



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Somatic POLE exonuclease domain mutations in endometrial cancer : Insights into the biology of POLE-mutant tumors

Gool, I.C. van

Citation

Gool, I. C. van. (2018, June 14). *Somatic POLE exonuclease domain mutations in endometrial cancer : Insights into the biology of POLE-mutant tumors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/62813>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/62813>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/62813> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Gool, I.C. van

Title: Somatic POLE exonuclease domain mutations in endometrial cancer : Insights into the biology of POLE-mutant tumors

Issue Date: 2018-06-14



Appendices

Nederlandse samenvatting

Author affiliations

List of publications

Curriculum vitae

Dankwoord

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Baarmoederkanker, oftewel endometriumcarcinoom, is een kwaadaardige aandoening van het slijmvlies dat de baarmoeder aan de binnenzijde bekleedt. Het is de meest voorkomende gynaecologische kanker, waarvan de incidentie door toenemende obesitas en vergrijzing van de bevolking stijgt. Chirurgische verwijdering van de baarmoeder vormt de basis van de behandeling. De indicatie voor aanvullende behandeling wordt gesteld op basis van de recidiefkans. Deze kans wordt bepaald met behulp van klinische en pathologische risicofactoren, namelijk de leeftijd van de patiënt, het FIGO-stadium waarin het endometriumcarcinoom zich presenteert, het histologisch tumortype, de mate van differentiatie (uitrijping) van de tumor, aangeduid als tumor graad, de diepte van ingroei in de baarmoederwand, en de aanwezigheid van tumorcellen in bloed- en/of lymfevaten. Voor endometriumcarcinoom patiënten met een laag risico op recidief is de chirurgische behandeling afdoende. Vrouwen met een endometriumcarcinoom met een intermediaire of hoge recidiefkans kunnen adjuvant behandeld worden met radiotherapie (vaginale brachytherapie of uitwendige radiotherapie) en/of chemotherapie. Deze risico-inschatting is echter niet perfect. Er blijft dan ook sprake van overbehandeling bij een deel van de patiënten met een relatief goede prognose, waarbij adjuvante behandeling niet nodig was geweest. Anderzijds is er ook onderbehandeling van patiënten waarbij het endometriumcarcinoom een agressiever klinisch beloop heeft dan op basis van de huidige risicofactoren was voorspeld. Recent is meer bekend geworden over de moleculair genetische basis van het endometriumcarcinoom en zijn vier subgroepen geïdentificeerd met verschillende moleculaire eigenschappen en prognoses. Om het klinische probleem van over- en onderbehandeling te verminderen zijn deze moleculaire veranderingen geïntegreerd in de risicobepaling, waardoor de recidiefkans van een patiënte met endometriumcarcinoom nauwkeuriger kan worden ingeschat. Eén van deze moleculaire veranderingen betreft mutaties in het exonuclease domein van DNA polymerase epsilon (ϵ).

Polymerase ϵ is een DNA-polymerase dat een belangrijke rol speelt bij de verdubbeling van het DNA voorafgaand aan celdeling. Naast de betrokkenheid bij de DNA replicatie kent polymerase ϵ ook exonuclease activiteit. Met dit exonuclease kan polymerase ϵ na het inbouwen van nieuwe nucleotiden de nieuwe DNA sequentie controleren op fouten en, indien aanwezig, ook de verkeerde nucleotide(n) verwijderen. Deze exonuclease activiteit, ook wel polymerase proofreading genoemd, levert dus een belangrijke bijdrage aan de nauwkeurigheid van de DNA replicatie en daarmee aan de integriteit van het erfelijk materiaal in de cel. De exonuclease activiteit van polymerase ϵ is gecodeerd in een apart domein in het *POLE* gen. In dit domein kunnen erfelijke en somatische (niet-erfelijke, spontane) mutaties optreden. Personen met erfelijke *POLE* exonuclease

