

# Molecular profiling of ovarian serous neoplasms : defining the borderline

Citation for published version (APA):

Bijsmans, I. T. G. W. (2011). *Molecular profiling of ovarian serous neoplasms : defining the borderline*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20111021ib>

## Document status and date:

Published: 01/01/2011

## DOI:

[10.26481/dis.20111021ib](https://doi.org/10.26481/dis.20111021ib)

## 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.

# **SAMENVATTING**

Eierstokkanker, oftewel ovariumkanker, is de belangrijkste doodsoorzaak bij vrouwen met een tumor van het vrouwelijke geslachtsorgaan. De lange termijn overleving varieert van 10-30% bij vergevorderde ziekte tot 80-90% wanneer de ziekte in een vroeg stadium ontdekt wordt, terwijl de 5-jaars overleving van patiënten met een ovariële borderline tumor 90-95% bedraagt. Het hoge sterftecijfer wordt verklaard doordat de ziekte vaak pas in een vergevorderd stadium ontdekt wordt, omdat deze vrouwen doorgaans geen klachten hebben. Hierdoor heeft de tumor zich al kunnen verspreiden in de buikholte. Het biologisch gedrag van sereuze borderline tumoren (SBTs) en carcinomen (SCAs) is nog niet helemaal bekend. Over het ontstaan van deze tumoren bestaat nog onenigheid.

Het doel van dit proefschrift was te onderzoeken of SBTs en SCAs van elkaar onderscheiden kunnen worden. Onderscheid tussen deze tumoren is klinisch zeer relevant, omdat behandeling en prognose aanzienlijk verschillen. Het is dus van groot belang de onderliggende biologische mechanismen te ontrafelen. Tumorclassificatie en differentieel diagnose stelling kunnen verbeterd worden door gebruik te maken van additionele hulpmiddelen. Wij hebben hiervoor gebruik gemaakt van immunohistochemische- en moleculair biologische technieken.

Een eerder uitgevoerde microarray studie toonde aan dat ondanks het feit dat de MAPK signaleringsroute geactiveerd is in SBTs, activatie van downstream genen die betrokken zijn bij degradatie van de extracellulaire matrix niet plaatsvond. *SerpinA5*, een urokinase Plasminogen Activator remmer, werd geïdentificeerd als een belangrijke speler in het indolente karakter van SBTs. Onze hypothese was dat *SerpinA5* eiwitexpressie verlaagd of zelfs afwezig zou zijn in SCAs aangezien deze tumoren een verlaagde *SerpinA5* mRNA expressie vertonen. Om deze hypothese te testen werd *SerpinA5* eiwitexpressie bepaald met behulp van een immunohistochemische kleuring (**Hoofdstuk 2**). *SerpinA5* eiwitexpressie was inderdaad verminderd of afwezig in SCAs. Ter validatie werd *SerpinA5* eiwitexpressie bepaald in een grote, onafhankelijke studiepopulatie. Van een groot aantal patiënten was ook een omentum (buikvlies) metastase beschikbaar. De *SerpinA5* eiwitexpressie bleek significant lager in de metastase dan in de corresponderende primaire tumor. Interessant was de bevinding dat *SerpinA5* eiwitexpressie verlaagd was in hoog stadium SBTs (vaak gekarakteriseerd door micropapillaire groei en/of microinvasie) in vergelijking tot vroeg stadium SBTs. Dit geeft aan dat het verlies van *SerpinA5* geassocieerd is met agressievere tumoren. Om moleculaire verschillen tussen SBTs en SCAs te identificeren, werden de microarray data verder bestudeerd in **Hoofdstuk 3**. Significance analysis of microarrays (SAM) and Ingenuity Pathway analyse toonde aan dat *E2Fs* en *CDKN1A* (*p21*) een centrale rol spelen in celcyclus deregulatie in SCAs. Een significante toename in mRNA expressie van de transcriptiefactoren *E2F1* en *E2F3* en hun targetgenen werd gedetecteerd in SCAs, terwijl de celcyclus remmer *CDKN1A* opgereguleerd was in SBTs. *E2Fs* werden geïdentificeerd als sleutelgenen in hooggradige SCAs (HG-SCAs). Deze data wijzen erop dat SBTs en SCAs verschillende entiteiten zijn: de celcyclus is geactiveerd in SCAs, terwijl deze geremd wordt in SBTs. In **Hoofdstuk 4** werd met behulp van multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analyse onderzocht of SBTs van SCAs van elkaar onderscheiden konden worden aan de hand van het aantal chromosoom

