve chemotherapie; voor de voorspelling van een lokaal recidief in de borst of op de borstwand en voorspelling van het ontstaan van uitzaaiingen elders in het lichaam. Daarnaast wordt een overzicht gegeven van het gebruik van deze techniek in de voorspelling van schade aan normale weefsels en gevoeligheid van tumoren voor radiotherapie. Tot slot wordt gesproken hoe deze technieken in de kliniek of in klinische studies worden gebruikt.

Hoofdstuk 3

In hoofdstuk drie beschrijven we de validatie van een zogenaamd hypothese gedreven gen expressie profiel: het wondgenezingsprofiel (WP) en laten we zien hoe dit profiel mogelijk gebruikt kan worden in de kliniek. Gebaseerd op de hypothese dat biologische processen die ten grondslag liggen aan wondgenezing mogelijk een belangrijke rol kunnen spelen in de vorming van uitzaaiingen, hebben we dit wondgenezingsprofiel gebruikt om een mogelijk verband aan te tonen tussen wondgenezing en de ontwikkeling van borstkanker. In een consecutieve serie van 295 tumoren van patiënten met een vroeg stadium borstkanker, laten we zien dat de uitzaaiingsvrije overleving en de totale overleving aanzienlijk lager is in de groep patiënten van wie de tumor een

geactiveerd wondprofiel laat zien vergeleken met patiënten van wie de tumor dit profiel niet laat zien. In deze groep patiënten hebben 126 tumoren een geactiveerd wondprofiel en 169 tumoren laten een inactief wondprofiel zien. Patiënten met een geactiveerd WP hadden een overlevingspercentage na 10 jaar van 50%, vergeleken met 84% voor de patiënten met een inactief WP ($p < 10^{-10}$: logrank test). Voor uitzaaiingsvrije overleving na 10 jaar was dit 51% versus 75% ($p < 10^{-6}$: logrank test). Een gen expressie centroid (gemiddeld expressie profiel) van het WP vormt de basis van een score die prospectief wordt toegekend. De score kan geoptimaliseerd worden voor klinische doeleinden. Het WP verbetert risico-indeling onafhankelijk van bekende klinische en pathologische risicofactoren en eerder beschreven gen expressie profielen, zowel gebaseerd op ongesuperviseerde clustering (“moleculaire subtypen”) als op gesuperviseerde analyse voor voorspelling van uitzaaiingen (“70-genen prognose profiel”).

Hoofdstuk 4

In hoofdstuk vier hebben we gen expressie profielen (bepaald met behulp van de microarray techniek) gebruikt om de kans op een lokaal recidief na borstsparende behandeling te voorspellen in individuele patiënten. We hebben gen expressie data gebruikt van de eerder beschreven serie van 295 borstkanker patiënten die zijn behandeld in het NKI/AVL (NKI 295 data set), maar hebben ons beperkt tot de patiënten die een borstsparende behandeling hebben ondergaan (lumpectomie (verwijdering van de tumor met marge) gevolgd door volledige borstbestraling). De 161 patiënten die aan deze criteria voldeden, zijn verdeeld in een training en een validatie serie (81 en 80 patiënten, respectievelijk, inclusief 9 en 8 patiënten die een lokaal recidief hebben ontwikkeld gedurende de follow up (mediaan 7.7 jaar)). We hebben een voorspellend genexpressie profiel ontwikkeld voor een lokaal recidief na borstsparende behandeling door eerder beschreven profielen die uitzaaiingen en overleving kunnen voorspellen, te optimaliseren voor voorspelling van een lokaal recidief in de trainingsserie. Validatie van de verschillende genenlijsten liet zien dat het WP in staat is om patiënten met een hoog risico (29%) op de ontwikkeling van een lokaal recidief na 10 jaar te scheiden van patiënten met een laag (5%) risico (sensitiviteit 87.5% en specificiteit 75%). In multivariate analyse is dit profiel een onafhankelijke voorspellende factor voor lokaal recidief. Onze bevindingen laten zien dat gen expressie profilering subgroepen patiënten kan identificeren die een hoger risico hebben op het ontwikkelen van een lokaal recidief na borstsparende behandeling.

