



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Clinical proteomics in oncology : a passionate dance between science and clinic

Noo, M.E. de

Citation

Noo, M. E. de. (2007, October 9). *Clinical proteomics in oncology : a passionate dance between science and clinic*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12371>

Version: Corrected Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12371>

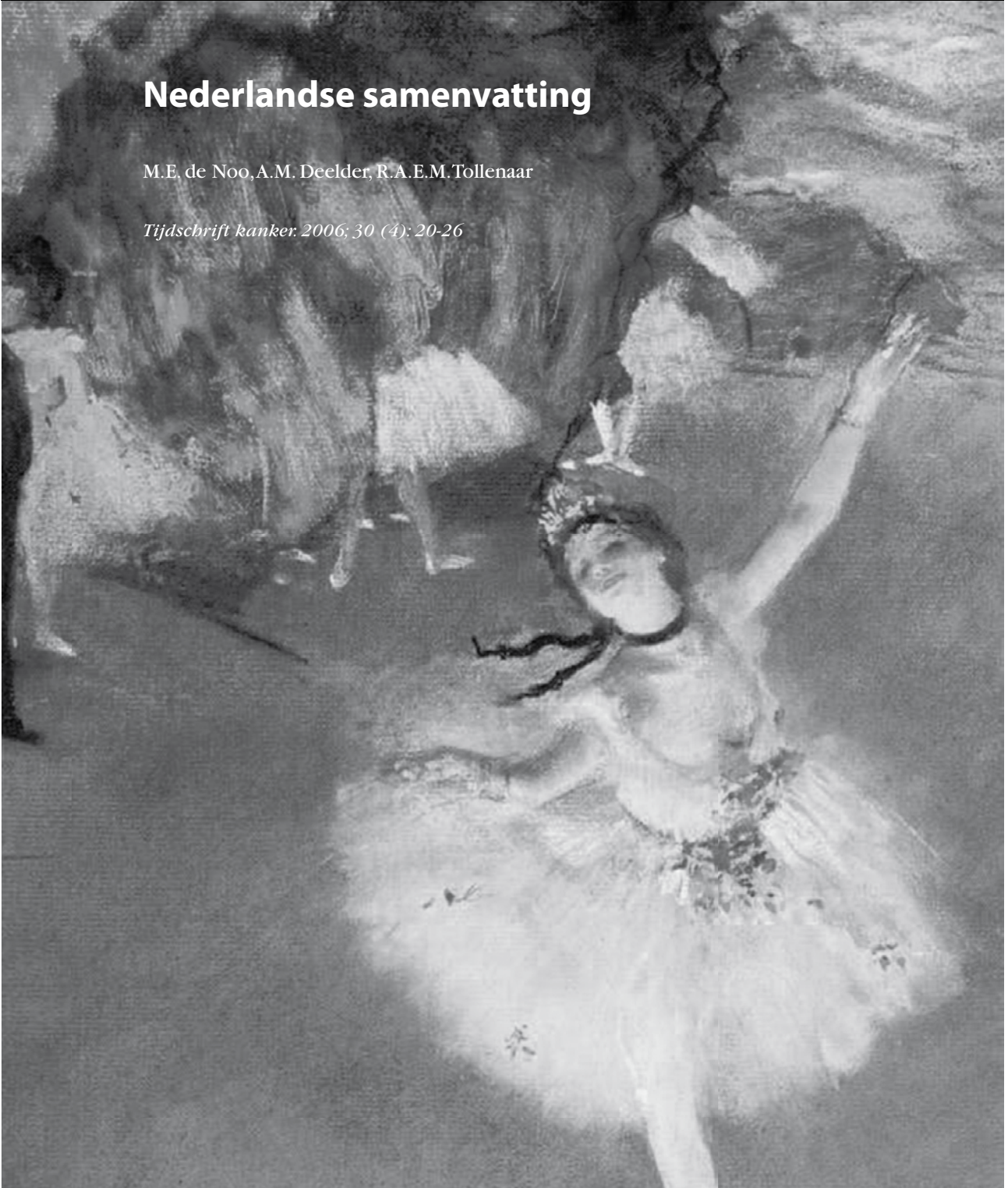
Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Chapter 9