kopieën. SCAs bevatten significant meer kopieën dan SBTs. Cluster analyse toonde aan dat de meerderheid van de SBTs en SCAs apart clusteren. Dit ondersteunt de hypothese dat SBTs en HG-SCAs afzonderlijke entiteiten zijn. Tevens werd beslisboom analyse uitgevoerd om te bekijken of een betere voorspelling van het type tumor gemaakt kon worden aan de hand van de MLPA data. In 83/86 (96.5%) van de patiënten werd de tumor juist geclassificeerd als SBT dan wel SCA aan de hand van chromosoom kopie toename (gain) van *MDS1 and EVI1 complex locus (MECOM)*, *LIM domain Kinase 1 (LIMK1)*, *NFκB Inhibitor Epsilon (NFKBIE)* en *Nuclear Receptor Coactivator 3 (NCOA3)* en verlies (loss) van *Actinin alpha 4 (ACTN4)*. Deze data demonstreren dat de analyse van veranderingen in het aantal chromosoom kopieën van deze 5 sleutelgenen gebruikt kan worden voor de moleculaire classificatie van SBTs en SCAs en hierbij de patholoog kunnen assisteren bij het stellen van de differentieel diagnose. Technieken gebaseerd op PCR technologie, zoals MLPA, zijn relatief gemakkelijk te implementeren in een moleculair diagnostisch laboratorium. *ACTN4*, *MECOM*, *NCOA3*, en *NFKBIE* kunnen gebruikt worden als diagnostische makers voor het onderscheid tussen SBTs en SCAs aangezien deze genen alleen chromosomale veranderingen vertoonden in SCAs. Naast genetische veranderingen worden genexpressie veranderingen vaak veroorzaakt middels epigenetische mechanismen. De best gekarakteriseerde en meest bestudeerde epigenetische verandering in kanker is promotor CpG eiland hypermethylering van tumor suppressor genen. Tot op heden zijn er weinig studies gepubliceerd die epigenetische veranderingen in sereuze ovariumtumoren onderzochten. De zoektocht naar nieuwe gehypermethyleerde tumor suppressor genen die in staat zijn te discrimineren tussen SBTs en SCAs is beschreven in **Hoofdstuk 5**. Hiervoor werden 3 analysemethoden gebruikt: 1) de kandidaat gen analyse (gebaseerd op genen die vaak gemethyleerd zijn in andere tumoren); 2) promoter sequentie (genoom-brede analyse van promoter regio in combinatie met specifieke motieven in de promoter regio); en 3) farmacologische behandeling van gehypermethyleerde tumor suppressor genen om zo genen die transcriptioneel inactief zijn te reactiveren. Onze resultaten tonen aan dat promotor CpG eiland hypermethylering niet vaak voorkomt in sereuze ovariumtumoren. *Betaine-homocysteine methyltransferase 2 (BHMT2)* en *cysteine dioxygenase type I (CDO1)* werden geïdentificeerd als markers die differentieel gemethyleerd zijn tussen SBTs en SCAs. We tonen kanker-specifieke *BHMT2* promotor CpG eiland hypermethylering aan in de regio downstream van de transcriptiestartplaats (**Hoofdstuk 6**). De *in vitro* tumor suppressieve werking van *BHMT2*, een methyltransferase die de re-methylering van homocysteïne naar methionine katalyseert, werd onderzocht in **Hoofdstuk 6** door gebruik te maken van een ovariumkanker cellijn waarin *BHMT2* expressie hersteld werd door overexpressie van een *BHMT2* construct. Herstel van *BHMT2* expressie resulteerde in verminderde kolonie vorming, invasie en migratie. Deze data geven aan dat *BHMT2 in vitro* een kandidaat tumor suppressor gen is in sereuze ovariumtumoren. De algemene discussie in **Hoofdstuk 7** vat de belangrijkste bevindingen van de studies die beschreven zijn in dit proefschrift samen. Dit wordt gevolgd door suggesties voor diagnostische en klinische toepassingen voor de geïdentificeerde genen, alsook toekomstplannen.