domein mutaties (hierna aangeduid als '*POLE* mutaties') hebben, afhankelijk van de variant, aanleg voor het ontwikkelen van colorectaal carcinoom (darmkanker). Heterozygote, somatische *POLE* mutaties zijn in allerlei soorten kanker gevonden, waaronder in endometriumcarcinomen (frequentie 7-12%), maar ook in colorectaalcarcinomen (1-2%) en sporadisch in tumoren van o.a. de borst, long, hersenen, huid en alveesklier. Deze *POLE*-mutante tumoren komen vaak voor in relatief jonge patiënten. Ze vormen een aparte moleculaire subgroep die zich onder andere kenmerkt door een zogenoemd ultragemuteerd fenotype: het betreft een kanker met een uitzonderlijk hoog aantal mutaties. *POLE*-mutante tumoren kennen daarnaast een specifiek mutatiespectrum dat zich onderscheidt door een sterke toename in C→A en C→T nucleotide veranderingen in bepaalde DNA sequenties. Ondanks het hoge aantal mutaties voorspelt de aanwezigheid van een *POLE* mutatie een gunstig klinisch beloop voor de patiënt: dit is tot nu toe aangetoond in endometrium- en colorectaal carcinomen en is gesuggereerd voor glioblastomen, een agressieve vorm van hersenkanker.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richt zich op somatische *POLE* exonuclease domein mutaties in het endometriumcarcinoom. Het doel hierbij is om meer inzicht te krijgen in deze mutaties, in het bijzonder in de onderliggende mechanismen waardoor *POLE* mutaties bijdragen aan de gunstige prognose voor de patiënt.

Een overzicht van de literatuur over *POLE* exonuclease activiteit, de gevolgen van *POLE* mutaties voor maligniteiten en de kenmerken van *POLE*-mutante tumoren – zoals hierboven in het kort beschreven – is uiteengezet in **Hoofdstuk 2**.

Bij de behandeling van het endometriumcarcinoom kunnen *POLE* mutaties gebruikt worden om de indicaties voor adjuvante therapie te verfijnen. Om deze mutaties te detecteren is echter een techniek nodig die niet in elk ziekenhuis beschikbaar is, en bovendien is deze techniek relatief duur. In **Hoofdstuk 3** zijn daarom de histopathologische en immunohistochemische kenmerken van *POLE*-mutante endometriumcarcinomen gedetailleerd in kaart gebracht. Het doel hierbij was om kenmerken van deze tumoren te identificeren die aangeven dat de kans groot is dat een *POLE* mutatie aanwezig is. Op deze manier zou de specialistische techniek om *POLE* mutaties te detecteren gerichter kunnen worden ingezet. In totaal werden 133 endometriumcarcinomen, waarvan 51 een *POLE* mutatie droegen, geblindeerd beoordeeld op de aanwezigheid van zestien morfologische kenmerken. *POLE*-mutante endometriumcarcinomen bleken zich te kenmerken door de aanwezigheid van een prominent immuuninfiltraat. Daarnaast bevatte een derde van de *POLE*-mutante tumoren tumorreuscellen (opvallend grote cellen met bizar-uitziende, grote, en soms verscheidene kernen). Het histologisch type van alle *POLE*-mutante endometriumcarcinomen was endometrioïd adenocarcinoom, waarbij

kenmerken van het sereus-type endometriumcarcinoom even vaak (focaal) aanwezig waren in *POLE*-mutante als in *POLE*-wildtype endometrioïde tumoren. Immunohistochemisch onderzoek toonde bij het grootste deel van de *POLE*-mutante endometriumcarcinomen p53-wildtype expressie; negatieve of focale aankleuring van p16; en normale expressie van de mismatch repair eiwitten. Door een combinatie van deze eenvoudig te scoren kenmerken steeg de kans dat een *POLE* mutatie aanwezig was van 7% naar 33%. Gezamenlijk kunnen deze histopathologische en immunohistochemische karakteristieken dus bijdragen aan het vooraf selecteren van endometriumcarcinomen waarbij het bepalen van *POLE* mutaties nuttig is. Dit faciliteert de implementatie van *POLE* mutatie screening in de klinische praktijk.

Om de gunstige prognose van patiënten met *POLE*-mutante maligniteiten te verklaren, zijn twee hypothesen onderzocht die beschreven worden in de Hoofdstukken 4, 5 en 6. Deze hypothesen betreffen de mogelijkheid van een toegenomen anti-tumor immuunreactie tegen *POLE*-mutante tumoren, en de mogelijkheid van verhoogde gevoeligheid van deze tumoren voor de aanvullende behandeling met radiotherapie of chemotherapie.

