

Chapter 8

Summary

This thesis describes two applications of gene expression profiling in understanding breast cancer biology and behavior: First, the use of gene expression in the clinical setting to identify signatures that predict response to specific chemotherapy regimens. Second, the use of expression profiling to identify global changes between different subgroups of breast tumors and by this to potentially elucidate pathways that are involved in tumor development, progression or sensitivity to treatment.

Chapter 1 provides a brief general background on breast cancer and an outline for this thesis. Furthermore, this chapter gives a short overview on what microarrays are and how analysis of gene expression data can be performed. Unsupervised and supervised classification are the main methods to analyze the enormous amount of data that are generated by gene expression profiling. Based on gene expression profiles, breast carcinomas can be subdivided in distinct subgroups and mechanisms underlying the differences in clinical behavior of tumors can be studied more specifically.

Chapter 2 contains a review on the literature of predictive markers for the response to specific chemotherapy regimens. Many markers have been suggested to predict sensitivity of a tumor to specific chemotherapeutic agents, but thus far, none of them has been implemented in clinical routine. A number of prognostic markers have been described for breast cancer, such as estrogen receptor (ER) expression, HER2 amplification and overexpression, or Ki-67 expression. Some of these prognostic markers have also been shown to provide predictive information for response to chemotherapy. Moreover, other markers have been suggested to predict sensitivity to specific chemotherapeutic agents. So far, no single marker has been identified that consistently predicts sensitivity to chemotherapy. Recent research has focussed on the development of multigene predictors by using high-throughput techniques such as quantitative RT-PCR and gene expression profiling by using microarrays.

Chapter 3 describes a single institute clinical trial that was conducted to identify gene

expression patterns that can predict response to neoadjuvant chemotherapy. At present, clinically useful markers predicting response of primary breast carcinomas to specific chemotherapy regimens are lacking. We investigated whether gene expression profiles of the primary tumor could be used to predict treatment response.

Within a single-institute randomized phase II trial, patients with locally advanced breast cancer received six courses of either AC ($n = 24$) or AD ($n = 24$) neoadjuvant chemotherapy. Gene expression profiles were generated from core-needle biopsies obtained before treatment and correlated with the response of the primary tumor to the chemotherapy administered. Additionally, pretreatment gene expression profiles were compared with those in tumors remaining after chemotherapy.

Ten (20%) of 48 patients showed a (near) pathologic complete remission of the primary tumor after treatment. No gene expression pattern correlating with response could be identified for all patients or for the AC or AD groups separately. We could show that the global gene expression of patients with a stable disease stays similar during chemotherapy treatment, whereas the gene expression profile of patients with a partial response changes remarkably during treatment. We conclude that more subtle differences in gene expression are likely to be present but can only be reliably identified by studying a larger group of patients. Response of a breast tumor to neoadjuvant chemotherapy results in alterations in gene expression.

Chapter 4 describes the continuation of this work. Since trastuzumab had become available as targeted treatment for patients with HER2 positive breast carcinomas and the results of the MRI evaluations showed that patients without an early response to treatment will usually not achieve a complete response after three additional courses of the same treatment, this clinical trial was stopped for ethical reasons. A new trial with an adapted study design was started. Different treatment schedules are applied in patients with HER2 positive and HER2 negative tumors, respectively, to ensure optimal treatment with trastuzumab for HER2 positive tumors. Further-

more, in this new study, treatment schedules were adapted so that patients without a good response after three courses of chemotherapy could be switched to an alternative treatment regimen to improve response.

The pre-treatment gene expression profiles of 63 patients were analyzed. In a preliminary analysis, a classifier of 31 genes could be identified that predicted response to any given chemotherapy with an accuracy of 78%. Another classifier consisting of 22 genes predicts response to treatment with adriamycin and cyclophosphamide in 20 patients. Based on the so-called “intrinsic genes”, we identified the molecular subtypes of breast cancer in our data set. Thirteen out of 25 patients with a basal-like tumour (52%) showed a complete remission, whereas for the luminal tumours ($n = 29$) complete remissions were observed in only 7% of the patients. In general, basal-like tumors respond much better to various chemotherapy regimens compared to the other molecular subtypes.

Chapter 5 describes a retrospective analysis of a randomized clinical trial comparing conventional chemotherapy with high dose chemotherapy in high risk breast cancer patients.

