

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/39789> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Engels, Charla Chábeli

Title: Integrating clinicopathological and molecular data in the breast cancer patient :
towards precision medicine

Issue Date: 2016-05-19



Appendices

Nederlandse Samenvatting

List of Publications

List of Co-authors

Curriculum Vitae

Dankwoord



NEDERLANDSE SAMENVATTING

Borstkanker is de meest voorkomende maligniteit onder vrouwen in de Westerse wereld en is tevens een van de grootste veroorzakers van kankergerelateerde sterfte¹⁻³. De behandeling van borstkanker omvat een multidisciplinaire aanpak, bestaande uit chirurgie, radiotherapie, en systemische therapie zoals chemotherapie, endocriene therapie en immunotherapie.

Ruim een decennium geleden werden de zogeheten '*Hallmarks of Cancer*' gepresenteerd. Hannahan en Weinberg suggereerden dat lichaamscellen zes biologisch verschillende eigenschappen moeten verkrijgen om maligne te ontaarden⁴. Deze veelbesproken eigenschappen zijn: 1. Autonomie voor groeisignalen, 2. Ongevoeligheid voor groei-remmende signalen, 3. Invasieve groei en metastasering, 4. Immortaliteit, 5. Aanhoudende vaatnieuwvorming, en 6. Ongevoeligheid voor geprogrammeerde celdood (apoptose). Recent werden daar twee eigenschappen aan toegevoegd: 7. Reprogrammering van het energiemetabolisme en 8. De mogelijkheid tot ontsnappen aan herkenning door het immuunsysteem⁵.

In de huidige klinische setting wordt de keuze voor type operatie en aanvullende behandeling grotendeels bepaald door de tumorstadiëring en klassieke tumor- en patiëntkarakteristieken. Echter, klassieke prognostische factoren zoals leeftijd, tumorgrootte, lymfeklierstatus, histologische graad, hormoonreceptorstatus en *Human Epidermal growth factor Receptor 2* (HER-2) overexpressie resulteren niet in optimale behandeling van borstkankerpatiënten⁶. Tevens moeten de bijwerkingen van adjuvante systemische therapieën niet onderschat worden. Op basis van deze informatie is het zeer aannemelijk dat de huidige tumorstadiëring kan resulteren in zowel onderbehandeling als overbehandeling van borstkankerpatiënten.

Prognostische factoren informeren omtrent de verwachte klinische uitkomst ten tijde van de diagnose, waarbij eventuele aanvullende behandeling buiten beschouwing wordt gelaten. *Predictieve* factoren doen een uitspraak over de verwachte reactie op een therapeutische modaliteit^{7,8}. Zowel prognostische als predictieve factoren dienen als leidraad voor klinische beslissingen omtrent behandeling van borstkankerpatiënten. Om over- en onderbehandeling zoveel mogelijk te beperken is het van cruciaal belang dat er nieuwe, meer nauwkeurige prognostische en predictieve factoren onderzocht en geïmplementeerd worden in de huidige klinische setting.

Leeftijd is voor het grootste deel van de Westerse vrouwen de grootste risicofactor voor het verkrijgen van borstkanker. Bijna de helft van de borstkankerpatiënten is 65 jaar of ouder ten tijde van de diagnose¹. Verwacht wordt dat deze groep in de komende decennia verder in omvang zal toenemen door de vergrijzing. Oudere borstkankerpatiënten vormen een heterogene populatie met een andere tumorbiologie en metabolisme dan de jongere borstkankerpatiënten. Daarbij is er bij de oudere populatie tevens sprake van

