

Molecular profiling of pulmonary carcinoids : insight into tumor biology and identification of prognostic markers

Citation for published version (APA):

Swarts, D. R. A. (2013). *Molecular profiling of pulmonary carcinoids : insight into tumor biology and identification of prognostic markers*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20131219ds>

Document status and date:

Published: 01/01/2013

DOI:

[10.26481/dis.20131219ds](https://doi.org/10.26481/dis.20131219ds)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting proefschrift Dorian Swarts

Molecular profiling of pulmonary carcinoids - Insight into tumor biology and identification of prognostic markers

In de **Introductie** worden neuro-endocriene tumoren (NET's) van de long kort besproken en wordt specifiek gefocust op carcinoïden. Ook worden de verschillende classificatiesystemen die voor deze tumoren bestaan beschreven. Longcarcinoïden vormen een heterogene groep van neuro-endocriene longtumoren met een wisselende prognose. Op basis van histopathologische kenmerken worden deze tumoren ingedeeld in typische (TC) en atypische (AC) carcinoïden. De belangrijkste therapie voor longcarcinoïden is het operatief verwijderen van de tumor en in de meeste gevallen is dit afdoende om de ziekte te genezen. Voor uitgezaaide ziekte is echter geen goede therapie voorhanden. Alhoewel AC's een hoger risico hebben op (late) terugkeer van de ziekte en metastase op afstand, vertoont ook de meerderheid van deze tumoren geen progressie. Het deel van de longcarcinoïden, met name AC's, dat wel een progressief ziekteverloop heeft is niet goed gekarakteriseerd, terwijl dit cruciaal is om de ziekte-uitkomst bij eerste diagnose beter te kunnen voorspellen. Om deze redenen zijn betere voorspellers van de ziekte-uitkomst onmisbaar en dan met name voor de groep van patiënten met AC's. Het doel van dit proefschrift was daarom om nieuwe prognostische markers voor longcarcinoïden te identificeren en om het begrip van de onderliggende mechanismen van ziekteprogressie te vergroten.

In **Hoofdstuk 1** wordt een uitgebreide vergelijking gegeven tussen longcarcinoïden en hooggradige neuro-endocriene carcinomen (HGNEC's). Er wordt voornamelijk ingezoomd op belangrijke verschillen tussen deze twee groepen neoplasmen. Met behulp van een meta-analyse van chromosomale afwijkingen kon worden aangetoond dat HGNEC's veel vaker chromosomale instabiliteit vertonen dan longcarcinoïden, terwijl chromosomale afwijkingen in TC's – als ze al voorkomen – willekeurig over het genoom lijken te zijn verspreid. Verder wordt in dit hoofdstuk de vroege biologie van neuro-endocriene neoplasmen (NEN's) van de long bediscussieerd. Er wordt beargumenteerd dat er verschillende tumorigenese-mechanismen bestaan voor longcarcinoïden en HGNEC's, ondanks het feit dat zij waarschijnlijk dezelfde cellulaire oorsprong hebben, namelijk de

pulmonaire neuro-endocriene cellen in het bronchusepitheel. In dezelfde context worden ook voorloperstadia van longcarcinoïden, namelijk diffuse idiopathische neuro-endocriene celhyperplasie (DIPNECH) en zogenaamde tumorlets beschreven. De therapeutische opties voor zowel carcinoïden als HGNEC's worden ook kort geschetst.

Het doel van de studies beschreven in **Hoofdstuk 2** was om de mate van interobservervariatie in de histopathologische diagnose van longcarcinoïdtumoren te onderzoeken, gezien verschillende aanwijzingen dat de reproduceerbaarheid van de huidige WHO-classificatie suboptimaal is. Inderdaad kon een aanzienlijke interobservervariabiliteit gevonden worden tussen vijf pathologen gespecialiseerd in pulmonaire pathologie. Vooral de classificatie van AC's leverde aanzienlijke problemen op. Voorts was het niet mogelijk om op basis van classificaties door ≥ 3 van de pathologen tot een betrouwbare voorspelling van de ziekte-uitkomst te komen. Het gebruik van Ki-67 en OTP-immunokleuring verbeterde de voorspelling van de prognose van moeilijk te classificeren gevallen.

