



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Molecular pathology of mismatch repair deficient tumours with emphasis on immune escape mechanisms

Dierssen, J.W.F.

Citation

Dierssen, J. W. F. (2010, November 17). *Molecular pathology of mismatch repair deficient tumours with emphasis on immune escape mechanisms.*

Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16151>

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/1887/16151>

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

Samenvatting



Samenvatting

MOLECULAIRE PATHOLOGIE VAN TUMOREN MET DEFECTEN IN HET DNA-MISMATCH-REPAIR SYSTEEM. EEN NADRUK OP IMMUNOMODULATIE MECHANISMEN

Dit proefschrift gaat over dikkedarmkanker. Het komt in de westerse wereld (en dus ook in Nederland) veel voor. Maar wat is het nu eigenlijk?

De dikke darm is een groot orgaan in de buik en bestaat uit meerdere delen die elk hun eigen anatomische naam hebben. De dikke darm begint daar waar de dunne darm ophoudt en heet dan achtereenvolgens coecum (met de blinde darm), colon ascendens (van rechtsonder naar rechtsboven), colon transversum (dwars van rechts naar links), colon descendens (van linksboven naar onder), sigmoïd en tot slot endeldarm (rectum). Dan is de opening van de anus bereikt. Het is eigenlijk verbazingwekkend dat kwaadaardige gezwellen in al deze verschillende gebieden lange tijd op een hoop werden gegooid. Maar door onderzoek met nieuwe, moleculaire technieken weten we dat dit niet terecht is en dat er wel degelijk verschillende subtypen onderscheiden kunnen worden.

Kanker is een gezwel (tumor) van woekerende cellen. Cellen die alsmat doorgroeien. Het ontstaat in eigen cellen en begint met de ontsparing van één enkele cel. Er is heel wat ontsparing nodig voordat de nakomelingen van deze cel zich tot een kwaadaardig gezwel kunnen ontwikkelen. Tegenwoordig zijn al een groot aantal moleculaire – en celbiologische veranderingen die deze ontwikkeling mogelijk maken in kaart gebracht. Hoe en wanneer deze veranderingen optreden verschilt voor de vele soorten van kanker. Als drijvende factor speelt hetzelfde mechanisme een rol als in Darwiniaanse

evolutie, 'survival of the fittest', maar dan op micro niveau. De meest competitieve kankercellen overleven en geven hun eigenschappen door aan dochtercellen via veranderingen in het genetisch materiaal, het DNA. Ook wordt daarbij de gevreesde eigenschap verkregen van groei in het onliggende weefsel dat voor uitzaaiingen kan zorgen.

Hoe komt het dat het lichaam daar niets tegen doet? Het menselijk lichaam kan reageren door het afweersysteem (het immuunsysteem) erop af te sturen. Dat is nog niet zo gemakkelijk. Kankercellen verschillen namelijk maar nauwelijks van gezonde cellen. En dus kan het immuunsysteem ze moeilijk herkennen. Toch zijn er genoeg aanwijzingen dat het in principe wel mogelijk is. Alleen hebben sommige kwaadaardige tumoren weer manieren ontwikkeld om dat te omzeilen. Dat laatste noemen we immuunmodulatie.

In dit proefschrift bespreken wij een manier van immuunmodulatie in dikkedarmtumoren. We bestudeerden veranderingen in bepaalde moleculen die nodig zijn om immuuncellen (leukocyten, witte bloedlichaampjes) in staat te stellen de kankercellen überhaupt te herkennen. Dat zijn de zogenaamde klasse-1-humane-leukocytenantigeen-moleculen (HLA). Deze eiwitten zijn ook betrokken bij afstotingsreacties na transplantatie. Ook hebben we gepoogd om de binnen de groep van darmtumoren verschillende subtypen te onderscheiden op moleculair niveau om zo iets meer te kunnen zeggen over de processen die betrokken zijn bij

immuunmodulatie. En om ze beter te kunnen voorspellen.