Nederlandse samenvatting

M.E. de Noo, A.M. Deelder, R.A.E.M. Tollenaar

Tijdschrift kanker. 2006; 30 (4): 20-26



Kanker van de dikke darm is een van de meest voorkomende vormen van kanker in de westerse wereld. In Nederland worden er jaarlijks circa 10.000 nieuwe patiënten gedocumenteerd, terwijl er wereldwijd bijna 900.000 nieuwe gevallen per jaar worden gemeld. Over het algemeen geldt dat hoe eerder de diagnose gesteld wordt, hoe groter de kans dat een curatieve resectie mogelijk is en dus de kans op een betere overleving. Helaas wordt kanker van de dikke darm vaak pas in een laat stadium gediagnosticeerd en behandeld, met als gevolg een relatief slechte prognose. Daarom bestaat er een dringende behoefte aan een weinig invasief, specifiek onderzoek dat de diagnose reeds in een vroeg ziektestadium stelt, waardoor de behandeling eerder gestart en tevens beter op het individu toegespitst kan worden.

De gouden standaard voor de diagnostiek van primaire colorectale tumoren is de colonoscopie. Afgezien van het invasieve karakter en de voor patiënten onprettige darmvoorbereiding zijn ook de kosten en tijd een beperkende factor om deze methode grootschalig te gebruiken in bijvoorbeeld een bevolkingsonderzoek. Naast de colonoscopie wordt tot op heden de concentratie van het eiwit CarcinoEmbryonic Antigen (CEA) in het bloed gebruikt als diagnostische marker voor de aanwezigheid van colorectale tumoren, vooral tijdens de follow-up. Echter als diagnostische test voor het detecteren van primaire darmtumoren heeft CEA een lage sensitiviteit van 44% en specificiteit van 88%. Door deze matige betrouwbaarheid is de techniek niet geschikt voor vroegdiagnostiek toepassing op grote schaal, laat staan voor screeningsdoelstellingen. Daarentegen is na resectie van de primaire tumor het verloop van de CEA spiegel wel een betrouwbare indicator voor de ziektestatus. Een relatief nieuwe screeningstechniek voor dikke darmkanker is de Fecale Occulte Bloed Test (FOBT), een test die spoorjes bloed aantoonst in de ontlasting. Het is een non-invasieve techniek die de noodzaak voor follow-up colonoscopie limiteert. Een nadeel is echter dat tumoren die intermitterend bloeden, aan detectie door FOBT kunnen ontsnappen. Bovendien is de specificiteit van de test beperkt doordat er frequent foutpositieve uitslagen optreden als gevolg van dieet (rauw vlees), medicatie en andere oorzaken van gastro-intestinale bloeding dan darmkanker.

Recapitulerend is er momenteel geen gebruiksvriendelijke diagnostische test met voldoende hoge sensitiviteit en specificiteit om de ziekte in een vroeg stadium op te sporen. Nochtans is er grote behoefte aan gevoelige technieken om tumormarkers te identificeren, waarmee detectie van zowel primaire tumoren als recidiverende ziekte of metastasen in een vroeg stadium mogelijk wordt. Hierdoor kan er eerder tot behandeling van tumor(recidief) of metastasen worden overgegaan, wat tot een betere overleving zal leiden.

In **hoofdstuk 1** wordt een introductie gegeven over een nieuwe en gevoelige techniek, proteomics genaamd; een zich snel ontwikkelend onderzoeksveld dat ten doel heeft om zowel kwalitatief als kwantitatief alle functionele eiwitten van een