Benefit from chemotherapy treatment in breast cancer patients is determined by the molecular make-up of the tumour. In a retrospective analysis of the large Dutch National Study on high dose chemotherapy, we determined the molecular subtypes of breast cancer originally defined by expression microarrays by immunohistochemistry in tumours of patients who took part in a randomised study of adjuvant high-dose chemotherapy in breast cancer. In addition, the topoisomerase II α (TOP2A) amplification status was determined by fluorescence *in situ* hybridisation and chromogenic *in situ* hybridisation. 411 of the 753 tumours (55%) were classified as luminal-like, 137 (18%) as basal-like and 205 (27%) as human epithelial receptor type 2 (HER2) amplified. The basal-like tumours were defined as having no expression of ER and HER2; 98 of them did express epidermal growth factor receptor and/or cytokeratin 5/6. The luminal-like tumours had a significantly better recurrence free and overall survival than the other two groups. From the 194 HER2-positive tumours, 47 (24%) were shown to harbour an amplification of TOP2A. Patients with an HER2-amplified tumour randomised to the high-dose therapy arm did worse than those in the conventional treatment arm, possibly caused by the lower cumulative anthracycline dose in the high-dose arm. The tumours with a TOP2A amplification contributed hardly to this difference, suggesting that TOP2A amplification is not the cause of the steep dose-response curve for anthracyclines in breast cancer. Possibly, the

difference of the cumulative dose of only 25% between the treatment arms was insufficient to yield a survival difference.

Chapter 6 describes gene expression profiling of ductal carcinoma *in situ* (DCIS).

DCIS is characterized by the intraductal proliferation of malignant epithelial cells. Several histological classification systems have been developed, but assessing the histological type/grade of DCIS lesions is still challenging, making treatment decisions based on these features difficult. To obtain insight in the molecular basis of the development of different types of DCIS and its progression to invasive breast cancer, we have studied differences in gene expression between different types of DCIS and between DCIS and invasive breast carcinomas. Gene expression profiling using microarray analysis has been performed on 40 *in situ* and 40 invasive breast cancer cases. DCIS cases were classified as well- ($n = 6$), intermediately ($n = 18$), and poorly ($n = 14$) differentiated type. Of the 40 invasive breast cancer samples, five samples were grade I, 11 samples were grade II, and 24 samples were grade III. Using two-dimensional hierarchical clustering, the basal-like type, ERB-B2 type, and the luminal-type tumours originally described for invasive breast cancer could also be identified in DCIS. Using supervised classification, we identified a gene expression classifier of 35 genes, which differed between DCIS and invasive breast cancer; a classifier of 43 genes could be identified separating between well- and poorly differentiated DCIS samples.

Chapter 7 describes the results of *in vitro* experiments to further elucidate the relationship between genetic alterations and changes in gene expression profiling in breast cancer. Specific genetic alterations in human breast cancer are associated with distinct clinicopathological features. Inactivation of the E-cadherin gene is observed in the majority of lobular carcinomas *in situ* and invasive lobular carcinomas and is only very rarely observed in other tumor types. HER2 gene amplification is observed in 15–25% of all invasive breast cancers and in over 50% of ductal carcinoma *in situ*. It is associated with estrogen receptor negativity and poor histological grade. We investigated global gene expression changes in human breast cancer cell lines after siRNA-mediated knock down of HER2 and E-cadherin expression, respectively. These results were correlated to the gene expression profiles of human primary breast cancer datasets hybridized on the same array platform. We silenced HER2 expression in SK-BR-3 cells and E-cadherin expression in MCF-7 and ZR-75-1 cells. Fifteen genes were significantly regulated after

silencing of E-cadherin expression and this signature was used to cluster 255 human breast tumors (34 lobular and 221 ductal carcinomas). Based on the expression pattern of these 15 genes, invasive lobular cancers and other tumor types could not be separated. After silencing HER2/neu expression, 121 genes were significantly regulated. Again, unsupervised hierarchical clustering using these 121 genes did not result in co-clustering of HER2 positive tumors. Comparing inactivation of E-cadherin or HER2 in human breast cancer cell lines does not very accurately reflect the gene expression patterns

observed in human breast cancer where these same genes are genetically altered.

In conclusion, microarrays provide a powerful tool that enables us to investigate the expression of thousands of genes simultaneously and to describe gene signatures that are correlated with different biological and clinical observations. On the other hand, gene expression profiling has reminded us of the fact that even apparently clear biological pathways are more complex when studied in detail or when results from *in vitro* experiments have to be translated to studies of human tumors.

