

Biomarkers in baarmoederslijm- vliestumoren en daaraan gerela- teerde gynaecologische tumoren

Biomarkers of endometrial cancer and related gynaecological malignancies

L.M.S. Seeber

Samenvatting

Het endometriumcarcinoom is met ongeveer 1.600 nieuwe gevallen in Nederland per jaar de meest voorkomende gynaecologische tumor. Over het algemeen is de prognose vrij gunstig met een algehele vijfjaarsoverleving van ongeveer 80%. In 10% van de gevallen is er sprake van een sereus papillair endometriumcarcinoom (UPSC). Deze tumor is biologisch anders, agressiever van aard en verantwoordelijk voor ongeveer 50% van alle recidieven. Het UPSC vertoont zowel histologisch als klinisch erg veel overeenkomsten met het sereus papillair ovarium- en tubacarcinoom. Aangezien zowel de prognose als behandeling anders zijn, is het van belang de tumoren juist te classificeren. Dit is echter op basis van histologisch beeld niet altijd eenvoudig. Op 2 december 2010 promoveerde mw. drs. L.M.S. Seeber aan de Universiteit Utrecht op het proefschrift 'Biomarkers in baarmoederslijmvlies tumoren en daaraan gerelateerde gynaecologische tumoren'. Zij deed dit onder begeleiding van promotoren dhr. prof. dr. P.J. van Diest en dhr. prof. dr. R.H.M. Verheijen, en compromoter dhr. dr. R.P. Zweemer. In dit proefschrift worden genetische en epigenetische veranderingen beschreven in endometrium-, ovarium- en tubacarcinoom. De variaties en mogelijke overeenkomsten kunnen beter inzicht verschaffen in het ontstaan van de tumoren. Daarnaast is gekeken naar mogelijke diagnostische en prognostische factoren die in de toekomst zouden kunnen helpen het gedrag van deze tumoren (beter) te voorspellen.

(Ned Tijdschr Oncol 2011;8:308-11)

Summary

In the western world, endometrial cancer is the most common malignancy of the female genital tract. In the Netherlands, the incidence of endometrial cancer is 1,600 per year. In general, prognosis is good with a five-year's overall survival of 80%. Uterine serous papillary carcinoma (UPSC), that accounts for 10% of endometrial cancers, is responsible for approximately 50% of all relapses. UPSC share their aggressive clinical behaviour and their histological appearance with serous carcinoma of the Fallopian tube and ovary. Since classification has therapeutic and prognostic implications, it is important to make the proper diagnosis. However, based on histology this may be difficult. The 2nd of December 2010, L.M.S. Seeber defended her PhD-thesis 'Biomarkers of endometrial cancer and related gynaecological malignancies' at Utrecht University under supervision of P.J. van Diest, MD, PhD, R.H.M. Verheijen, MD, PhD, and co-promotor R.P. Zweemer, MD. The aims of this thesis were to gain a better insight in the molecular pathogenesis of endometrial cancer and related gynaecological malignancies, and to identify possible diagnostic and prognostic markers.

Auteur: mw. dr. L.M.S. Seeber, AIOS gynaecologie, St. Antonius Ziekenhuis, Koekoekslaan 1, 3435 CM Nieuwegein, tel.: 06 14 98 19 01, e-mailadres: l.seeber-2@umcutrecht.nl

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: Nederlandse Kankerbestrijding project 2009-4375.