Samenvattend hebben wij verschillende markers gevonden die onderscheid kunnen maken tussen SBTs en SCAs. Deze nieuwe genen zullen weliswaar gevalideerd moeten worden in onafhankelijke prospectieve en retrospectieve populaties voordat de genen c.q. testen geïntroduceerd kunnen worden in de kliniek voor trials en/of als diagnostisch hulpmiddel. Uiteindelijk zal gedetailleerde informatie over de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij sereuze ovariële carcinogenese leiden tot de identificatie van prognostische en predictieve markers die gebruikt kunnen worden om zo patiënten te selecteren die baat zullen hebben bij de verschillende behandelingsstrategieën. Hopelijk kan in de toekomst de aanpak van deze ziekte worden aangepast aan de eigenschappen van het (epi)genoom van de individuele patiënt, de zogenoemde personalized medicine.



# SUMMARY

Ovarian cancer is a leading cause of cancer-related deaths among women with gynecologic malignancies. Long-term survival rates range from 10-30% for advanced disease, to 80-90% for early-stage disease and are above 90% for borderline tumors. The high mortality is related to the fact that in most cases the disease has already spread to the upper abdomen at time of presentation because women generally do not have complaints. The biology of serous borderline tumors (SBTs) and serous carcinomas (SCAs) is not completely understood yet. Multiple hypotheses for tumor development exist, either favoring a progression model or believing that these tumors are distinct entities.

The aim of this thesis was to investigate whether SBTs can be distinguished from SCAs. Since the distinction between SBTs and SCAs is important from a clinical point of view as both patient management and prognosis differ considerably, it is important to unravel the underlying biological mechanisms. Additional tools to assist pathologists in making the differential diagnosis could aid better tumor classification. Immunohistochemical and molecular biological approaches were performed in this respect.

Our previous microarray study revealed that although the MAPK pathway is activated in SBTs, activation of downstream genes involved in extracellular matrix (ECM) degradation is absent, suggesting an uncoupling of these events. *Serpina5*, an urokinase Plasminogen Activator-inhibitor, a key regulator for indolent borderline behavior, was identified in this study. Since SCAs are characterized by loss of *Serpina5* mRNA expression, we hypothesized that SerpinA5 protein expression is reduced or lost in SCAs as compared to SBTs. To address this hypothesis, SerpinA5 protein expression was determined by immunohistochemistry in **Chapter 2**. Reduced or absent SerpinA5 protein staining was observed in SCAs as compared to SBTs. To validate these results, loss of SerpinA5 protein expression was performed in a larger, independent patient population, also including omental metastases. SerpinA5 protein expression was significantly lowered in the omental metastases when compared to the matching primary SCA. Interestingly, SerpinA5 protein expression was reduced in advanced-stage SBTs, often characterized by micropapillary growth and/or microinvasion, when compared to early-stage SBTs, indicating that SerpinA5 loss is associated with more aggressive tumors. Further microarray data exploration to identify molecular differences between SBTs and SCAs is described in **Chapter 3**. Significance analysis of microarrays (SAM) and Ingenuity Pathway analysis revealed central roles for *E2Fs* and *CDKN1A* (*p21*) in SCA cell cycle deregulation. A significant increase in mRNA expression of the transcription factors *E2F1* and *E2F3*, and their target genes was observed in SCAs as compared to SBTs, whereas the cell cycle inhibitor *CDKN1A* was upregulated in SBTs. *E2Fs* were identified as fundamental cell cycle deregulators in high-grade SCAs (HG-SCAs). These data show that SBTs and SCAs are different entities since the cell cycle progression pathway is activated in SCAs, while inhibited in SBTs. In **Chapter 4**, we investigated if SBTs and SCAs can be distinguished from each other based on DNA copy number alterations (CNAs) as determined by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis. SCAs contained significantly more CNAs as compared to SBTs. Unsupervised hierarchical clustering of CNAs showed that the majority of SBTs



