

Type onderzoek	Pathologisch onderzoek
Titel /Onderwerp	Genotypering en fenotypering van borstkanker bij de man
Naam onderzoeker(s)	Robert Kornegoor, promotor Prof.dr. P.J. van Diest
Naam institu(u)t(en)	Universiteit van Utrecht
Subsidiegever(s)	Afdeling Pathologie UMC Utrecht, MRC-Holland, Roche Nederland, Hologic BV, Propath, Dako Benelux, Thermo Fisher Scientific, A. Menarini Diagnostics, J.E. Jurriaanse Stichting.
Startdatum onderzoek	2010
Link naar meer informatie	https://dspace.library.uu.nl/bitstream/handle/1874/256263/kornegoor.pdf;sequence=1
Lekensamenvatting van het onderzoek	<p>Borstkanker wordt gezien als een aandoening specifiek voor vrouwen. Toch zijn er jaarlijks ongeveer 100 mannen in Nederland bij wie de diagnose borstkanker wordt gesteld en dit aantal neemt toe. Omdat borstkanker bij mannen een relatief zeldzame diagnose is, waardoor het lastig is om (voldoende) grote groepen te verzamelen, is er nauwelijks gefundeerd onderzoek verricht naar deze aandoening. Behandelingsprincipes van borstkanker bij mannen worden, bij gebrek aan kennis, overgenomen van behandelingsprincipes bij vrouwen. Het is echter al langer bekend dat er belangrijke verschillen zijn tussen borstkanker bij mannen en vrouwen.</p> <p>De mannelijke borst is een rudimentair / niet functioneel orgaan en is opgebouwd uit vet, steunweefsel en verspreid spaarzame klierbuizen, zonder dat er lobjes (klierweefsel) worden gevormd. Borstkanker bij mannen is in het overgrote deel (en vaker dan borstkanker bij vrouwen) hormoongevoelig, doordat er een groot aantal hormoonreceptoren op deze tumorcellen aanwezig zijn. Dit komt doordat er, net als bij vrouwen na de overgang, slechts een geringe hoeveelheid in het bloed circulerende oestrogenen (belangrijk hormoon) aanwezig is. De oestrogenen worden voornamelijk lokaal in het borstweefsel geproduceerd en hebben een direct effect op de omliggende cellen. Het effect van deze lokaal geproduceerde oestrogenen is krachtig en waarschijnlijk verantwoordelijk voor het hoge aantal oestrogeen en progesteronreceptor positieve tumoren bij mannen en vrouwen na de overgang. Verder zijn mannelijke borstkanker patiënten gemiddeld ouder dan vrouwelijke.</p>