In het inleidende **hoofdstuk 1** wordt een globaal overzicht gegeven van de huidige inzichten in ontwikkeling van (dikkedarm)kanker die relevant zijn voor ons onderzoek. In het bijzonder wordt aandacht besteed aan de fasen in het proces waardoor normale cellen zich ontwikkelen tot kankercellen en de veranderingen in het DNA die hierbij een rol spelen. De twee bekendste routes voor het ontstaan van dikkedarmkanker worden besproken, nl. die voor CIN- en MIN-tumoren. Hoewel deze oorspronkelijk geïdentificeerd werden in twee verschillende erfelijke vormen van dikkedarmkanker blijken ook veel niet-erfelijke tumoren via één van deze routes te ontstaan. CIN, voor chromosomale instabiliteit, hangt samen met een verstoorde functie van het APC-eiwit. Geërfde veranderingen (mutaties) in dit gen veroorzaken familiale adenomateuze polyposis (FAP) dat wordt gekenmerkt door de ontwikkeling van honderden tot duizenden darpoliepen met een hoog risico op kanker. MIN, dat staat voor microsatelliet instabiliteit, wordt veroorzaakt door defecten in de moleculen die betrokken zijn bij de reparatie van bepaalde DNA-beschadigingen. Mutaties in deze zogeheten 'mismatch-repair'-genen blijken erfelijk te worden overgedragen bij patiënten met het syndroom van Lynch. Deze mensen hebben een verhoogd risico op de ontwikkeling van dikkedarmkanker, maar ook op andere soorten kanker waaronder die van het baarmoederslijmvlies.

Vervolgens wordt de wisselwerking tussen tumorcellen en het immuunsysteem besproken. Een vereenvoudigd model laat de benodigde processen zien die uiteindelijk leiden tot een gerichte aanval van gespecialiseerde witte bloedcellen, de cytotoxische T-cellen, tegen tumorcellen. Het hoofdstuk wordt afgesloten

met een beschrijving van de mogelijkheden waarmee tumorcellen deze aanval kunnen pareren (immuunmodulatie). In het bijzonder is er aandacht voor de manier waarop de samenstelling van HLA-moleculen kan worden veranderd.

Het eerste deel van ons onderzoek (**hoofdstuk 2**) had tot doel een methode te ontwikkelen waarmee op een efficiënte en betrouwbare manier MIN-tumoren kunnen worden onderscheiden. Daartoe werden twee verschillende technieken, nl. microsatelliet-instabiliteitsanalyse (MSI) en immunohistochemie getest op een serie baarmoederslijmvlies tumoren en dikkedarmtumoren van patiënten met het syndroom van Lynch. Bij MSI-analyse wordt de instabiliteit van bepaalde DNA-sequenties (microsatellieten) onderzocht. Deze microsatellieten veranderen van lengte, ze raken 'instabiel', wanneer in tumorcellen het DNA-mismatch-repairmechanisme niet goed meer werkt. Immunohistochemie maakt het mogelijk om de aanwezigheid van specifieke eiwitten in cellen en weefsels aan te tonen. Daarvoor zijn antistoffen gericht tegen deze eiwitten nodig. Door de antistoffen te koppelen aan een kleurstof kunnen de eiwitten gelokaliseerd worden. Wij gebruikten antistoffen die tegen drie van de mismatch-repair-eiwitten gericht waren. Door dunne plakjes tumorweefsel (weefselcouples) hiermee te behandelen konden we door microscopisch onderzoek nagaan of die eiwitten verdwenen waren in de tumorcellen. Het bleek inderdaad mogelijk om betrouwbaar mismatch-repair-defecten op te sporen en bovendien het gendefect dat hiervoor verantwoordelijk is te voorspellen.

Vervolgens onderzochten we of we deze methode ook konden toepassen op dikkedarmtumoren van patiënten met het syndroom van Lynch (**hoofdstuk 3**). Dat bleek inderdaad het

geval. Bovendien testten we de toepassing van immunohistochemie op een zogenaamde 'tissue micro array', een verzameling van pijpjes weefsel van veel verschillende patiënten samengebracht in één blokje. Daarmee is het mogelijk om in een keer heel veel (in dit geval 129) darmtumoren tegelijk te onderzoeken. De informatie uit de pijpjes bleek voldoende om de tumoren met mismatch-repair-defecten te onderscheiden.