Trefwoorden: hypoxie, methylering, sereus endometriumcarcinoom

Key words: hypermethylation, hypoxia, uterine papillary serous carcinoma

Inleiding

Jaarlijks wordt bij ongeveer 1.600 vrouwen in Nederland een endometriumcarcinoom gediagnosticeerd. Hiermee is het in Nederland en de gehele westerse wereld de meest voorkomende gynaecologische tumor. Jaarlijks overlijden in Nederland ongeveer 350 vrouwen aan de ziekte.¹ Histologisch zijn er grofweg 2 typen te onderscheiden. In 90% van de gevallen gaat het om endometrioïde endometriumcarcinomen (EEC), behorende tot de zogenoemde 'type I-tumoren', met een relatief gunstige prognose.² De overige 10%, voornamelijk bestaande uit sereus papillaire endometriumcarcinomen (UPSC) ('type II-tumoren'), is agressiever van aard.³ Het is van belang de tumoren juist te classificeren aangezien naast de prognose ook de behandeling anders is.

De behandeling van EEC is primair chirurgisch met, indien geïndiceerd, adjuvante radiotherapie en soms chemotherapie (Portec III).⁴ De behandeling van het UPSC daarentegen omvat vanwege vroege intra-abdominale metastasering uitgebreide chirurgische stadiëring. Daarnaast bestaat de trend deze tumoren te behandelen met adjuvante radiotherapie en/of chemotherapie conform het sereus ovariumcarcinoom. De slecht gedifferentieerde, graad 3-EEC worden echter ook als type II-tumor behandeld vanwege hun agressievere gedrag. Het USPC vertoont zowel klinisch als histopathologisch sterke overeenkomsten met het sereuze ovarium- en tubacarcinoom. Door deze overeenkomsten en de anatomische verbondenheid van de organen, is de hypothese gesteld dat deze tumoren oorspronkelijk van 1 type cel afkomstig zijn.⁵

In dit proefschrift worden omgevingsfactoren, genetische en epigenetische veranderingen beschreven in endometrium-, ovarium- en tubacarcinomen. De variaties en overeenkomsten tussen deze tumoren kunnen beter inzicht geven in het ontstaan van deze tumoren. Daarnaast is gekeken naar de mogelijke diagnostische en prognostische waarde van deze kenmerken.

Deel 1: hypoxie

Eén van de kenmerken van tumorgroei is een te snelle deling van cellen, waardoor deze hypoxisch worden. Verschillende eiwitten worden geproduceerd om ervoor te zorgen dat een cel toch kan overleven onder deze lagere zuurstofspanning. 'Hypoxia indu-

cible factor-1' (HIF-1) en eiwitten die door HIF-1 worden aangestuurd, zoals CAIX en Glut-1, vervullen daarin een belangrijke rol. In het eerste deel van dit proefschrift is gekeken naar de rol van HIF-1 α in het ontstaan en de prognose van EEC. Uit eerdere studies is bekend dat hypoxische tumoren slechter reageren op chemo- en radiotherapie.⁶ HIF-1 α -expressie is mogelijk geassocieerd met deze slechtere reactie op therapie en een slechtere prognose. Het selecteren van patiënten met hypoxische tumoren zou klinisch interessant kunnen zijn. Adjuvante therapie kan de prognose van deze patiënten mogelijk verbeteren.

Daarom werd HIF-1 α als potentiële prognostische factor in een groep van 93 EEC bestudeerd, gediagnosticeerd in het Universitair Medisch Centrum Utrecht tussen 1992 en 2005. Immunohistochemisch werden 2 kenmerkende aankleuringspatronen van HIF-1 α gezien: perinecrotisch (hypoxiegeïnduceerd) en diffuus. Zowel de aanwezigheid van necrose als van perinecrotische HIF-1 α -expressie toonden zich onafhankelijke voorspellers van een slechtere prognose.⁷ Adjuvante therapie kan de overlevingskansen van deze patiënten mogelijk verbeteren en HIF-1 α zelf zou hiervoor een interessant therapeutisch doelwit kunnen zijn. Vooralsnog bestaan er geen selectieve HIF-1 α -remmers; de eerste resultaten van niet-selectieve HIF-1 α -remmers in de behandeling van het endometriumcarcinoom laten ondanks ernstige toxische bijwerkingen bemoedigende resultaten zien.⁸ WX G250, een monokonaal CAIX-antilichaam, grijpt aan op een door HIF-1 geactiveerde 'pathway'. Een fase 3-studie met dit antilichaam vindt momenteel bij het niercelcarcinoom plaats. In de toekomst zouden deze en andere 'small molecule inhibitors' van HIF-1 hun weg kunnen vinden naar klinische studies naar endometriumcarcinoom. Aangezien deze remmers echter niet specifiek zijn ontwikkeld om HIF-1 α te remmen, is het onmogelijk om het effect alleen toe te schrijven aan het remmen van HIF-1 α . Meer onderzoek om selectieve HIF-1 α -remmers te identificeren is dus noodzakelijk.