Erfelijke factoren spelen in ca. 15-20% van de gevallen een rol en nader genetisch onderzoek lijkt gewenst indien borstkanker bij een man is gediagnosticeerd. Voornamelijk het BRCA2 gen speelt een prominente rol, terwijl het BRCA1 gen bij mannen minder belangrijk lijkt, in tegenstelling tot borstkanker bij vrouwen. Hiernaast lijken er ook verschillen te bestaan op eiwit niveau en moleculair niveau tussen borstkanker bij mannen en vrouwen. Deze verschillen tussen borstkanker bij mannen en vrouwen onderstrepen het belang om borstkanker bij mannen te beschouwen als een unieke ziekte. Het is dus essentieel om wetenschappelijk onderzoek te verrichten naar borstkanker bij mannen, om zo kennis te vergaren over de ontstaanswijze van deze ziekte en wetenschappelijk gefundeerde therapiekeuzes te kunnen maken. Nu deze klinische relevantie is doorgedrongen, moeten voldoende grote onderzoeksgroepen gevormd worden om betrouwbaar onderzoek te kunnen doen. Samenwerking met verschillende instituten is hiervoor noodzakelijk. Het materiaal van de in dit proefschrift beschreven onderzoekspopulatie is afkomstig uit 4 ziekenhuizen in Nederland (UMC Utrecht, Diaconessenhuis Utrecht, Antonius Ziekenhuis Nieuwegein en het laboratorium Oost Nederland) en tevens uit 2 instituten in Duitsland (Paderborn en Keulen). deze samenwerking hebben we materiaal en patiëntgegevens van 134 mannen met borstkanker kunnen verzamelen, een van de grootste groepen tot nog toe beschreven in de literatuur. Van deze patiënten werden belangrijke tumoreigenschappen geëvalueerd (delingsactiviteit, tumorgraad, tumorgrootte, lymfklier metastase) en er werden overlevingsdata opgevraagd bij het IKNL om uiteindelijk de prognose van deze patiënten te analyseren. Van elke patiënt was een weefselblok beschikbaar, waarmee tissue microarray weefselblokken werden gemaakt. Tissue microarray weefselblokken bevatten van elke tumor 3 kleine biopten (diameter 0.6 mm) genomen uit de oorspronkelijke weefselblokjes. Met deze methode kunnen op een snelle en goedkope manier eiwitexpressie patronen, met behulp van immunohistochemische kleuringen, onderzocht worden van alle 134 tumoren. Tevens werd er DNA geïsoleerd voor moleculair onderzoek.

In **hoofdstuk 2** worden, aan de hand van immunohistochemische kleuringen, de 134 borstkanker tumoren bij mannen ingedeeld in 5 verschillende groepen: (moleculaire subtypes) luminal type A, luminal type B, *HER2* gedreven, basal like en niet classificeerbaar tripel negatief. Deze verschillende groepen hebben specifieke genetische veranderingen en hebben bovendien therapeutisch en

prognostische voorspellende waarde. Het blijkt dat bijna alle borstkanker tumoren bij mannen geclassificeerd dienen te worden als luminal type A (75%) en luminal type B (21%). Er worden slechts 4 tumoren gevonden die tot de basal like tumoren behoren en 1 tumor die niet classificeerbaar tripel negatief is. Er worden geen *Her2* gedreven tumoren aangetroffen. De luminal type B tumoren zijn gecorreleerd met ongunstige tumorkenmerken en vertegenwoordigen de oestrogeenreceptor positieve tumoren met een agressief gedrag. Deze verdeling van moleculaire subtypes is duidelijk anders in vergelijking met vrouwen, waar bijvoorbeeld ca. 17% van de tumoren basal like zijn, hetgeen wijst op fundamentele verschillen in borstkanker bij mannen en vrouwen.

Op zoek naar nieuwe en niet eerder beschreven kenmerken van agressieve tumoren en voorspellers van een ongunstige prognose bij mannelijke borstkankerpatiënten hebben we in **hoofdstuk 3** de rol van fibrotic focus en de expressie van hypoxie (zuurstof gebrek) gerelateerde markers geanalyseerd. Een fibrotic focus is een littekenachtig gebied middenin een tumor bestaande uit bindweefsel en onregelmatige gerangschikte bloedvaten. Een fibrotic focus is omgeven door celrijke tumorgebieden. Wij hebben voor het eerst aangetoond dat de aanwezigheid van een fibrotic focus, net als bij borstkanker bij vrouwen, gecorreleerd is met agressieve borstkanker tumoren bij mannen. Indien een fibrotic focus groter is dan 8mm hebben mannelijke borstkanker patiënten een significant slechtere prognose. Hypoxie is waarschijnlijk de verbindende factor tussen fibrotic focus en agressieve tumoren. Er bestaan verschillende hypoxie gerelateerde markers, die bij borstkanker bij vrouwen gerelateerd zijn aan een slechte prognose. Wij beschrijven in hoofdstuk 3 onder andere de rol van Hif-1a (één van de hypoxie gerelateerde markers) in borstkanker bij mannen. Overexpressie van Hif-1a is gecorreleerd met agressieve tumoren, de aanwezigheid van een fibrotic focus en een slechte prognose. Hif-1a heeft additionele prognostische waarde aan de in de dagelijkse praktijk gebruikte tumorkenmerken.