een grote diversiteit aan comorbiditeiten en vitaliteit⁹⁻¹³, hetgeen besluitvorming rond de behandeling van borstkanker in deze patiëntengroep verder bemoeilijkt. Ondanks de hoge incidentie van borstkanker en borstkanker-gerelateerde sterfte in de oudere populatie, is de huidige kennis omtrent de relatie veroudering en oncogenese, en de optimale oncologische behandeling voor de oudere borstkankerpatiënt, nog onvoldoende. De huidige richtlijnen voor de behandeling van borstkanker zijn grotendeels gebaseerd op onderzoek dat verricht is in relatief jonge of fitte oudere patiënten^{14,15}. Dit maakt dat de huidige behandelrichtlijnen van ouderen met borstkanker niet *evidence-based* zijn en dat de uitdaging in deze specifieke borstkankerpopulatie ligt in het voorspellen van wie zal sterven *met* borstkanker en wie zal sterven *door* borstkanker. Op basis van deze informatie kan er een weloverwogen besluit genomen worden over wie er op hogere leeftijd nog baat heeft bij agressieve borstkankerbehandeling.

Het doel van dit proefschrift is vierledig. In **Deel I** wordt de prognostische waarde van de moleculaire differentiatie van de tumor, de immunogeniciteit, en de aanhoudende proliferatieve activiteit en ongevoeligheid voor apoptose onderzocht. **Deel II** bestudeert de prognostische en predictieve waarde van HER-2 en de insulinalgroefactorreceptor-1 (IGF1R) in relatie tot een gerichte behandeling. In **Deel III** wordt het effect van veroudering op tumorontwikkeling en de functionele status van de patiënt bestudeerd. Tot slot wordt in **Deel IV** het gebruik van predictieve en prognostische biomarkers in de kliniek bestudeerd. Het nut hiervan en de introductie van een op de patiënt toegespitste behandeling wordt ook in dit deel besproken. Het overkoepelend doel van dit proefschrift is het verbeteren van risicostratificatie van de (oudere) borstkankerpatiënt met daaropvolgend de identificatie van de individuele behandelingswinst, waarbij de introductie van gepersonaliseerde therapie in de oudere borstkankerpopulatie zijn intrede krijgt.

DEEL I: PROGNOSTISCHE BIOMARKERS IN MAMMACARCINOOM

Met behulp van biomarkers, die betrokken zijn bij de maligne ontaarding van borstcellen en tumorprogressie, kan een voorspelling gedaan worden over de prognose van een patiënt na primaire tumorbehandeling. Om dit te onderzoeken hebben we biomarkers geselecteerd die behoren tot de, zoals hierboven reeds beschreven, '*Hallmarks of Cancer*'.

In **hoofdstuk 2** hebben we de prognostische waarde van biomarkers die gerelateerd zijn aan apoptose en proliferatie onderzocht. Een verschuiving van de balans tussen deze twee cellulaire processen kan bijdragen aan het ontstaan en onderhoud van tumorgroei⁴. Eerdere studies laten tegenstrijdige resultaten zien wanneer gekeken wordt naar de prognostische waarde van apoptose en/of proliferatie in borstkanker^{16,17}. Tumorgroei wordt gekarakteriseerd door de verhouding tussen cellulaire proliferatie en

celdood. Op basis hiervan testen wij in hoofdstuk 2 de hypothese dat de balans tussen deze twee processen een meer nauwkeurige indicatie geeft van tumoragressiviteit dan wanneer er naar de processen afzonderlijk gekeken wordt⁴. In 488 stadium I-III mammacarcinoompatiënten werd de mate van apoptose en proliferatie onderzocht door middel van immunohistochemische kleuringen voor expressie van respectievelijk *p53*, actief caspase-3 en Ki67. Deze studie liet zien dat de patiënten met tumoren waarbij er sprake was van een sterke mate van proliferatie en apoptose de slechtste overleving hadden. Bij combinatie van alle drie de onderzochte markers (Ki67, actief caspase-3 en *p53*) in een zogeheten apoptotisch-proliferatief tumorsubtype, was er sprake van een significante associatie met overleving en tumorrecidief, waarbij patiënten met hoge mate van proliferatie en apoptose in de tumor, gecombineerd met een gemuteerde *p53* status, de slechtste uitkomst hadden. Interessant was echter dat bij separate analyses naar tumorstadium bleek dat de prognostisch voorspellende waarde van het apoptose-proliferatie tumorsubtype alleen significant bleef in de stadium I mammacarcinoompatiënten. Dit is met name relevant omdat door de toegenomen bewustwording van borstkanker in de maatschappij, en door het bevolkingsonderzoek, er een verschuiving heeft opgetreden naar de detectie van tumoren in een zeer vroeg stadium¹⁸. Klinische introductie van het hierboven beschreven model zou kunnen leiden tot de identificatie van de vroeg stadium mammacarcinoompatiënten met een ongunstig apoptose-proliferatie tumorprofiel, met een groter klinisch risico waarbij agressieve antitumor behandeling op zijn plaats zou kunnen zijn.

