

# Molecular alterations during insulinoma tumorigenesis

## Citation for published version (APA):

Jonkers, Y. M. H. (2007). *Molecular alterations during insulinoma tumorigenesis*. Universiteit Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/2007

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# CHAPTER 7

## Summary

Pancreatic cancer can originate from exocrine (duct or acinar) cells, which produce amongst others digestive enzymes, or from endocrine cells, which produce hormones. In insulin-secreting endocrine pancreatic tumors, also called insulinomas, the uncontrolled hormone production can lead to life-threatening symptoms, such as low blood glucose. The only feature that per definition separates benign from malignant disease is organ and/or lymph node infiltration or distant metastases. If only a primary lesion is identified, however, no reliable clinico-pathological parameters are available to indicate their biological behavior. The aim of this thesis was to obtain a better understanding of the molecular processes underlying the development of insulinomas and to identify molecular markers that can reliably discriminate benign from malignant tumors and predict prognosis.

**Chapter 1** introduces the basic clinical and molecular characteristics of insulinoma.

In **chapter 2** a series of 62 sporadic insulinomas was studied to examine the role of mutations in the multiple endocrine neoplasia type 1 (*MEN1*) gene and chromosomal alterations in the development and malignant progression of these tumors. Only one tumor with a somatic *MEN1* mutation was identified, indicating that mutations in this gene do not play a prominent role. Conventional comparative genomic hybridization (CGH) analysis revealed that the total number of genomic aberrations per tumor differs strongly between benign and malignant tumors, i.e. 4.2 versus 14.1, respectively ( $p < 0.0001$ ). By using the presence of at least 8 chromosomal aberrations per tumor as a threshold value to define chromosomal instability (CIN), this parameter proved to be a powerful indicator of metastatic disease. Furthermore, we identified chromosome 9q gain as the most frequent aberration in both benign and malignant insulinomas, and a strong association of chromosome 6q losses and 12q, 14q and 17pq gains with metastatic disease.

To improve the resolution of conventional CGH (5-10 Mb) and the reliability in the analysis of DNA copy number changes at chromosomes 1p32-pter, 16p, 19 and 22, we have applied the CGH technique to microarrays of 3.7 k genomic DNA clones (resolution ~1 Mb) to study a series of 27 insulinomas (**chapter 3**). Array CGH most frequently detected losses of chromosome 11q and 22q and gains of chromosome 9q with the chromosomal regions of interest (CRI) being 11q24.1 (56%), 22q13.1 (67%), 22q13.31 (56%), and 9q32 (63%). Evaluation of the simultaneous occurrence of these aberrations in the individual tumors revealed that gain of chromosome 9q32 and loss of 22q13.1 are early genetic events in insulinoma development, occurring independently of the other alterations. In tumors with an increased genomic complexity, these alterations are often simultaneously detected in the same tumor cells. Losses of 11q24.1 and 22q13.31 are also associated

with these more advanced tumor cases. The identified chromosomal regions most likely harbor crucial candidate genes important in insulinoma tumorigenesis.

In **chapter 4**, various proposed prognostic markers in endocrine pancreatic tumorigenesis, including proliferative index, tumor size, p53, CK19 status and CIN, have been evaluated to predict metastatic disease in a series of 22 insulinomas. Because only one out of ten malignant tumors showed to harbor a *TP53* mutation and p53 immunopositivity, and CK19 immunopositivity was detected in three malignant tumors and one tumor with uncertain behavior, these markers were considered unsuitable for this purpose. Array CGH analysis revealed that  $\geq 20$  chromosomal alterations of at least 10 Mb, and  $\geq 6$  losses of clones at telomeric ends are the best predictors of malignant progression.

In **chapter 5**, the value of CIN, tumor size, proliferative index and CK19 status was tested to predict clinical outcome in a series of 47 insulinomas and 24 non-insulinoma EPTs. CIN as well as specific chromosomal alterations, such as 3p and 6q losses and 12q gain, turned out to be the most powerful indicators for poor tumor-free survival ( $p \leq 0.0004$ ) and tumor-specific death ( $p \leq 0.0113$ ) in insulinomas. CIN, chromosome 7q gain, and a proliferative index  $\geq 2\%$  were reliable in predicting a poor tumor-free survival in non-insulinoma EPTs ( $p \leq 0.0181$ ), whereas CK19 expression was the most optimal predictor of tumor-specific death in these tumors. Thus, the DNA copy number status proved to be the most sensitive and efficient marker of adverse outcome in insulinomas and of potential interest in non-insulinoma EPTs. As a consequence, we propose that these markers should be used to refine clinical diagnosis.

Finally, in **chapter 6**, the progress that has been made in insulinoma research during the past years is discussed together with the results as described in this thesis. The future perspectives are also pointed out, and comprise the development of a simple prognostic test to predict the clinical outcome of insulinomas, as well as the further evaluation of candidate genes in the chromosomal regions of interest. The identified genes will increase our understanding of the molecular pathogenesis of insulinomas and the molecular pathways involved, which will greatly favor the development of future therapeutic strategies.

# CHAPTER 8

## Samenvatting

Alvleesklierkanker kan ontstaan uit exocriene cellen die onder andere vertering-senzymen produceren, of endocriene cellen die hormonen produceren. In insuline producerende endocriene pancreastumoren (EPTs), zogenaamde insulinomen, kan een ongecontroleerde hormoonproductie leiden tot levensbedreigende symptomen zoals een lage bloedglucose.

Op dit moment zijn er geen goede klinisch bruikbare assays beschikbaar die goedaardige van kwaadaardige tumoren kunnen onderscheiden.