organisme in kaart te brengen. Na het afronden van het humane genoomproject is het mogelijk geworden om een groot aantal van deze eiwitten te identificeren. Proteomics is gebaseerd op de separatie en visualisatie van complexe eiwitmengsels. Zo kunnen eiwitten die een veranderd expressiepatroon vertonen, worden opgespoord en in verband worden gebracht met de aanwezigheid van een tumor. Deze discriminerende eiwitprofielen kunnen als diagnostische of prognostische test gebruikt worden, of zelfs targets vormen voor nieuwe behandelingsstrategieën. De meeste clinical proteomics studies binnen de oncologie richten zich op het detecteren van verschillen in eiwitexpressie in serummonsters tussen gezonde proefpersonen en patiënten met een maligniteit. Deze techniek werd in 2002 voor het eerst toegepast bij de detectie van ovariumcarcinoom. Deze studie was, afgezien van de veelbelovende resultaten voor de opsporing van een solide tumor, erg vernieuwend door het gebruik van patroonherkenning van meerdere eiwitten zonder dat deze geïdentificeerd waren, een zogenaamde black box methode. Deze aanpak kreeg al snel navolging en ook de resultaten van detectie van prostaat en longkanker waren zeer veelbelovend in volgende studies.

De eiwitprofielen worden gemeten met behulp van massaspectrometrie, een veelzijdige techniek die gebruikt kan worden voor identificatie, kwantificeren en profilering van isotopen, moleculen en molecuulcomplexen in kleine hoeveelheden van chemische en biologische mengsels. In een massaspectrometer worden individuele eiwitten van het serummonster in de gasfase geïoniseerd. Daarna worden de gevormde ionen versneld in een zeer precies geregeld elektrisch veld en in een vluchtbuis afgeschoten. De ionen worden vervolgens gescheiden op basis van hun massa/ ladingverhouding (m/z) waarna de detectie volgt. Na de detectie wordt een massaspectrum gegenereerd als grafiek, waarin de intensiteit (Y-as) van iedere m/z (X-as) wordt weergegeven.

Na initiële positieve reacties op de veelbelovende resultaten van het gebruik van eiwitprofielen als patroonherkenning voor de aanwezigheid van een tumor, kwam er in de internationale literatuur kritiek op de reproduceerbaarheid en betrouwbaarheid van de massaspectrometrie. De vraag was of de classificatieresultaten, die op basis van de eiwitprofielen een individu aan de kanker of gezonde groep toeweest, vertroebeld zouden worden door andere factoren. Verschil in experimentele omstandigheden en individuele variaties werden aangewezen als potentiële co-factoren op eiwitprofielen. Indien de eiwitprofielen inderdaad zo gevoelig zouden zijn voor variaties in bloedafname, opslag, voorbereiding van het serum en het massaspectrometrie experiment, dan zou de eventuele klinische toepasbaarheid voor de toekomst drastisch afnemen.

Hoofdstuk 2 is een overzicht van de verschillende vormen van translationeel onderzoek die onze onderzoeksgroep verricht naar colorectale tumoren en kan als inleiding van het proteomics onderzoek gelezen worden.

Om te verifiëren of de eiwitprofielen inderdaad onderhevig zijn aan variatie door externe factoren onderzochten wij in **hoofdstuk 3** van dit proefschrift de reproduceerbaarheid van onze methode en de invloed van verschillende logistieke preanalytische variaties de serum eiwitprofielen. Om zoveel mogelijk de reële klinische situatie na te bootsen, werden er experimenten gedaan met verschil in tijd tussen afdraaien van de bloedbuis tot serum, verschil in afname tijdstip over de dag en het uitvoeren van meerdere vries -en dooicycli met een serummonster. Uit de resultaten van deze experimenten bleek dat de tijd dat het bloed staat voordat het serum wordt gecentrifugeerd de grootste variatie op serum eiwitprofielen heeft. Er was een te verwaarlozen invloed van het afnametijdstip op de dag en ook het aantal vries -en dooicycli, mits kleiner dan 4, had weinig invloed op de variatie van de massaspectra. Een ander belangrijk aspect voor de praktische bruikbaarheid van een toekomstige serumtest voor de detectie van colorectale tumoren, is de invloed van maaltijden op de eiwitprofielen. Als klein onderdeel van de experimenten naar de invloed van preanalytische variatie vergeleken wij tevens eiwitprofielen van een individu in nuchtere toestand en na maaltijden. Hierin was echter geen verschil te vinden en daarmee werd geconcludeerd dat dit geen invloed heeft op de serum eiwitprofielen. De gehele studie was één van de eerste studies die de reproduceerbaarheid van de eigen methodiek onderzocht en op basis van deze resultaten een gestandaardiseerde aanpak voor alle verdere studies aanbeval. Het belang van het gebruik van een uniforme en goed gedocumenteerde populatie en een gestandaardiseerd afname protocol voor de serummonsters werd in alle studies onderstreept. Mits aan deze voorwaarden wordt voldaan, kan met behulp van discriminerende eiwitprofielen betrouwbare classificatie resultaten geboekt worden in het kankeronderzoek.