Nu konden we overgaan tot het onderzoek van mechanismen van immuunmodulatie (**hoofdstuk 4**). Allereerst ontdekten we een veelvoorkomende mutatie van het *IFNGR1*-gen in erfelijke MIN-tumoren. In 59 procent van deze tumoren werd deze mutatie gevonden. Het gen codeert voor de receptor van interferon-gamma (IFN- γ). IFN- γ is een signaalstof die door T-cellen wordt gebruikt ter voorbereiding op de aanval op tumorcellen. Het zorgt ervoor dat tumorcellen meer HLA aanmaken (waardoor ze beter herkenbaar zijn voor het immuunsysteem) en het maakt tumorcellen gevoeliger voor de aanval zelf. We hebben onderzocht of de mutaties hier tegen beschermden. Dit deden we door gekweekte cellen van CIN-tumoren en van MIN-tumoren met *IFNGR1*-gen-mutaties bloot te stellen aan IFN- γ . De CIN- en MIN-tumorcellen bleken in gelijke mate een toename van HLA moleculen te vertonen. Ook waren de MIN-tumorcellen niet meer of minder gevoelig voor één van de door cytotoxische T-cellen gebruikte aanvalsmethoden. Kortom, de veelvoorkomende mutatie in het *IFNGR1*-gen speelt waarschijnlijk geen rol bij immuunmodulatie.

We besloten om de expressie van HLA-klasse-I-moleculen meer gedetailleerd te onderzoeken voor de verschillende typen dikke darmtumoren (**hoofdstuk 5**). HLA-klasse-I bestaat namelijk uit een hele familie van eiwitten en dat maakt het

behoorlijk ingewikkeld. Ten eerste is elk HLA-molecuul opgebouwd uit twee ketens, een lichte en een zware. De lichte keten is bij alle HLA-klasse-I moleculen hetzelfde maar de zware HLA-klasse-I-ketens worden verdeeld in 6 typen (loci, HLA-A tot en met G). Daarbij zijn er echter per locus zeer veel variaties (polymorfismen), met name van HLA-A (meer dan 120) en HLA-B (meer dan 250). Ieder mens heeft twee versies van elk locus, zogeheten allelen, want we krijgen er een van onze moeder en een van onze vader. Meestal zijn dit twee verschillende polymorfismen. Die variatie is van belang want dit bepaalt het 'repertoire' van eiwitfragmenten dat aan de T-cellen gepresenteerd kan worden. Deze variatie is dus ook van groot evolutionair belang om allerlei (virale) infectie-ziekten het hoofd te kunnen bieden door geïnfecteerde cellen zo snel mogelijk te herkennen en op te ruimen. De zeer vele combinaties van HLA-moleculen vormen dus een essentieel onderdeel van onze afweer tegen virale infectieziekten. Om de expressie van de verschillende typen HLA-moleculen in tumorcellen te onderzoeken hebben we gebruik gemaakt van vier-kleuren-multiparameter-flowcytometrie. Met behulp van deze gevoelige techniek kan de hoeveelheid van de verschillende HLA-moleculen in individuele cellen gemeten worden. In korte tijd worden duizenden cellen geanalyseerd, waardoor een representatief beeld van de tumorcelpopulaties wordt verkregen. De cellen worden losgemaakt uit stukjes tumorweefsel en vervolgens worden in verschillende stappen de HLA-moleculen aangekleurd. Omdat in tumoren naast tumorcellen ook verschillende soorten normale cellen voorkomen, gebruikten we drie kleuren om tumorcellen te onderscheiden en een vierde kleur om de hoeveelheid HLA-moleculen op het celoppervlak te meten. De kleurstoffen werden gekoppeld aan specifieke antilichamen die gericht waren tegen de verschillende soorten HLA-moleculen.

Omdat we afzonderlijk de expressie van HLA-A-moleculen en HLA-B-moleculen onderzochten hadden we vanwege de grote variabiliteit een aanzienlijke verscheidenheid aan antilichamen nodig.

Allereerst zagen we dat veranderingen in HLA bij 38 procent van de dikkedarmtumoren voorkomen. Ten tweede ontdekten we dat deze veranderingen zich beperkten tot slechts twee patronen (in tegenstelling tot de op voorhand berekende grote variatie aan mogelijkheden): of tumoren schakelden één allel uit, of alle vier tegelijk. In de laatste groep was trouwens niet al het HLA verdwenen. Tot slot bleek dat de HLA-veranderingen voorkwamen in twee subtypes tumoren: in MIN tumoren en in tumoren uit het proximale deel van de dikke darm (caecum, colon ascendens en het eerste stuk van de colon transversum).

We vergeleken de met flow-cytometrie verkregen resultaten met die verkregen met immunohistochemie, want die laatste techniek is beter toepasbaar op grote series van tumoren en ook op gearhiveerd tumorweefsel. Het leerde ons dat immunohistochemie in dit geval veel minder betrouwbaar is. Wel konden we er één van de patronen van HLA-afwijkingen mee onderscheiden, nl. het patroon dat wij in MIN-tumoren zagen.