De anti-tumor immuunreactie in *POLE*-mutante tumoren is allereerst onderzocht in een cohort van 150 endometriumcarcinomen, waaronder 47 met een *POLE* mutatie (**Hoofdstuk 4**). Met behulp van immunohistochemie was in *POLE*-mutante endometriumcarcinomen, in vergelijking met *POLE*-wildtype tumoren, een sterke toename in het aantal cytotoxische tumor-infiltrerende T-cellen te zien. Deze bevinding is in de endometriumcarcinoomserie van The Cancer Genome Atlas (TCGA, n=244) gevalideerd en verder uitgewerkt. Ook in het TCGA cohort waren er bij analyse van RNA-sequentie data aanwijzingen voor een toegenomen cytotoxische T-cel reactie in *POLE*-mutante endometriumcarcinomen. Deze T-cel reactie toonde tekenen van differentiatie en activatie, maar ook van uitputting, passend bij chronische blootstelling aan antigenen (eiwitfragmenten die door (tumor)cellen aan het immuunsysteem worden gepresenteerd). Bij verdere analyse bleek tevens dat *POLE*-mutante carcinomen meer neoantigenen (antigenen ontstaan als gevolg van tumorspecifieke DNA mutaties) presenteren dan endometriumcarcinomen zonder *POLE* mutaties. *POLE*-mutante endometriumcarcinomen kenmerken zich dus door een sterke intratumorale T-cel reactie die geassocieerd is met, en veroorzaakt kan worden door, een toename in neoantigenen. Deze toegenomen anti-tumor immuunreactie kan (deels) een verklaring bieden voor de gunstige prognose van *POLE*-mutante endometriumcarcinomen.

De bevinding van een versterkte immuunreactie in *POLE*-mutante tumoren is bevestigd in een serie van 116 endometriumcarcinomen met een hoog risico op recidief (**Hoofd-**

stuk 5). In dit cohort waren alle moleculaire subgroepen van het endometriumcarcinoom vertegenwoordigd, namelijk tumoren met een *POLE* mutatie, met microsatelliet instabiliteit ('hypermuteerd'), met p53-mutante expressie en tumoren zonder specifiek moleculair profiel. Zowel *POLE*-mutante als microsatelliet-instabiele endometriumcarcinomen waren sterk geïnfiltrerd door CD8⁺ cytotoxische T-cellen. Ook in een deel van de endometriumcarcinomen met p53-mutante expressie en in sommige tumoren zonder specifiek moleculair profiel bleek een aanzienlijk CD8⁺-immuuninfiltraat aanwezig. In deze studie is ook met immunohistochemie gekeken naar de expressie van immuun checkpoint receptor PD-1 en diens ligand PD-L1, welke na binding de immuunreactie juist kunnen onderdrukken: PD-1⁺ en PD-L1⁺ immuuncellen waren in hoge mate aanwezig in *POLE*-mutante en microsatelliet-instabiele tumoren. De toegenomen anti-tumor immuunreactie, met daarbij ook hoge expressie van PD-1 en PD-L1, suggereert dat *POLE*-mutante en microsatelliet-instabiele endometriumcarcinomen goede kandidaten zijn voor behandeling met immuun checkpoint blokkerende middelen.

Uit diverse studies is gebleken dat *POLE* mutaties bij endometriumcarcinomen en colorectaal carcinomen een gunstig klinisch beloop voor de patiënt voorspellen. Het merendeel van de patiënten in deze studies werd echter aanvullend behandeld. In **Hoofdstuk 6** is daarom onderzocht of de goede prognose van *POLE*-mutante tumoren afhangt van de aanvullende behandeling. Dit is allereerst bekeken in de gerandomiseerde PORTEC-1 studie, welke uitkomsten van patiënten met endometriumcarcinoom vergeleek na uitwendige radiotherapie en na observatie. Ook in de observatie arm hadden patiënten met *POLE*-mutante endometriumcarcinomen significant minder recidieven dan patiënten met *POLE*-wild-type tumoren. Ter ondersteuning van deze klinische data, is de gevoeligheid voor radiotherapie en chemotherapie ook onderzocht in *POLE*-mutante muis embryonale stamcellen. Uit dit modelsysteem bleek dat *POLE*-mutante cellen niet gevoeliger waren dan *POLE*-wild-type cellen voor radiotherapie en ook niet voor verschillende chemotherapieën, waaronder cisplatin, paclitaxel en 5-fluorouracil. Deze resultaten suggereren dat de goede prognose van *POLE*-mutante tumoren niet verklaard kan worden door toegenomen gevoeligheid voor aanvullende behandeling. Dit biedt steun aan vervolgstudies waarin onderzocht zal worden of patiënten met (vroeg stadium) *POLE*-mutante tumoren voldoende behandeld zijn met alleen chirurgie. Dit kan leiden tot vermindering van overbehandeling en voor patiënten kan dit de kans op nadelige bijwerkingen verminderen.