Hoofdstuk 9

Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft onderzoek naar twee benaderingen om genexpressie profielen te gebruiken om het inzicht in de biologie en het gedrag van kanker te vergroten. De eerste benadering is het bepalen van de genexpressie profielen in tumorbiopten om de gevoeligheid voor specifieke (combinaties van) geneesmiddelen te kunnen voorspellen. De tweede benadering is het bepalen van verschillen in genexpressie tussen diverse tumorsubgroepen om meer kennis te verkrijgen over de genen die betrokken zijn bij signaaltransductie en die verband houden met de ontwikkeling van de tumor, het verloop van de ziekte of de gevoeligheid voor een bepaalde behandeling.

In **hoofdstuk 1** wordt kort algemene achtergrondinformatie gegeven over borstkanker en het overzicht van de hoofdstukken in dit proefschrift. Ook wordt beschreven hoe genexpressiearrays kunnen worden gebruikt en hoe de hiermee verkregen data kunnen worden geanalyseerd. De meest gebruikte methoden om de grote hoeveelheid gegevens te analyseren zijn de niet-gesuperviseerde en de gesuperviseerde classificatie. Met behulp van genexpressieprofielen kunnen mammacarcinomen in subgroepen worden verdeeld en de mechanismes die verantwoordelijk zijn voor het verschil in klinisch gedrag kunnen op deze wijze bestudeerd worden.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht over predictieve markers voor chemotherapiegevoeligheid zoals bekend in de literatuur. Van een aantal markers is gesuggereerd dat ze de gevoeligheid van mammacarcinoom voor specifieke vormen van chemotherapie kunnen voorspellen. Geen hiervan is tot nu toe in de klinische routinediagnostiek opgenomen. Wel zijn er markers bekend die een prognostische waarde hebben voor het mammacarcinoom of die een response op 'targeted therapie' voorspellen. Hiertoe behoren bijvoorbeeld de expressie van de oestrogenreceptor (ER), amplificatie en overexpressie van het HER2-gen/eiwit en de expressie van Ki-67. Sommige van deze prognostische markers zijn ook geassocieerd met de respons op chemotherapie. Ook van andere markers is gesuggereerd dat ze een predictieve waarde hebben voor de respons op chemotherapie. Tot op heden is er echter

geen enkele marker geïdentificeerd die op consistente wijze de respons op chemotherapie kan voorspellen. Recent onderzoek richt zich vooral op het ontwikkelen van predictieve genexpressieprofielen met behulp van high-throughput technieken zoals quantitative RT-PCR of microarrays.

Hoofdstuk 3 beschrijft een klinische trial die is opgezet om genexpressie profielen te identificeren die de gevoeligheid van chemotherapie kunnen voorspellen, uitgevoerd in het Nederlands Kanker Instituut/Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis. Een dergelijke test is van belang omdat er een groot aantal medicijnen beschikbaar is voor de behandeling van borstkanker, maar tevoren niet vaststaat welke daarvan het meest geschikt is voor de individuele tumor. Er is onderzocht of met behulp van microarray analyse op biopten van onbehandelde tumoren de respons op chemotherapie kon worden voorspeld. Binnen het fase II onderzoek werden patiënten met lokaal gevorderd (locally advanced) mammacarcinoom preoperatief (neoadjuvant) behandeld met ófwel 6 cycli adriamycine/cyclofosfamide (AC) óf 6 cycli adriamycine/docetaxel (AD). Genexpressieprofielen werden bepaald uit dikke-naald-biopten die vóór het begin van de behandeling werden verkregen en de gevonden profielen werden gecorreleerd met de reactie van de tumor op de chemotherapie. Bovendien werden de profielen voorafgaand aan de chemotherapie vergeleken met de profielen van het tumormateriaal dat na afloop van de behandeling nog aanwezig was. Tien van de 48 patiënten (20%) vertoonden een (bijna) complete pathologische remissie van de primaire tumor na chemotherapie. In deze kleine serie kon geen genexpressieprofiel worden gevonden dat een respons op de behandeling met AC of AD voorspelde. Van de tumoren die (vrijwel) niet gereageerd hadden op de behandeling kon worden aangetoond dat de genexpressieprofielen van vóór en na behandeling vrijwel onveranderd blijven. De genexpressiepatronen van de tumoren met een gedeeltelijke respons veranderde significant. De conclusie is dat de serie niet groot genoeg was om predictieve verschillen in genexpressie aan te tonen en dat de respons van een mammacar-

cinoom op preoperatieve chemotherapie aanleiding geeft tot aanzienlijke veranderingen in gen-expressie.