Met behulp van de array comparatieve genomische hybridisatiestudies beschreven in **Hoofdstuk 3** zijn chromosomale afwijkingen in longcarcinoïden geïdentificeerd om zo meer duidelijkheid te verschaffen over specifieke genomische veranderingen in TC's en AC's. De belangrijkste uitkomsten van dit onderzoek waren dat verlies van chromosoom 11q22.3-q25 geassocieerd is met AC's en een lage overleving. Hiermee werd een nieuwe prognostische indicator geïdentificeerd. Het *MEN1*-gen, gelegen op 11q13 en gemuteerd in het erfelijke syndroom multipiele endocriene neoplasie type 1, is, zoals eerder is beschreven, gemuteerd in een deel van sporadische longcarcinoïden.

Het *MEN1*-gen is uitgebreid geanalyseerd in de studies beschreven in **Hoofdstuk 4**. Zowel mutaties, allelisch verlies en promoterhypermethylering als gen- en eiwitexpressieniveaus werden bepaald en de bevindingen werden wederom met de ziekte-uitkomst van de longcarcinoïdpatiënten gecorreleerd. Het bleek dat zowel mutatie van het *MEN1*-gen als lage genexpressieniveaus geassocieerd zijn met een slechte ziekte-uitkomst en dat ook niet-gemuteerde gevallen lage *MEN1*-mRNA-niveaus kunnen hebben. *MEN1* is daarom niet alleen een belangrijk gen in longcarcinoïdtumorbiologie, maar verlies van zijn expressie en/of functie is ook

geassocieerd met een slechte prognose. Dit laatste lijkt anders te zijn dan in andere NET-typen.

Voor **Hoofdstuk 5-6** is genomwijde expressieprofielering gebruikt om nieuwe prognostische markers voor longcarcinoïden te identificeren. Om specifiek genen te selecteren die geassocieerd zijn aan progressieve ziekte werden vijf carcinoïden van patiënten met een goede overleving vergeleken met vijf carcinoïden van patiënten die aan de ziekte waren overleden. Onder de topkandidaatgenen die verschillend tussen deze twee groepen tumoren tot expressie kwamen waren *ASB4*, *BUB1*, *CD44*, *FOLR1*, *KLK12*, *OTP*, *PCK1*, *RET* en *SMOC2*. *CD44* is gedownreguleerd in carcinoïden met een slechte prognose, zoals eerder is beschreven voor TC's op eiwitniveau.

In **Hoofdstuk 5** werd dit gen tezamen met het sterkst geopreguleerde gen *RET* en het sterkst gedownreguleerde gen *OTP* gevalideerd als prognostische marker genen met behulp van kwantitatieve RT-PCR. Voorts werd gevonden dat nucleaire eiwitexpressie van *OTP* en membraneuze eiwitexpressie van *CD44* sterk gecorreleerd zijn met de transcriptieniveaus van deze genen. Om deze factoren als prognostische markers voor longcarcinoïden te valideren is een grote serie van bijna 300 longcarcinoïdtumoren onderzocht met behulp van immunohistochemische kleuringen met antilichamen tegen deze factoren. Zowel *CD44* als *OTP* waren sterke prognostische indicatoren in de totale carcinoïdengroep, terwijl *OTP* bovendien prognostische waarde had binnen de groep van TC's en immunokleuring voor *CD44* aan een gunstige ziekte-uitkomst binnen de AC's gerelateerd was. Het gebruik van een combinatie van beide markers verbeterde de voorspelling van de ziekte-uitkomst nog verder. In multivariate analyse bleef cytoplasmatische *OTP*-expressie significant geassocieerd aan de ziekte-uitkomst tezamen met de leeftijd van de patiënt bij diagnose, histopathologische classificatie en ziektestadium, terwijl kernkleuring voor *OTP* prognose voorspelde binnen de groep van TC's, samen met de leeftijd van de patiënt bij diagnose. De aanwezigheid van *OTP*-eiwit kon ook worden gerelateerd aan voorloperstadia van carcinoïden, namelijk DIPNECH en tumorlets.