and SCAs clustered separately, supporting the hypothesis that SBTs and HG-SCAs are unrelated entities. Moreover, decision tree analysis based on MLPA data was performed to investigate whether a more accurate prediction of SBTs and SCAs could be achieved. Gain of *MDS1 and EVI1 complex locus (MECOM)*, *LIM domain Kinase 1 (LIMK1)*, *NFκB Inhibitor Epsilon (NFKBIE)* and *Nuclear Receptor Coactivator 3 (NCOA3)* and loss of *Actinin alpha 4 (ACTN4)* predicted correctly whether a tumor was a SBT or SCA in 83/86 (96.5%) cases. These data indicate that analysis of CNAs of these 5 key genes may be used for molecular classification of SBTs and SCAs thereby assisting pathologists in making the differential diagnosis. Since PCR-based techniques are relatively easy to implement in molecular diagnostic settings, *ACTN4*, *MECOM*, *NCOA3*, and *NFKBIE* might be used as diagnostic markers in the discrimination between SBTs and SCAs since these genes were only altered in SCAs. In addition to genetic alterations, epigenetic mechanisms frequently alter gene expression. Promoter CpG island hypermethylation of tumor suppressor genes (TSGs) is the best characterized and most studied epigenetic alteration in cancer. However, only a few studies investigating epigenetic silencing in serous ovarian tumors have been published. The search for novel hypermethylated TSGs in serous ovarian tumors able to discriminate between SBTs and SCAs are described in **Chapter 5**. Three approaches were used: 1) a candidate gene approach (literature-based genes reported to be frequently methylated in other cancers); 2) promoter sequence (genome-wide promoter alignment in combination with specific sequence motifs in the promoter region of CpG islands); and 3) pharmacological unmasking of hypermethylated TSGs to reactivate transcriptional silenced genes. Overall, our results indicated that promoter CpG island hypermethylation of candidate markers is not a frequently occurring event in serous ovarian tumors. *Betaine-homocysteine methyltransferase 2 (BHMT2)* and *cysteine dioxygenase type 1 (CDO1)* were identified as novel markers differentially methylated between SBTs and SCAs. We showed cancer-specific *BHMT2* promoter CpG island hypermethylation at the region downstream of the transcription start site (**Chapter 6**). The *in vitro* tumor suppressive properties of *BHMT2*, a methyltransferase catalyzing the remethylation of homocysteine to methionine, were investigated in **Chapter 6** using an ovarian cancer cell line in which we restored *BHMT2* expression by overexpression. Restoration of *BHMT2* reduced colony formation, invasion and migration, indicating that *BHMT2* is a novel candidate tumor suppressor gene *in vitro* in serous ovarian cancer. The general discussion in **Chapter 7** summarizes the major findings of the studies presented in this thesis, followed by suggestions for diagnostic and clinical applications of the identified genes and future directions.

In conclusion, we identified several markers able to discriminate between SBTs and SCAs. However, these novel genes need to be validated in independent prospective and retrospective populations before the tests can be introduced in clinical practice for trials and/or as a diagnostic tool. In the end, detailed information about molecular mechanisms involved in serous ovarian carcinogenesis will lead to the identification of prognostic and predictive markers that can be used to select patients likely to benefit from different treatment strategies. Hopefully, (epi)genomes of individual patients will become available to direct personalized medicine of ovarian serous tumors.