In **hoofdstuk 4** wordt het vervolg van het onderzoek uit hoofdstuk 3 beschreven. Trastuzumab (Herceptin®) was inmiddels beschikbaar gekomen als medicijn voor patienten met een HER2-positief mammacarcinoom. Daarnaast was ook gevonden dat bij patienten zonder initiële respons, zoals vastgesteld met behulp van MRI onderzoek, de kans op een pathologische complete remissie na afloop van de chemotherapie zeer klein is. Een op basis van deze bevindingen aangepaste nieuwe trial werd begonnen. De keuze voor de medicamenteuze therapie werd nu gemaakt op grond van de aanwezigheid of afwezigheid van een HER2-amplificatie in de tumor, waarbij patienten met een HER2-positieve tumor een op trastuzumab gebaseerd schema ontvingen. Bovendien werd het MRI-resultaat na de eerste cycli chemotherapie gebruikt om te besluiten of deze vorm van chemotherapie werd voortgezet (in het geval van een goede respons) of vervangen door een niet-kruisresistente vorm van chemotherapie (bij een minder goede respons).

Genexpressieprofielen werden geanalyseerd in 63 biopten van primaire tumoren voorafgaand aan de start van de chemotherapie. Bij de eerste analyse kon een combinatie van 31 genen worden geïdentificeerd die een respons op chemotherapie voorspelt met een betrouwbaarheid van 78%. Een tweede classifier, bestaand uit 22 genen, kan de gevoeligheid voor behandeling met adriamycine/cyclofosfamide voorspellen, zoals blijkt uit een analyse van 20 tumoren. Bovendien kon met behulp van de microarrays het moleculaire subtype van elk van de tumoren worden vastgesteld. Dertien van de 25 patienten (52%) met een 'basaal fenotype' bereikten een complete remissie na afloop van de chemotherapie, terwijl in de groep van 'luminale tumoren' ($n = 29$) slechts in 7% van de gevallen een complete remissie kon worden bereikt. Het is duidelijk dat de tumoren met een basaal fenotype beter reageren op chemotherapie dan luminale tumoren. Dit wordt ook bevestigd door de ervaringen van anderen.

Hoofdstuk 5 beschrijft een retrospectieve analyse van een gecontroleerde klinische studie, waarin conventionele chemotherapie werd vergeleken met hoge dosis chemotherapie bij hoogrisico borstkankerpatienten.

Of een patiente baat heeft bij een bepaalde chemotherapie hangt af van de moleculaire opmaak van een tumor, zoals die oorspronkelijk gedefinieerd is met behulp van genexpressieprofielen. In een retrospectieve analyse van de Nederlandse nationale studie over hoge dosis chemotherapie (de N4+ studie) zijn deze moleculaire

subtypes bepaald met behulp van immunohistochemie. Met behulp van fluorescente *in situ* hybridisatie (FISH) en chromogene *in situ* hybridisatie (CISH) is ook amplificatie van het topoisomerase II α (TOP2A) gen onderzocht. 411 van de 753 tumoren (55%) bleken het lumbinale fenotype te hebben, 137 (18%) het basale fenotype en 205 tumoren (27%) hadden een amplificatie van het HER2-gen. In basale tumoren komt geen expressie van ER of van HER2 voor (zoals aantoonbaar door middel van immunohistochemie). 98 van de basale tumoren brachten wel EGFR en/of cytokeratine 5/6 tot expressie. Patienten met lumbinale tumoren hebben, althans op korte termijn, een significant betere overleving dan de beide andere groepen. Van de 194 HER2-positieve tumoren bleken er 47 (24%) ook een amplificatie van het TOP2A-gen te hebben. Patienten met een HER2-positieve tumor die met hoge dosis chemotherapie zijn behandeld, hebben een slechtere overleving dan de patienten die de standaard behandeling hebben ontvangen. Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat de behandeling in de hoge dosis arm een lagere cumulatieve dosis anthracyclines bevat. De tumoren die naast HER2 ook een amplificatie van het TOP2A-gen bevatten, dragen weinig bij aan dit verschil. Dit suggereert dat amplificatie van het TOP2A-gen niet de basis is voor de steile dosis-respons relatie, die bij de behandeling van borstkanker met anthracyclines wordt gezien. Een verschil van 25% in de cumulatieve dosering tussen de twee behandelingsarmen is kennelijk niet voldoende om een verschil in overleving te veroorzaken.

