

# Chromosomal aberrations during head and neck carcinogenesis

## Citation for published version (APA):

Veltman, J. A. (1999). *Chromosomal aberrations during head and neck carcinogenesis*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/1999

## 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 8*

---

### Summary

---

The overall aim of this thesis was to obtain more insight into the genetic changes underlying head and neck carcinogenesis. Attention was focussed on chromosomal changes in premalignant head and neck lesions, and on the potential use of chromosomal markers for diagnostic and prognostic purposes.

In **chapter 1** an overview is presented of the current theories concerning the genetic evolution of neoplasia, with special focus on head and neck carcinogenesis. Although much insight has been gained on the different genetic alterations involved in the development of these neoplasms, the sequence of events and the effects on the biological behavior of the cancerous cells are still poorly understood. Head and neck carcinogenesis provides an ideal model to study these phenomena since the mucosa of the head and neck are easily accessible and precursor lesions progressing to invasive cancer are frequently identified in these mucosa.

In **chapter 2**, the acquisition of chromosome copy number changes was studied in subsequent stages of laryngeal carcinogenesis. In this study, tissue sections from a large series of premalignant laryngeal lesions were hybridized with DNA probes for the chromosomes 1 and 7. This in situ hybridization (ISH) analysis did not reveal numerical chromosomal aberrations in histologically normal laryngeal mucosa and in most lesions with only hyperplasia. In contrast, approximately 90% of the lesions with dysplasia were shown to contain an abnormal chromosome content, a percentage also obtained for invasive laryngeal cancer. Clonal expansion of these aneusomic cell populations was evidenced by the fact that the entire dysplastic lesion contained nuclei with abnormal chromosome numbers, whereas adjacent non-dysplastic areas did not contain chromosome aneusomy. An analysis of the pattern of chromosome abnormalities revealed that most lesions with mild or moderate dysplasia were tetrasomic for both chromosomes, whereas most lesions with severe dysplasia or carcinoma in situ (CIS) contained chromosome copy number imbalances and polyploidization. Of clinical importance was our finding that the presence of these latter markers for genomic instability predicted progression towards invasive growth.

These findings, which were confirmed in **chapter 3** with ISH analyzes for chromosomes 9, 17, and 18, indicate that different steps in chromosome aneuploidization can be detected in subsequent steps of laryngeal carcinogenesis. It is concluded that tetraploidization precedes a phase of genetic instability during which cells show a random gain or loss of chromosomes. In addition, it was shown that chromosomal aberrations are occasionally present in small groups of cells not showing histological signs of nuclear atypia. Strikingly, a number of hyperplastic lesions

preceding invasive cancer were shown to contain a trisomy for chromosome 7.

Another genetic change frequently observed in solid tumors is the functional inactivation of specific tumor suppressor genes. Loss of heterozygosity (LOH) of loci on chromosome 9p21 and 17p13 has been reported to be among the earliest detectable genetic changes in head and neck carcinogenesis. Two of the potential target genes at these loci, i.e. p16<sup>INK4a</sup> and p53, are both involved in cell cycle control and a functional inactivation of these genes leads to uncontrolled cell division and possibly DNA aneuploidy. In contrast, LOH of 18q21 appears to be associated with tumor progression. In **chapter 3** it was shown that LOH of 9p21 and 17p13 are among the earliest genetic events in laryngeal carcinogenesis, detectable a number of hyperplastic lesions with trisomy for chromosome 7. LOH of these loci was present in most dysplastic lesions that were typically tetraploid and p53 positive. LOH of 18q21 was present in histologically more advanced lesions containing chromosome copy number imbalances and polyploidization.

Since genetic instability seems to be an intrinsic factor in tumorigenesis, it might be expected that the cells that form an invasive tumor are not genetically alike, although they are monoclonal of origin. In **chapter 4** we investigated whether invasive HNSCCs consist of one clone with a specific pattern of chromosomal abnormalities, or whether multiple clones with distinct chromosomal constitutions are present within such malignancies. We showed that double-target fluorescence in situ hybridization was highly suited for the mapping of chromosome patterns in nuclear suspensions of cancers. It is concluded that great inter-tumor heterogeneity exists in the pattern of chromosomal aberrations, indicating that these patterns arise as a result of random chromosome gains and losses, caused by an overall genomic instability in a premalignant stage of the disease. This instability is less evident during invasive growth, because only limited intra-tumor heterogeneity was observed in the chromosome constitution.

In **chapters 5 and 6** the usefulness of genomic markers has been explored for the detection of malignancy in both resection margins of HNSCCs as well as in head and neck cytopathology. These markers may be more objective parameters of the malignant potential of a cell population than the histological features.