Om het eiwit expressieprofiel van borstkanker bij mannen te onderzoeken hebben we 14 veel gebruikte immunohistochemische markers getest op alle 134 tumoren. De resultaten staan beschreven in **hoofdstuk 4**. Tumoren met overexpressie van ki67, HER2, p21, p53 en tumoren negatief voor progesteronreceptor en bcl-2 tonen agressieve/ongunstige tumorkenmerken. Bovendien kunnen de markers p53 en progesteronreceptor gebruikt worden als prognostische markers, aangezien patiënten

met tumoren waarin p53 overexpressie en patiënten met tumoren negatief voor progesteronreceptor een significant slechtere prognose hebben, bovenop de in de dagelijkse praktijk gebruikte tumorkenmerken. Door al deze markers met een rekenkundig model (unsupervised hierarchical clustering) te combineren kunnen 4 groepen worden onderscheiden. Deze clusters hebben unieke tumorkenmerken en ook significante verschillen in overleving. Met deze methode kunnen borstkanker tumoren bij mannen ingedeeld worden in klinisch en prognostisch relevante groepen.

In hoofdstuk 5 en 6 wordt op DNA niveau onderzoek gedaan naar borstkanker bij mannen. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de techniek multiplex probe-ligation amplification (MLPA) waarmee in één run tientallen genen tegelijk kunnen worden geanalyseerd.

In **hoofdstuk 5** wordt de rol van genkopie toename in 25 borstkanker gerelateerde (onco) genen onderzocht. Toename van kopieën van bepaalde (onco)genen spelen een belangrijke rol in het ontstaan van kanker. Indien de toename van het aantal genkopieën hoog is (>10 kopieën) spreekt men van amplificatie. Toename van kopieën in de genen *CCND1*, *TRAF4* en *CDC6* en de genen op chromosoom 8 (voornamelijk *MTDH*) wordt aangetroffen in >40% van de tumoren, waarbij vaak sprake is van amplificatie. Deze genen spelen waarschijnlijk een belangrijke rol in het ontstaan en / of progressie van borstkanker bij mannen. Toename van kopieën in verschillende genen is gecorreleerd met agressievere tumoren, maar alleen amplificatie van *CCND1* is een onafhankelijke prognostische factor. De resultaten hebben we ook vergeleken met 73 borstkanker tumoren van vrouwen met een vergelijkbaar eiwitexpressie profiel, die onderzocht zijn met behulp van dezelfde methode. Er zijn een aantal duidelijke verschillen zichtbaar in de toename van aantal kopieën van de verschillende genen. Genkopie toename van *EGFR* en *CCND1* wordt significant vaker gezien in borstkanker bij mannen en toename van aantal kopieën van de genen *EMSY* and *CPD* wordt vaker aangetroffen bij vrouwen. Ook gen amplificatie van verschillende genen wordt vaker gezien in borstkanker bij vrouwen. Deze resultaten duiden op moleculaire verschillen tussen mannen en vrouwen met borstkanker.

Naast genetische afwijkingen spelen ook epigenetische veranderingen een belangrijke rol in het ontstaan en progressie van kanker. Met epigenetische veranderingen worden veranderingen in genfunctie bedoeld zonder dat hier

structurele afwijkingen aan het genetisch materiaal aan ten grondslag ligt. Promoter hypermethylering geldt als een van de belangrijkste epigenetische veranderingen en kan resulteren in het stilleggen van een gen. De functie van dit gen gaat dan verloren en indien dit een tumorsuppressorgen betreft kunnen cellen kwaadaardig ontaarden (tumorsuppressorgen remmen de groei en ontwikkeling van tumoren).