Hoofdstuk 6 beschrijft de genexpressieprofielen van ductale carcinomen *in situ* (DCIS). DCIS wordt gekenmerkt door de intraductale proliferatie van maligne epitheliale cellen. Er bestaan verschillende classificatie systemen voor DCIS, maar nog steeds is het bepalen van graad en histologisch type van de DCIS laesie moeilijk en dat maakt het nemen van klinische keuzes gebaseerd op deze eigenschappen ingewikkeld. Om het inzicht in de moleculaire basis van de ontwikkeling van verschillende types DCIS en de progressie naar een invasieve tumor te verbeteren, hebben we de verschillen in genexpressie tussen de verschillende DCIS types onderling en de verschillen tussen DCIS en invasieve tumoren bestudeerd. Met behulp van microarrayanalyse zijn de genexpressieprofielen bepaald van 40 DCIS laesies en van 40 invasieve borsttumoren. De DCIS laesies werden onderverdeeld in goed gedifferentieerd ($n = 6$), matig gedifferentieerd ($n = 18$) en slecht gedifferentieerd ($n = 14$). Van de 40 invasieve tumoren werden er 5 als graad I geclassificeerd, 11 als graad II en 24 als graad III. Door het gebruik van tweedimensionale hiërarchische clusteranalyse konden de mole-

culaire subtypes (basaal, HER2 en luminaal) die oorspronkelijk in invasieve tumoren waren gevonden ook in DCIS laesies worden teruggevonden. Met behulp van gesuperviseerde classificatie werd een genexpressieprofiel van 35 genen gevonden dat het verschil tussen DCIS en invasieve borst tumoren goed weergeeft. Een tweede classifier, bestaand uit 43 genen, kan differentiëren tussen goed gedifferentieerde DCIS laesies en matig gedifferentieerde DCIS laesies.

Hoofdstuk 7 beschrijft de resultaten van *in vitro* experimenten die als doel hadden het verband tussen genetische veranderingen op DNA niveau en veranderingen in gen expressie (RNA niveau) nader te onderzoeken. Specifieke genetische veranderingen in mammacarcinoomcellen zijn geassocieerd met specifieke klinisch-pathologische eigenschappen van de tumor. Inactivatie van het E-cadherine gen wordt bij de meeste lobulaire *in situ* carcinomen en bij lobulaire invasieve tumoren aangetroffen maar bijna nooit bij andere soorten borstkanker. Amplificatie van het HER2 gen komt voor bij 15–25% van alle invasieve borst tumoren en bij meer dan 50% van de DCIS laesies. Dit laatste betreft vaak slecht gedifferentieerde tumoren zonder expressie van de oestrogeen receptor. De veranderingen in genexpressie in menselijke borstkankercellijnen zijn onderzocht nadat de expressie van het HER2 gen of het E-cadherine gen zijn uitgeschakeld met de siRNA methode. Deze genexpressieprofielen zijn vergeleken met die van primaire humane tumoren die onderzocht waren met hetzelfde microarray platform. De

HER2-expressie werd uitgeschakeld in SK-BR-3 cellen en de E-cadherine-expressie in MCF-7 en ZR-75-1 cellen. Na het uitschakelen van de E-cadherine expressie waren 15 genen significant gereguleerd en deze genen zijn gebruikt voor een cluster analyse met 255 primaire humane tumoren (34 lobulaire en 221 ductale), wat echter geen scheiding opleverde tussen lobulaire carcinomen en andere tumoren. Na uitschakelen van de HER2-expressie waren 121 genen significant gereguleerd. Ook hier heeft ongesuperviseerde clusteranalyse gebaseerd op deze 121 genen niet tot een gezamenlijke clustering met HER2-positieve primaire borsttumoren geleid. Deze resultaten leiden tot de conclusie dat de inactivatie van E-cadherine of HER2 in menselijke borstkankercellijnen niet precies overeen komen met de genexpressieprofielen van menselijke borsttumoren waarin deze genen door een genetische verandering zijn uitgeschakeld.

Microarrayanalyse is een krachtige methode die het mogelijk maakt om de expressie van duizenden genen gelijktijdig te bestuderen en om genexpressieprofielen te beschrijven die gecorreleerd zijn met uiteenlopende biologische en/of klinische eigenschappen. Anderzijds hebben deze genexpressieprofielen opnieuw geïllustreerd dat zelfs biologisch goed onderzochte signaaltransductiepaden veel ingewikkelder en complexer zijn als ze in meer detail worden bestudeerd of wanneer de resultaten van *in vitro* experimenten naar de klinische situatie moeten worden vertaald.