The presence of (pre)malignant cells in the resection margin of a tumor specimen constitutes a high risk for the development of local recurrence, one of the major problems in head and neck oncology. In **chapter 5** we

show that genetic abnormalities, as detected by either in situ hybridization and/or p53 immunohistochemistry, are frequently present in the resection margins of oral squamous cell carcinomas. These genetic abnormalities can serve as indicators of the completeness of the surgical resection. In this study also a strong correlation between the presence of numerical chromosomal aberrations and p53 overexpression was demonstrated in premalignant stages of disease. This indicates that the p53-aneuploidy route is important for the generation of genetic instability in these stages of head and neck carcinogenesis.

Non-invasive methods for the detection of (pre)malignant cells are of great importance in the screening of high risk populations, such as heavy smokers and alcohol consumers, and in the clinical follow-up of HNSCC patients at risk for the development of local recurrences and second primary tumors. In **chapter 6** we report the applicability of the FISH technique to detect genetically aberrant cells in brush specimens taken from the tumor regions of HNSCC patients. 75% of these cytologic specimens were found to contain chromosomal alterations in more than 5% of the cells collected. Chromosomal aberrations were detected in all cytologic specimens taken from DNA aneuploid HNSCCs, indicating that the cells in these specimens correctly reflect the cells within the solid tumor.

Finally in **chapter 7** the fundamental as well as the clinical implications of the results described in this thesis are discussed, and the future perspectives are pointed out.

## *Chapter 9*

---

### Samenvatting

---

Het doel van dit promotie-onderzoek was inzicht te verkrijgen in de genetische veranderingen zoals die optreden tijdens de ontwikkeling van tumoren in het slijmvlies van het hoofd-halsgebied. In detail werd gekeken naar de chromosoom-inhoud van klinische en histologische voorloperstadia van hoofd-halstumoren (zogenaamde premaligne laesies). Verder werd de mogelijkheid onderzocht om chromosomale veranderingen te gebruiken voor diagnostische en prognostische doeleinden.

In **hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van de literatuur betreffende de genetische evolutie van tumoren, met speciale aandacht voor de groep van hoofd-halstumoren. Alhoewel reeds veel inzicht is verkregen in de genetische veranderingen betrokken bij de ontwikkeling van deze tumoren, is nog grotendeels onduidelijk wanneer en in welke volgorde bepaalde veranderingen optreden. Het hoofd-halsgebied is bij uitstek geschikt voor het in kaart brengen van genetische kanker progressie, aangezien dit gebied goed toegankelijk is voor inspectie en er bovendien frequent premaligne laesies worden waargenomen die zich progressief ontwikkelen.

In **hoofdstuk 2** wordt een studie beschreven waarin gekeken is naar veranderingen in chromosoom-aantallen in opeenvolgende histologische stadia van de carcinogenese van stembandepitheel (normaal epitheel, hyperplasie, dysplasie, carcinoma in situ, carcinoma). Voor deze studie werden weefselcoupes van een grote serie premaligne laesies van de stemband onderzocht met behulp van in situ hybridisatie (ISH) voor de chromosomen 1 en 7. Deze ISH analyse toonde geen numerieke chromosoom-veranderingen in histologisch normaal stembandepitheel. Hetzelfde gold voor het merendeel van de laesies met uitsluitend hyperplasie. In sterk contrast hiermee was de observatie dat ongeveer 90% van alle dysplastische laesies een afwijkend chromosoom patroon vertoonden. Deze chromosomaal afwijkende celpopulaties zijn zeer waarschijnlijk ontstaan door klonale uitgroei, aangezien de afwijkingen meestal in een histologisch begrensd gebied gevonden werden. Een verdubbeling van de chromosoom-inhoud (tetraploidisatie) werd waargenomen in de meeste laesies met milde of matige dysplasie. In een volgend histologisch stadium (ernstige dysplasie of carcinoma in situ) bleken de chromosoom-aantallen niet meer in balans en werden vaak 5 tot 8 kopieën van de chromosomen 1 en 7 gevonden. Deze laatste chromosoom patronen vormen een sterke indicatie voor genetische instabiliteit en bleken statistisch significant geassocieerd met maligne ontaarding van premaligne laesies.

Deze bevindingen, die in **hoofdstuk 3** werden bevestigd met ISH analyses voor de chromosomen 9, 17 en 18, tonen aan dat

verschillende stappen in chromosoom aneuploidisatie gedetecteerd kunnen worden in histologisch opeenvolgende fasen van de stembandepitheel carcinogenese. Na tetraploidisatie ontstaat genetische instabiliteit, hetgeen ervoor zorgt dat chromosoom-aantallen willekeurig toe- of afnemen. Bovendien werd aangetoond dat chromosomale afwijkingen soms in kleine groepen hyperplastische cellen zonder histologische kenmerken van dysplasie voorkomen.