In **hoofdstuk 4 en 5** wordt ingegaan op de resultaten die met behulp van dezelfde aanpak verkregen zijn om op basis van discriminerende serum eiwitprofielen onderscheid te maken tussen patiënten met dikke darmkanker en gezonde controles. Hierbij voldeed elk geselecteerd serummonster aan het in hoofdstuk 3 opgestelde standaardprotocol. Naast de variatie in biologische en preanalytische factoren, is de statistische analyse een ander belangrijk onderwerp van discussie in de internationale literatuur. De eiwitspectra vormen hoogdimensionale data en brengen hierdoor direct enkele praktische bezwaren met zich mee. Gezien het hoge aantal datapunten per spectrum is voor een betrouwbare analyse een groot aantal monsters nodig. Daarnaast is het voor de opzet van de studie van belang dat de verschillende groepen binnen een experiment in dezelfde proporties aanwezig zijn. Echter de belangrijkste valkuil in de statistische analyse van de serum eiwitprofielen is de validatie. Hiervoor

is het gebruik van een aparte training en validatie set in een klinische studie van groot belang. Het classificatiemodel wordt berekend in een zogeheten trainingstest door te zoeken naar discriminerende eiwitprofielen die het beste een verschil maken tussen de gezonde en de zieke groep. Vervolgens wordt in een validatie set met onafhankelijke patiënten en gezonde controles het classificatiemodel getoetst en de sensitiviteit en specificiteit van dit model berekend. Dit classificatiemodel is een eiwitprofiel waarvan de identiteit van de discriminerende eiwitten (pieken) onbekend is. Als aanvulling op deze black box benadering kan met behulp van dezelfde massaspectrometer worden overgegaan op identificatie van de discriminerende eiwitten. Er is nog veel onderzoek noodzakelijk alvorens er consensus bereikt kan worden over de optimale statistische en bioinformatica benadering van de hoogdimensionale data binnen de clinical proteomics studies.

Tot op heden is er slechts een summier aantal klinische studies verschenen die met clinical proteomics een maligniteit betrouwbaar hebben opgespoord. Het grootste manco tot op heden is dat de resultaten niet in een ander laboratorium bevestigd kunnen worden, maar ook dat de validatie van het eigen classificatiemodel vaak te wensen over laat. Om dit en bovengenoemde valkuilen te vermijden heeft onze groep een zeer strikt opgezette classificatie studie uitgevoerd voor de detectie van colorectale tumoren. **Hoofdstuk 4** beschrijft de resultaten van het onderzoek naar de detectie van colorectale tumoren op basis van discriminerende eiwitprofielen. Hiertoe werden 66 patiënten met alle ziekte stadia, inclusief stadium IV patiënten met tot de lever beperkte metastasen, en 50 anonieme gezonde controles geïncludeerd. De monsters werden vervolgens gerandomiseerd, maar in gelijke proporties per groep over 3 platen verdeeld en op 3 achtereenvolgende dagen met de massaspectrometer gemeten. Dit leverde een zogeheten 'randomised block design' op, waarmee wij geprobeerd hebben om de classificatieresultaten zo min mogelijk te beïnvloeden met experimentele of batcheffecten. Voor de statistische analyse hebben wij lineaire discriminatie gebruikt om een optimale scheiding te krijgen tussen beide groepen. In verband met het relatieve kleine aantal monsters dat voldeed aan het standaard inclusie en afname protocol, was het gebruik van een onafhankelijke validatieset niet mogelijk in deze studie. Daarom hebben wij gebruik gemaakt van een methode die maximaal betrouwbare resultaten oplevert binnen de mogelijkheden van een interne validatie. Met deze zogeheten dubbele kruisvalidatie van de eiwitprofielen toonden de resultaten een sensitiviteit van 95% en een specificiteit van 90% voor het de detectie van colorectale tumoren. De oppervlakte onder de ROC-curve voor deze test bedroeg 97% en toont hiermee de significantie van het onderscheidend vermogen van de test aan. Het gebruik van dubbele kruisvalidatie binnen de dataset en de grote oppervlakte onder de ROC-curve tonen aan dat het classificatiemodel