In **hoofdstuk 3, 4 en 5** hebben we de prognostische waarde van belangrijke biomarkers, gerelateerd aan de interacties die er plaatsvinden tussen de borstkankercel en het immuunsysteem onderzocht. In de afgelopen jaren heeft zich bewijs opgestapeld waaruit blijkt dat het immuunsysteem in staat is om tumorontwikkeling en progressie te controleren en te manipuleren¹⁹. Daarentegen is ook beschreven dat tumoren, door hun intrinsiek genetisch instabiele karakter, eigenschappen kunnen ontwikkelen om te ontsnappen aan dergelijke immuunherkenning en daaropvolgende eliminatie²⁰. Eén van de factoren betrokken bij deze continue wisselwerking is *Humane-Leukocyte-Antigen* (HLA) klasse I. HLA klasse I bestaat uit 3 typen (A, B en C), welke tumor-geassocieerde antigenen kunnen presenteren op het celmembraan van maligne cellen, waardoor Cytotoxische-T-Lymfocyten (CTL) geactiveerd worden en de tumorcellen opgeruimd worden. Om aan deze immuunherkenning te ontsnappen kunnen maligne cellen hun HLA klasse I *downreguleren*²¹. Tumorcellen kunnen, naast verminderde expressie van HLA klasse I moleculen op het celmembraan, HLA-G tot expressie brengen. HLA-G komt zelden voor in gezonde weefsels, maar vertoont wel expressie in tumoren²². HLA-E is daarentegen wel aanwezig in verscheidene gezonde weefsels en correleert met expressie van HLA klasse I²³. Onderzoek heeft aangetoond dat tumorexpressie van HLA-E en HLA-G ervoor zorgt dat *Natural-Killer* (NK) cellen niet geactiveerd kunnen worden, waardoor

tumorcellen ook langs deze weg kunnen ontsnappen aan het immuunsysteem²²⁻²⁴. Tot slot kunnen regulatoire-T-cellen (Treg) in de tumoromgeving een immunosuppressief effect uitvoeren op de CTL¹⁹.

Gezien eerdere studies de complexiteit en het belang hebben aangetoond van de interacties tussen het immuunsysteem en de borstkankercel, werd in **hoofdstuk 3** een samengestelde biomarker gecreëerd, genaamd 'tumorimmuunsubtype', op basis van bovenstaande essentiële markers²⁵⁻²⁷. Voor 293 borstkankerpatiënten in het training-cohort en 219 borstkankerpatiënten uit het validatie-cohort werd er een statistisch significante associatie gezien met zowel relatieve overleving als borstkanker recidief. Patiënten met tumoren die werden beschouwd als laag immunogeen hadden een slechtere klinische uitkomst in vergelijking met patiënten waar de tumoren als gemiddeld of hoog immunogeen werden beschouwd. Hoog immunogene tumoren werden geïdentificeerd als tumoren met 'HLA klasse I expressie op het celmembraan en CTL positiviteit, zonder Treg infiltratie in de tumor' of 'verlies van HLA klasse I, gecombineerd met verlies van HLA-E en HLA-G waardoor de NK cellen geactiveerd worden, zonder immunosuppressieve Treg infiltratie'. Gemiddelde immunogene tumoren werden gekarakteriseerd door 'HLA klasse I expressie, zonder CTL aanwezigheid of de aanwezigheid van immunosuppressieve Tregs'. Tenslotte werden laag immuun-vatbare tumoren omschreven als 'tumoren waarbij er verlies van HLA klasse I is opgetreden, gecombineerd met het verlies van NK cellen, al dan niet op basis van verhoogde HLA-E en HLA-G expressie of de aanwezigheid van Tregs'. Concluderend kan er gesteld worden dat in bovenstaande studie de complexiteit en veelzijdige wisselwerking tussen het immuunsysteem enerzijds en de tumorcellen anderzijds aangetoond is. De resultaten van dit onderzoek benadrukken nogmaals het grote belang van de interactie tussen het immuunsysteem en de kankercel met betrekking tot prognosticatie en eventueel hierop gebaseerde of hiermee interfererende adjuvante behandeling.