Het doel van dit promotieonderzoek was om een beter inzicht te krijgen in de moleculaire processen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van insulinomen. Verder werd gezocht naar moleculaire markers die een betrouwbaar onderscheid kunnen maken tussen goedaardige en kwaadaardige tumoren en de prognose van insulinoma patiënten kunnen voorspellen.

**Hoofdstuk 1** introduceert de klinische en moleculaire karakteristieken van insulinomen.

In **hoofdstuk 2** is een serie van 62 sporadische insulinomen bestudeerd om de rol van mutaties in het multipele endocriene neoplasie type 1 (*MEN1*) gen en chromosomale afwijkingen in de ontwikkeling en de maligne progressie van deze tumoren te bestuderen. Er werd slechts 1 tumor met een *MEN1* mutatie gevonden, wat impliceert dat mutaties in dit gen geen belangrijke rol spelen in de ontwikkeling van insulinomen. Met behulp van de conventionele “comparative genomic hybridization” (CGH) techniek hebben we gevonden dat het totaal aantal chromosomale afwijkingen per tumor sterk verschilt tussen benigne en maligne tumoren (4.2 versus 14.1,  $p < 0.0001$ ). Door gebruik te maken van de aanwezigheid van tenminste 8 chromosomale afwijkingen per tumor als een grenswaarde voor chromosomale instabiliteit (CIN), bleek deze parameter een sterke indicator voor maligniteit. Verder bleek winst van chromosoom 9q de meest frequente afwijking te zijn in zowel benigne als maligne insulinomen en bleken verlies van chromosoom 6q en winst van chromosoom 12q, 14q en 17pq sterk geassocieerd te zijn met metastasering.

Om de resolutie van de conventionele CGH techniek (5-10 Mb) te verbeteren en tevens de betrouwbaarheid van de analyse van DNA kopieaantal veranderingen in de repetitieve regio's te verhogen, hebben we gebruik gemaakt van de CGH techniek op microarrays met 3700 genomische DNA klonen (resolutie ~1 Mb). Met behulp van deze array CGH techniek hebben we een serie van 27 insulinomen bestudeerd (**hoofdstuk 3**). De meest frequent gedetecteerde afwijkingen met behulp van array CGH waren verlies van chromosoom 11q en 22q en winst van chromosoom 9q met als kritische regio's 11q24.1 (56%), 22q13.1 (67%), 22q13.31 (56%), en 9q32 (63%). Evaluatie van de aanwezigheid van de verschillende afwijkingen per tumor toonde aan dat winst van chromosoom 9q32 en verlies van

22q13.1 vroege genetische afwijkingen zijn in de ontwikkeling van insulinomen en onafhankelijk van de andere afwijkingen kunnen voorkomen. In tumoren met een toegenomen genomische complexiteit worden deze afwijkingen vaak samen aangetroffen in dezelfde tumorcellen. Verlies van 11q24.1 en 22q13.31 worden ook geassocieerd met deze verder gevorderde tumoren. De geïdentificeerde chromosomale regio's bevatten hoogstwaarschijnlijk cruciale kandidaatgenen met een belangrijke rol in de tumorigenese van insulinomen.

In **hoofdstuk 4** zijn verschillende voorgestelde prognostische markers in de tumorigenese van EPTs, zoals proliferatie index, tumorgrootte, p53, cytokeratine 19 status en CIN, geëvalueerd om metastasering te voorspellen in een serie van 22 insulinomen. Omdat slechts 1 van de 10 maligne tumoren een *TP53* mutatie bleek te bezitten en cytokeratine 19 immunopositiviteit gedetecteerd werd in 3 maligne tumoren en 1 tumor met onzeker gedrag, werden deze markers als niet geschikt bevonden. Array CGH analyse toonde aan dat  $\geq 20$  chromosomale afwijkingen van tenminste 10 Mb grootte en  $\geq 6$  verliezen van klonen aan de telomeer uiteinden de beste voorspellers zijn van maligne progressie.

In **hoofdstuk 5** is de waarde van CIN, tumorgrootte, proliferatie index en cytokeratine 19 status getest om de klinische prognose van 47 insulinoma patiënten en 24 patiënten met andere EPTs te voorspellen. Zowel CIN als specifieke chromosomale afwijkingen, zoals verlies van chromosoom 3p en 6q en winst van chromosoom 12q, bleken de sterkste indicatoren te zijn voor een slechte tumorvrije overleving ( $p \leq 0.0004$ ) en tumorspecifieke dood ( $p \leq 0.0113$ ) in insulinomen. CIN, chromosoom 7q winst en een proliferatie index  $\geq 2\%$  bleken betrouwbaar in het voorspellen van een slechte tumorvrije overleving in de andere EPTs ( $p \leq 0.0181$ ), terwijl cytokeratine 19 expressie de meest optimale voorspeller was van tumorspecifieke dood in deze tumoren. Dus de DNA kopieaantal status bleek de meest sensitieve en efficiënte prognostische marker te zijn voor insulinomen en tevens een potentiële marker voor de andere EPTs. Deze markers zouden gebruikt moeten worden om de klinische diagnose van deze tumoren te verfijnen.

Tenslotte wordt in **hoofdstuk 6** de vooruitgang die geboekt is in het insulinoma onderzoek bediscussieerd samen met de resultaten die beschreven zijn in dit profefschrift. Tevens worden de toekomstplannen beschreven. Deze bestaan uit het ontwikkelen van een eenvoudige test om de klinische prognose van insulinomen te voorspellen, alsmede de verdere evaluatie van kandidaatgenen in de betrokken chromosomale regio's. De geïdentificeerde genen zullen onze kennis van de moleculaire pathogenese van insulinomen vergroten en, uiteindelijk, bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën in de toekomst.