op daadwerkelijke informatie in de spectra en niet op toeval berust. De statistische achtergronden hiervan worden in **hoofdstuk 5** beschreven.

Dezelfde studie opzet, massaspectrometrie en statistische analyse is gebruikt in **hoofdstuk 6**, waar eiwitprofielen van patiënten met mammacarcinomen werden vergeleken met die van gezonde controles met dezelfde gemiddelde leeftijd. Ook deze studie toonde veelbelovende resultaten voor de detectie van mammacarcinomen, met een sensitiviteit van 100% en een specificiteit van 97%. De discriminerende eiwitpieken werden andermaal in de laag moleculaire massa range gevonden, maar in andere correlaties dan bij de studie beschreven in hoofdstuk 3. Belangrijk echter was wederom de optimaal mogelijke betrouwbare classificatie en het uitsluiten van zoveel mogelijk verstorende factoren. Identificatie van deze pieken was ten tijde van het onderzoek nog niet volledig mogelijk, maar dit zal binnen afzienbare tijd wel gerealiseerd worden.

In **hoofdstuk 7** wordt het bewijs geleverd dat discriminerende eiwitprofielen ook in een onafhankelijke validatieset op zeer betrouwbare wijze gebruikt kunnen worden voor de detectie van borstkanker. Het is de eerste proteomics studie die in een gerandomiseerde en onafhankelijke patiëntengroep (in een validatieset) deze veelbelovende resultaten laat zien.

In **hoofdstuk 8** wordt een overzicht gegeven over de stand van zaken van clinical proteomics binnen de oncologie en worden de toekomstige bevindingen en verwachtingen binnen het veld besproken. Hoewel clinical proteomics pas in de kinderschoenen verkeert, lijkt deze methode te kunnen bijdragen aan de urgente zoektocht naar nieuwe biomarkers binnen de oncologie. De eerste kinderziektes, de reproduceerbaarheid en preanalytische variaties, lijken overwonnen en maken betrouwbare classificatiestudies mogelijk mits er volgens strikte standaardprotocollen met een homogene groep patiënten en sera gewerkt wordt. De samenstelling van de populatie blijft veel aandacht vragen om een maximale uniformiteit te waarborgen en zoveel mogelijk externe co-factoren te vermijden. Er is nog veel werk te verrichten aan de statistische benadering van klinische studies op basis van proteomics. Een ander punt van aandacht is de identiteit van de discriminerende eiwitten. De identiteit van de eiwitten zou kunnen leiden tot een beter begrip van pathomechanisme van het ontstaan van colorectale tumoren, maar ook targets voor nieuwe behandelingen kunnen vormen. Er zijn hypothesen dat deze discriminerende eiwitten niet specifiek voor de tumor zelf zijn, maar veelal acute fase eiwitten en afkomstig uit de complement- of stollingscascade. Momenteel wordt dit door meerdere groepen onderzocht. Dit is immers ook essentieel voor het bepalen van de specificiteit van de eiwitprofielen per verschillend type solide tumor. Hoewel er in de eerste jaren al veelbelovende resultaten zijn geboekt met vroegdetectie van kanker met behulp van clinical proteomics, is er nog een lange weg te gaan voordat introductie in de kliniek

plaats kan vinden. Dit proefschrift is echter een kleine stap in de juiste richting en onderstreept de vele hoopvolle mogelijkheden van translationeel onderzoek.