Maligniteiten met *POLE* mutaties staan bekend om hun ultragemuteerde fenotype, hun specifieke mutatie spectrum, hun opvallend aanwezige immuuninfiltraat en een uitstekende prognose voor de patiënt. Het is onbekend in hoeverre deze kenmerken samenhangen met het moment waarop *POLE* mutaties optreden tijdens het ontstaan van

de tumor. **Hoofdstuk 7** beschrijft dat *POLE* mutaties al aanwezig zijn in (niet-maligne) voorloperlaesies van het endometrium- en colorectaalcarcinoom. Uit genoom- of exoomsequencing bleek bovendien dat bijna alle mutaties in *POLE*-mutante tumoren het karakteristieke *POLE* mutatie spectrum volgen. Dit was ook het geval voor mutaties in genen waarvan gedacht wordt dat ze betrokken zijn bij het ontstaan van de tumor. Daarbij bleek dat ook *POLE*-mutante precursorlaesies geassocieerd waren met een toegenomen CD8⁺ immuunreactie, wat een vroeg ontstaan van het ultragemuteerde fenotype suggereert. Daarnaast was er in *POLE*-mutante carcinomen een substantieel hoger aantal clonale immunogene mutaties aanwezig. Deze resultaten duiden erop dat *POLE* mutaties vroege, en mogelijk initiërende, gebeurtenissen zijn in sporadische (niet-erfelijke, verworven) tumoren. Als gevolg hiervan zal genominstabiliteit ook vroeg optreden: dit kan een verklaring zijn voor de uitzonderlijke immuunreactie en de goede prognose van deze tumoren, maar ook voor het voorkomen van *POLE*-mutante tumoren op relatief jonge leeftijd.

De belangrijkste bevindingen uit de vorige hoofdstukken worden in **Hoofdstuk 8** in perspectief van de bestaande literatuur geplaatst. Daarnaast worden in dit hoofdstuk de openstaande vragen met betrekking tot *POLE* mutaties besproken, de mogelijke implicaties voor de behandeling van het endometriumcarcinoom en de mogelijkheden tot implementatie van *POLE* mutatie screening. Naast de in dit proefschrift onderzochte hypothesen om de gunstige uitkomst van tumoren met *POLE* mutaties te verklaren, zou ook de mogelijkheid van 'error catastrophe', oftewel het optreden van dusdanig veel mutaties dat dit verdere tumorgroei negatief beïnvloedt, nader bestudeerd kunnen worden. Voor patiënten met *POLE*-mutante maligniteiten in een vroeg stadium is het belangrijk dat vervolgstudies zullen uitwijzen of aanvullende behandeling hen bespaard kan blijven zonder dat hun recidiefkans stijgt. Voor de zeldzame patiënten met *POLE*-mutante tumoren in een gevorderd stadium en voor patiënten met *POLE* mutaties in agressieve tumoren als glioblastomen zijn juist specifieke, doelgerichte therapieën gewenst. Immuun checkpoint blokkers en mogelijk ook nucleoside analogen zijn kandidaten voor een dergelijke doelgerichte behandeling van *POLE*-mutante tumoren. Detectie van *POLE* mutaties in de klinische praktijk zou kunnen plaatsvinden met behulp van genpanels waarbij, bij voorkeur, ook het aantal mutaties in een tumor en diens spectrum bepaald worden. Toekomstige studies zullen moeten uitwijzen of deze methode in de klinische praktijk haalbaar en kosteneffectief is.

Samenvattend kunnen somatische *POLE* exonuclease domein mutaties, gezien hun implicaties voor de prognose en zeer waarschijnlijk ook voor de behandeling van de patiënt, een belangrijke stap vormen naar een meer geïndividualiseerde behandeling van het endometriumcarcinoom. Aangezien de bevindingen tot nu toe ook van toepassing

lijken op andere tumortypen, zou deze stap richting meer 'therapie op maat' niet alleen voor het endometriumcarcinoom kunnen gelden, maar ook voor colorectaal carcinoom en diverse andere maligniteiten.