Deel 2: epigenetica

Promotorhypermethylering (verder 'methylering') is een epigenetisch proces dat zowel in normale als in tumorcellen een belangrijke rol speelt. Methylering van CpG-eilanden in promotorregio's van tumorsuppressorgen (TSG) leidt tot inactivatie van deze

Aanwijzingen voor de praktijk

1. De aanwezigheid van necrose en van perinecrotische HIF-1 α -expressie zijn onafhankelijke voorspellers van een slechtere prognose bij endometriïde endometriumcarcinomen.
2. Sereus papillair endometriumcarcinomen dienen als aparte entiteit te worden beschouwd, zowel ten opzichte van het sereus ovarium- en tubacarcinoom, als ten opzichte van het endometriïde endometriumcarcinoom.
3. Promotermethyleringspatronen lijken een veelbelovende diagnostische biomarker voor gynaecologische tumoren.

genen.⁹ Aangezien methylering een gen- en tumortypespecifiek proces is, zou een tumortypespecifiek methyleringspatroon bruikbaar kunnen zijn als diagnostische en prognostische marker.

In het tweede deel van het proefschrift worden studies beschreven naar methyleringspatronen van het endometrium-, ovarium- en tubacarcinoom met behulp van 'methylation-specific multiplex ligationdependent probe amplification' (MS-MLPA).

In EEC kwam significant meer methylering voor dan in UPSC. Daarnaast bleek dat methylering van bepaalde genen, *CDH13*, *MLH1* en *TIMP3*, kenmerkend was voor EEC, terwijl methylering van *CDKN2B* en *TP73* vaker voorkwam bij UPSC.¹⁰ Opmerkelijk was dat het methyleringspatroon van slecht gedifferentieerde (graad 3) tumoren ongeacht de histologische (endometriïde of sereuze) classificatie veel overeenkomsten vertonen. Dit kan erop duiden dat deze slecht gedifferentieerde tumoren deels dezelfde epigenetische veranderingen ondergaan, dan wel dat de histologische differentiatie van deze slecht gedifferentieerde tumoren moeilijk is. Indeling van de tumoren als type I of II, alleen op basis van histologie, is dus mogelijk niet voldoende. Interessant was dat in de studiepopulatie (n=98) methylering van *MLH1* bij EEC-patiënten was geassocieerd met een kortere ziektevrije en gehele overleving. Methylering (patronen) van tumor-suppressorgenen lijkt dus zowel een veelbelovende diagnostische als prognostische biomarker bij endometriumcarcinomen.

De sereuze tumoren van de verschillende organen lieten verschillende methyleringspatronen zien. Methylering van *RASSF1(A)* was typerend voor UPSC. *GSTP1* daarentegen was vaker gemethyleerd in ovarium- en