Hoofdstuk 5

Hoofdstuk vijf brengt het gebruik van hypothese gedreven gen expressie profielen een stap verder, door eerder geïdentificeerde profielen te correleren met biologische “pathways” vertegenwoordigd in genmodules. Deze modules vertegenwoordigen specifieke (biologische) functies die geassocieerd zijn met specifieke tumorsubtypen en daardoor mogelijk geassocieerd zijn met gevoeligheid van deze tumoren voor “targeted” (“gerichte”) behandelingen (met geneesmiddelen). We laten een voorbeeld zien door gebruik van het WP, dat een geactiveerd wondprofiel sterk geassocieerd is

met activiteit van een mitochondriale genmodule en een “proteasome” genmodule. Activiteit van deze laatste module is geassocieerd met een verminderde kans op overleving. Vervolgens hebben we getest of het gericht aanpakken van het mitochondriale defect (remmen van glycolyse (afbraak van glucose) of het afremmen van het proteasome, selectief leidt tot het doden van cellen die een actief WP hebben. We hebben epitheliale borst cellen (MCF 10A) gebruikt die normaal gesproken het inactieve WP hebben, en hebben het WP geactiveerd door twee genen (MYC en CSN5) tot overexpressie te brengen in deze cellen. We hebben gevonden dat 3-bromopyruvic zuur, dat afbraak van glucose remt, selectief borst epitheelcellen doodt die de mitochondriale gen module of het actieve WP tot expressie brengen. Verder laten we zien dat bortezomib, een geneesmiddel dat gebruikt wordt bij behandeling van de ziekte van Kahler, door remming van het proteasome de expressie van het geactiveerde WP vermindert en selectief cellen dood die het geactiveerde WP tot expressie brengen. Verder laten we zien dat in borstkankercellijnen, die allemaal een geactiveerd WP hebben, de mate van activiteit correleert met de gevoeligheid voor remming van het proteasome, d.w.z. cellen met de hoogste mate van activiteit van het WP zijn het meest gevoelig voor remming van het proteasome. Tot slot laten we zien dat de correlatie tussen het WP en activiteit van de proteasome module gereproduceerd kan worden in zes onafhankelijke borstkanker data sets, variërend van vroeg tot late klinische stadia. Deze bevindingen tonen aan dat het in kaart brengen van gen modules mogelijk kan helpen bij een snelle vertaling van complexe gen expressie profielen in menselijke ziekten naar gerichte behandelingsstrategieën.

Hoofdstuk 6

In hoofdstuk 6 wilden we het gebruik van hypothese gedreven gen expressie profielen (GEP) verder uitbreiden door het combineren van verschillende GEP, om zo een betere voorspelling van uitkomst te bewerkstelligen. Wij maken gebruik van de eerder gepubliceerde NCI-295 data set met geactualiseerde klinische follow up. Tumoren werden met behulp van het eerder beschreven WP en Hypoxie profiel (HP) onderverdeeld in drie prognostische groepen en de uitkomst in elk van deze drie groepen werd geëvalueerd. De drie groepen zijn 1) een niet actief WP en niet hypoxisch HP profiel (n=122), 2) een actief WP of een hypoxisch HP (n=129) en 3) een actief WP en een hypoxisch HP (n=45). De uitzaaiingsvrije overleving na 15 jaar is 76%, 53% and 36% voor groep 1, 2 en 3, respectievelijk (log rank $p < 10^{-8}$; HR 2.3 (95%CI 1.8–3.1)) en de totale overleving is 79%, 59% en 27% (log rank $p < 10^{-12}$; HR 2.8 (95%CI 2.1–3.8)). Dit profiel is niet alleen onafhankelijk van klinische en pathologische kenmerken in multivariate analyse, het is tevens de sterkste voorspeller voor uitzaaiingsvrije en totale overleving. In vergelijking met het eerder beschreven 70 genen prognose profiel, verkregen door gesuperviseerde analyse, is de voorspellende waarde van het combinatie profiel ongeveer even goed en heeft wellicht toegevoegde waarde in de ER-negatieve subgroep. In de subgroep van lymfeklier positieve tumoren, heeft het combinatie profiel een betere voorspellende waarde dan het 70-genen profiel in multivariate analyse. Vervolgens hebben we klinische en pathologische kenmerken, het combinatie profiel en het 70-genen prognose profiel met behulp van multivariate

analyse vergeleken. Het 70-genen prognose profiel verliest zijn significante voorspellende waarde voor overleving in lymfeklier positieve patiënten in de aanwezigheid van het combinatieprofiel (CP); leeftijd en het CP waren de enige variabele die hun significant voorspellende waarde behouden (HR 0.43 voor leeftijd boven de 40 en HR 1.84 voor het CP). Een interessante observatie is dat de HR voor het CP het verschil aangeeft tussen de goede (groep 1) en intermediaire groep (groep 2) en ook tussen de intermediaire (groep 2) en slechte groep (groep 3); dit betekent dat de HR voor de goede groep versus de slechte groep ongeveer 3.68 is.

Daarnaast is de combinatie van het WP en het HP in multivariate analyse een sterkere voorspeller van uitkomst vergeleken met het recent beschreven Invasief gen profiel in combinatie met het WP. Alleen de WP/HP combinatie behoudt zijn significant voorspellende waarde in het (multivariate) model. De HR is 1.75 versus 1.41 en de p-waarde 0.002 versus 0.093.