Het grote aantal afwijkingen in MIN-tumoren suggereert dat deze tumoren meer onder druk staan van aanvallen van het immuunsysteem. Dat laatste is ook al eerder beschreven. Zo worden er meer T-cellen in die tumoren gezien. Bovendien zou het heel goed kunnen samenhangen met het feit dat deze tumoren zoveel afwijkende eiwitten produceren (zonder dat ze, zoals we in hoofdstuk 4 lieten zien, bijdragen aan de ontwikkeling van de tumor). Wellicht werkt dat dan toch in hun nadeel. Om te kijken of deze hypothese juist was besloten we na te

gaan of er een verschil is tussen spontane-MIN-darmtumoren en erfelijke-MIN-darmtumoren. Dit wordt beschreven in **hoofdstuk 6**. We onderzochten daarvoor een grote groep tumoren. Deels tumoren uit het proximale deel van de dikke darm, waaronder spontane MIN tumoren en deels tumoren van patiënten met het syndroom van Lynch. Ditmaal onderzochten we niet alleen de patronen van HLA-veranderingen, maar zochten we ook naar de mechanismen die deze veranderingen veroorzaakten. We zochten naar mutaties in het DNA. Daarbij richtten we ons niet alleen op de HLA-allelen zelf, maar ook op de lichte keten, het $\beta 2$ -microglobuline (B2M) en op de kandidaten betrokken bij het bewerken van antigenen. Die laatste worden tezamen aangeduid als 'antigen processing machinery' (APM). Het is een hele batterij van eiwitten die betrokken is bij de opbouw van HLA-moleculen en in het bijzonder het verwerken van stukjes eiwit, antigenen, die op HLA-moleculen worden geladen en door deze op het celoppervlak worden 'gepresenteerd' aan patrouillerende T-cellen. Deze antigenen zijn essentieel, want zij bepalen of T-cellen de presenterende cel aanvallen of niet. HLA-moleculen die niet beladen zijn met antigenen hebben geen functie en worden zelfs niet meer naar het celoppervlak toegebracht.

We vonden mutaties in *B2M*, in *HLA-A* en in de APM-leden *TAP1*, *TAP2*, *tapasine*, *calnexine*, *calreticuline* en *ERP1*. Ook zagen we soms dat het hele gebied op chromosoom 6 (6p21.3) dat codeert voor de verschillende HLA-allelen weg was. Dit wordt 'loss of heterozygosity' (LOH) genoemd. Nog interessanter was dat het mutatiespectrum verschillen toonde tussen de verschillende typen tumoren. In Lynchtumoren vonden we met name *B2M*-mutaties, terwijl in spontane MIN-tumoren mutaties in HLA-allelen of in één van de APM-leden de overhand hadden. Verder zagen we in CIN-tumoren LOH van 6p21.3.

Wat de reden is van die verschillen in afwijkingen in HLA is nog onduidelijk. In ieder geval vertelt het ons dat er bij de ontwikkeling van dikkedarmtumoren, vooral die uit het eerste, proximale deel, een grote selectiedruk is om het immuunsysteem te ontduiken. Daar wordt in **hoofdstuk 7** nog een korte beschouwing aan gewijd. Recente literatuur komt ter sprake die laat zien dat Lynchtumoren inderdaad een hoop verschillende antigenen kunnen presenteren die voor T-cellen het signaal kunnen geven om de tumorcel te doden. De resultaten uit dit proefschrift tonen dat een preventieve of therapeutische rol van tumorvaccins bij dikkedarmkanker verder moeten worden onderzocht.

Kort samengevat beschrijft dit proefschrift methoden om verschillende typen dikkedarmkanker van elkaar te onderscheiden. Daarnaast laat het zien dat deze te onderscheiden typen tumoren ook verschillen vertonen in mechanismen van immuunmodulatie, in het bijzonder in de manier waarop het HLA-systeem wordt uitgeschakeld. Deze bevindingen benadrukken de kennelijke noodzaak van tumoren om het immuunsysteem te ontduiken en dat geeft weer hoop op therapievormen of vormen van preventie die gebruik maken van het immuunsysteem om (beginnende) kankercellen te doden. Tegelijkertijd wijst dit proefschrift op het belang om bij het ontwikkelen van therapievormen rekening te houden met de moleculaire variatie tussen de verschillende vormen van dikkedarmkanker.