tubacarcinomen. *IGSF4* was gemethyleerd in enkele tubacarcinomen, maar nooit in endometrium- of ovariumcarcinomen. Op dit moment wordt de behandeling bepaald door het orgaan van tumorherkomst; in een vergevorderd stadium kan het echter zeer moeilijk zijn te bepalen wat het orgaan van origine is. Een tumorspecifiek methyleringspatroon zou kunnen helpen dit onderscheid te maken. In deze studie bleken methylering van *RASSF1A* en *GSTP1* het beste de oorsprong van de tumor te voorspellen. In 87% van de ovarium- en 77% van de endometriumcarcinomen kon de oorsprong goed worden voorspeld aan de hand van deze genen. Op basis van *RASSF1A*-methylering kon onderscheid worden gemaakt tussen tuba- en endometriumcarcinomen. De methyleringspatronen van ovarium- en tubacarcinomen toonden veel overeenkomsten en konden niet op basis van dit profiel van elkaar worden onderscheiden. De UPSC lijken op basis van het methyleringspatroon echter een andere entiteit. Dit zou 1 van de redenen kunnen zijn waarom UPSC slecht(er) reageren op de chemotherapie die ook standaard wordt gegeven in de behandeling van ovariumcarcinomen.

Om deze sereuze gynaecologische tumoren verder te karakteriseren zijn met 'array comparative genomic hybridization' (aCGH) genetische veranderingen bestudeerd. De eerdere conclusie dat UPSC als aparte entiteit moet worden beschouwd, werd hier bevestigd. Ook hier duiden de resultaten erop dat het sereus endometriumcarcinoom zich onderscheidt van ovarium- en tubacarcinoom. Van de 63 bestudeerde karakteristieke DNA-markerregio's voor ovarium-/tubacarcinoom liet er slechts 1 (19p13.2) ook herhaaldelijk een kopie aantal toename zien in UPSC.¹¹

Klinische betekenis en toekomst-muziek

De identificatie van diagnostische en prognostische markers is een belangrijke stap in de richting van de geïndividualiseerde kankerbehandeling. Met name promotermethylering lijkt een veelbelovende biomarker in gynaecologische tumoren. Recente technieken voor 'high-throughput' genoombrede DNA-methyleringsanalyses kunnen bijdragen aan het optimaliseren van het diagnostische/prognostische biomarkerprofiel. Validatie van deze profielen bij een onafhankelijke patiëntengroep is een volgende noodzakelijke stap voor implementatie in klinische onderzoeken.

Referenties

1. www.ikcnet.nl.
2. Lax SF, Kurman RJ. A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analyses. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1997;81:228-32.
3. Goff BA. Uterine papillary serous carcinoma: what have we learned over the past quarter century? *Gynecol Oncol* 2005;98:341-3.
4. Nout RA, Smit VT, Putter H, Jürgenliemk-Schulz IM, Jobsen JJ, Lutgens LC, et al. PORTEC vaginal brachytherapy versus pelvic external beam radiotherapy for patients with endometrial cancer of high-intermediate risk (PORTEC-2): an open-label, non-inferiority, randomised trial. *Lancet* 2010;375:816-23.
5. Piek JM, Kenemans P, Zweemer RP, Van Diest PJ, Verheijen RH. Ovarian carcinogenesis, an alternative theory. *Gynecol Oncol* 2007;107:355.
6. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 2001;18:243-59.
7. Seeber LM, Horree N, Van der Groep P, Van der Wall E, Verheijen RH, Van Diest P. Necrosis related HIF-1-alpha expression predicts prognosis in patients with endometrioid endometrial cancer. *BMC Cancer* 2010; 10:307.
8. Miller DS, Blessing JA, Lentz SS, Waggoner SE. A phase II trial of topotecan in patients with advanced, persistent, or recurrent endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol* 2002;87:247-51.
9. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000;16:168-74.
10. Seeber LM, Zweemer RP, Marchionni L, Massuger LF, Smits VT, Van Baal M, et al. Methylation profiles of endometrioid and serous endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer* 2010;17:663-73.
11. Nowee ME, Snijders AM, Rockx DA, De Wit RM, Kosma VM, Hamalainen K, et al. DNA profiling of primary serous ovarian and fallopian tube carcinomas with array comparative genomic hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Pathol* 2007; 213:46-55.

Ontvangen 7 juni 2011, geaccepteerd 5 september 2011.