De rol van promoter hypermethylering in borstkanker bij mannen werd voor het eerst door ons onderzocht en de resultaten staan beschreven in **hoofdstuk 6**. Promoter hypermethylering in de genen *MSH6*, *WT1*, *PAX5*, *CDH13*, *GATA5* and *PAX6* wordt gezien in >50% van de gevallen, terwijl dit niet of nauwelijks wordt aangetroffen in het genetisch materiaal van normaal borstweefsel van de man. Promoter hypermethylering van deze genen speelt dus waarschijnlijk een belangrijke rol in het ontstaan en / of progressie van borstkanker bij mannen. Promoter hypermethylering in de genen *ESR1* en *GTSP1* wordt vaker gezien in tumoren met agressieve kenmerken, er wordt echter geen relatie met overleving gevonden. Patiënten met tumoren waarin meerdere gemethyleerde genen en een gemiddeld hoge methylering status hebben vaak agressievere tumoren en een slechtere prognose. De resultaten werden ook vergeleken met 33 borstkankertumoren van vrouwen die onderzocht zijn met dezelfde methode. Hierbij komt naar voren dat de meest voorkomende genen met promoter hypermethylering van vrouwen en mannen met borstkanker identiek zijn. Echter er zijn ook vele genen die vaker promoter hypermethylering tonen in borstkanker tumoren bij vrouwen in vergelijking met tumoren bij mannen. Dus ondanks overeenkomsten zijn er ook op epigenetisch niveau duidelijke verschillen tussen tumoren van mannen en vrouwen met borstkanker.

De rol van gynaecomastie (borstvorming bij mannen) in het ontstaan van borstkanker bij mannen staat nog steeds ter discussie. **Hoofdstuk 7** beschrijft een morfologische en immunohistochemische studie van gynaecomastie. In deze studie beschrijven we de 3 lagen van de klierbuizen in gynaecomastie. Rondom de klierbuizen bevindt zich, net als rond alle goedaardige klierbuizen in de borst bij de man en de vrouw, een myoepitheliale cellaag. Voorts werden 2 luminale (aan de binnenzijde van de klierbuis) cellagen aangetroffen, waarvan de binnenste nog niet eerder in deze setting in de literatuur beschreven is. Deze 2 luminale lagen zijn met behulp van immunohistochemische kleuringen makkelijk te herkennen, aangezien de intermediaire luminale laag positief is voor hormoonreceptor kleuringen, maar negatief voor cytokeratine 5 en 14, terwijl de

binnenste luminale cellaag negatief is voor de hormoonreceptor kleuringen en positief voor cytokeratine 5 en 14. Het feit dat gynaecomastie ontstaat uit deze 2 celcompartimenten pleit ervoor, analoog aan intraductale hyperplasie bij vrouwen waarin ook 2 celcompartimenten aanwezig zijn, dat gynaecomastie geen voorloper laesie is van borstkanker bij mannen.

Samenvattend, het huidige promotieonderzoek geeft inzicht in de factoren die een rol spelen bij het ontstaan en de progressie van borstkanker bij mannen. Deze determinanten worden beschreven op histologisch niveau, eiwit niveau, genetisch en epigenetisch niveau. Voorts worden meerdere biomarkers beschreven die van prognostische waarde zijn en waarvan sommigen een rol kunnen spelen in de (toekomstige) behandeling. Dit promotieonderzoek levert bewijs dat er belangrijke verschillen zijn tussen borstkanker bij mannen en vrouwen, hetgeen het belang van het doen van onderzoek in grote groepen mannelijke borstkanker patiënten benadrukt. Bovendien hebben we voor het eerst beschreven dat de klierbuizen in gynaecomastie bekleed zijn met 3 cellagen. Deze gelaagdheid pleit, analoog aan intraductale hyperplasie bij vrouwen, voor het feit dat gynaecomastie geen voorloper laesie is van borstkanker bij mannen.