In **Hoofdstuk 6** werden de microarraydata verder gevalideerd met behulp van kwantitatieve RT-PCR voor nog 8 andere genen, namelijk *BIRC5*, *BUB1*, *FANCA*, *FOLR1*, *IL20RA*, *KLK12*, *MT1F* en *PCK1*, die om verschillende redenen geselecteerd

werden. In vergelijking met klinische parameters bleven in multivariate analyses *BIRC5*, *BUB1*, *CD44*, *IL20RA*, *KLK12* en *OTP* onafhankelijke voorspellers van prognose. Verder waren significant meer gedownreguleerde genen gelocaliseerd op chromosoom 11q, waaronder *FOLR1* en *FOLR3*, dan op basis van kans kon worden verwacht. De genen die verschillend tot expressie kwamen werden aan een literatuuronderzoek onderworpen om associaties tussen de verschillende factoren te identificeren en zo meer inzicht te verkrijgen in mogelijke moleculaire pathways betrokken bij carcinoïdprogressie. Vier pathways met onderliggende samenhang konden worden geïdentificeerd, namelijk het chromosomale passenger complex (CPC), het mitotische spindle checkpoint (MSC), het BRCA-Fanconi Anemiepathway en genen gerelateerd aan CDC2, de belangrijkste mitotische kinase. Het CPC werd verder met kwantitatieve RT-PCR en immunohistochemie geanalyseerd voor zijn hoofdcomponenten Aurora B kinase en survivin (*BIRC5*). Een verhoogd mRNA-niveau van beide factoren was geassocieerd met een lage langetermijnoverleving. Een hoog percentage van survivinpositieve kernen was eveneens geassocieerd met een lage overleving voor carcinoïdtumoren. De aan- of afwezigheid van Aurora B kinase-eiwit was daarentegen niet significant geassocieerd met prognose. Dit is in overeenstemming met het feit dat in de microarrayexperimenten *BIRC5* (survivin) geopreguleerd was in longcarcinoïden met een slechte prognose, terwijl dat niet het geval was voor *AURKB* (Aurora B kinase). Hogere expressieniveaus van beide factoren waren aanwezig in HGNEC's. Er bestaan inhibitoren voor zowel Aurora B kinase als survivin, waardoor deze factoren mogelijk als therapeutische doelen gebruikt kunnen worden. Vooral voor de HGNEC's zou dit dus bruikbaar kunnen zijn.

In **Hoofdstuk 7** wordt een overzicht gegeven van genexpressieprofielingsstudies gedaan met longcarcinoïden en/of -carcinomen. De focus van dit literatuuronderzoek was op genen die door meerdere van deze studies (inclusief degene beschreven in **Hoofdstukken 5** en **6**) beschreven zijn. Onder deze genen waren neuro-endocrienspecifieke factoren, genen betrokken bij neuronale ontwikkeling en uitgroei van neurieten, en celcyclusprogressiegenen, waaronder genen gerelateerd aan het MSC. Een aantal van deze genen is reeds goed gekarakteriseerd terwijl van andere maar weinig bekend is, alhoewel deze misschien wel als diagnostische markers of therapeutische targets voor NEN's van de long zouden kunnen dienen. Omdat een aantal van deze kandidaatgenen nog

nooit geanalyseerd is in long-NEN's wordt geredeneerd dat deze verder zouden moeten worden getest in toekomstige studies, zeker omdat zich onder deze factoren mogelijke nieuwe therapeutische targets voor (hooggradige) NEN's van de long bevinden.

In de **General Discussion** worden de resultaten bediscussieerd en vergeleken met de huidige stand van het veld. Er wordt beargumenteerd dat het gezamenlijk gebruik van histopathologie en moleculaire markers geïdentificeerd in dit proefschrift, en dan met name CD44 en OTP, een optimale voorspelling van de ziekte-uitkomst van longcarcinoïdpatiënten geeft. Toekomstig onderzoek zal moeten focussen op de identificatie van drivergenen voor carcinoïdtumorigenese. Aan het *OTP*-gen zal speciale aandacht gegeven moeten worden, niet alleen vanwege de sterke relatie van expressie met prognose, maar ook vanwege de potentiële rol van OTP in vroege carcinoïdbiologie.