Naast veranderingen in chromosoom-aantallen wordt vaak inactivatie van specifieke tumor suppressor genen gevonden in solide tumoren. Dit verlies van heterozygositeit (LOH) van gebieden op de chromosomen 9 (9p21) en 17 (17p13) lijkt zeer vroeg op te treden tijdens de ontwikkeling van hoofd-halstumoren. Twee belangrijke tumorsuppressorgenen die in deze gebieden liggen, p16<sup>INK4a</sup> en p53, zijn beiden betrokken bij de controle van de celdeling. Een functionele inactivatie van deze genen leidt tot ongecontroleerde celdeling met als mogelijk gevolg DNA aneuploidie. Door het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 3** wordt inderdaad bevestigd dat LOH van 9p21 en 17p13 zeer vroeg optreedt in de ontwikkeling van stemband-kanker. Deze afwijkingen werden geconstateerd in enkele hyperplastische laesies met beperkte veranderingen in chromosoom-aantallen. Dysplastische laesies worden gekenmerkt door een tetraploïde DNA inhoud, LOH voor zowel 9p21 als 17p13 en een afwijkende expressie van het p53 gen. LOH voor 18q21 bleek duidelijk later op te treden in het proces van tumorprogressie en geassocieerd te zijn met de fase waarin genetische instabiliteit optreedt, nog voor invasieve tumorgroei.

Over het algemeen wordt aangenomen dat kanker ontstaat uit één enkele ontregelde cel (een kloon) en dat de cellen in een tumor dus sterk genetisch verwant zijn. Aangezien genetische instabiliteit een belangrijke eigenschap is van tumorcellen, kan toch een diversiteit aan genetische profielen in een invasieve tumor verwacht worden. **Hoofdstuk 4** beschrijft een studie waarin werd onderzocht of hoofd-halstumoren bestaan uit één kloon met een specifiek chromosoompatroon, of dat meerdere klonen met verschillende patronen aanwezig zijn in deze tumoren. Het bleek dat simultane detectie van 2 chromosomen middels fluorescente ISH zeer geschikt is voor het in kaart brengen van chromosoompatronen van tumor celsuspensies. Eén van de conclusies van dit onderzoek is dat er grote verschillen bestaan in de chromosoompatronen tussen de individuele hoofd-halstumoren. Dit betekent dat deze patronen ontstaan zijn als gevolg van een min of meer willekeurig proces van chromosoomverlies en -winst in premaligne stadia. Is de tumor eenmaal invasief groeiend dan blijft het genetisch profiel redelijk stabiel aangezien er maar een beperkte heterogeniteit in



chromosoom-patronen werd gevonden binnen individuele hoofd-halstumoren.

In de **hoofdstukken 5 en 6** is de mogelijke toepassing van chromosomale merkers voor de detectie van maligne cellen onderzocht in zowel de snijranden van geopereerde tongtumoren als in cytologische uitstrijkjes van hoofd-halstumoren. Deze merkers vormen mogelijk meer objectieve parameters ter bepaling van het maligne potentieel van een celpopulatie dan de histologie.

Het nog aanwezig zijn van maligne cellen in de snijrand van een tumorpreparaat is sterk geassocieerd met de ontwikkeling van een lokaal recidief na operatie en is één van de voornaamste klinische problemen in de hoofd-halsoncologie. In **hoofdstuk 5** wordt aangetoond dat genetische afwijkingen, zoals te detecteren met ISH en/of p53 immunohistochemie, frequent voorkomen in de snijranden van tongtumoren. Deze genetische afwijkingen kunnen mogelijk dienen als indicatoren ter bepaling van de uitgebreidheid van de tumor. In deze studie werd bovendien in voorstadia van tongkanker een sterke correlatie gevonden tussen de aanwezigheid van numerieke chromosoom-veranderingen en de aberrante expressie van het p53 gen. Dit geeft aan dat de p53-aneuploidie route belangrijk is voor het ontstaan van genetische instabiliteit in de eerste fasen van de hoofd-halscarcinogenese.

Niet-invasieve methoden voor de detectie van (pre)maligne cellen zijn van groot belang voor de screening van patiënten die een hoog risico lopen hoofd-halskanker te ontwikkelen, zoals tabak- en alcoholgebruikers, alsmede bij de follow-up van patiënten met een hoofd-halstumor. In **hoofdstuk 6** wordt de toepasbaarheid van de fluorescente ISH techniek aangetoond voor de detectie van chromosomaal afwijkende cellen in cytologische uitstrijkjes van hoofd-halstumoren. 75% van de onderzochte cytologische preparaten bevatte genetische afwijkingen in meer dan 5% van de cellen. Vergelijkbare chromosomale veranderingen werden gevonden in alle cytologische preparaten en de DNA aneuploïde tumoren waarvan ze waren afgenomen, hetgeen aantoont dat de cellen in deze preparaten een correcte afspiegeling zijn van de cellen in de solide tumor.

Tenslotte worden in **hoofdstuk 7** de implicaties van de resultaten voor zowel het fundamentele kankeronderzoek als ook voor de diagnostiek en behandeling van hoofd-halstumoren besproken en wordt aangegeven welke richting het kanker-onderzoek van het hoofd-halsgebied in de komende jaren zou kunnen inslaan.