In **hoofdstuk 4** hebben we de prognostische waarde van dezelfde biomarkers als in hoofdstuk 3 onderzocht, waarbij er onderscheid werd gemaakt tussen invasief ductaal carcinoom (IDC) en invasief lobulair carcinoom (ILC). Er is voldoende bewijs dat ILC, in vergelijking met IDC, andere eigenschappen bezit. Zo zijn ILC tumoren vaak groter, vaker hormoonreceptor-positief en hebben ze vaak een minder agressief beloop^{28;29}. Echter, tot op heden wordt er in de klinische setting weinig onderscheid gemaakt tussen IDC en ILC. Het doel van deze studie was daarom ook het vergelijken van de relevantie van de tumorimmuunsubtypes in de twee meest voorkomende histologische borsttumor soorten: IDC en ILC. Tevens werden de moleculaire intrinsieke borstkankersubtypes (Luminal A en B, Basal-like en ERBB2) en de mate van apoptose-proliferatie (zoals beschreven in hoofdstuk 2) onderzocht. Er werd aangetoond dat de prognostische waarde van zowel de tumorimmuunsubtypes, de moleculaire intrinsieke borstkankersubtypes, als ook de apoptose-proliferatie tumorsubtypes alleen gelden voor de IDC, en niet van

toepassing zijn op ILC. Verder bleek uit ons onderzoek dat de reeds beschreven tumor-immunoprofielen alleen van toepassing zijn op de Luminal A tumortypes. Deze uitkomst strookt met het feit dat Luminal A tumoren ook het grootste deel uitmaken van de IDC. Op basis van deze uitkomsten kan echter niet gesteld worden dat moleculaire subtypes en histologische borstkankersubtypes identiek zijn. Hoewel frequent gelijk behandeld, is er voldoende bewijs om aan te nemen dat IDC en ILC twee verschillende entiteiten zijn. Om de borstkankerpatiënt in de toekomst van de meeste optimale therapie te voorzien is het van cruciaal belang dat er onderscheid wordt gemaakt tussen deze twee histologisch verschillende borstkankertypes. Toekomstig onderzoek zal zich moeten richten op de therapeutische sensitiviteitsverschillen tussen IDC en ILC, waarbij naast klassieke tumorkarakteristieken ook rekening gehouden moet worden met de immuun- en moleculair gerelateerde eigenschappen van een tumor.

Doordat eerder onderzoek mogelijk een immuunmodulator effect van endocriene behandeling liet zien ³⁰ werden in **hoofdstuk 5** de tumorimmunkarakteristieken bestudeerd in relatie tot klinische uitkomst in een groot, hormoonreceptor positief borstkankercohort, welke met twee verschillende endocriene behandelarmen behandeld zijn (TEAM studie). Patiënten van de TEAM studie werden behandeld met eenmaal daags exemestane 25mg gedurende vijf jaar *of* sequentiële therapie, bestaande uit eenmaal daags tamoxifen 20mg gedurende twee en een half jaar gevolgd door eenmaal daags exemestane 25mg gedurende twee en een half jaar ³¹. Uit eerder onderzoek is gebleken dat tamoxifen een immuun-shift teweegbrengt, waarbij de cellulaire immuniteit (T-helper 1) omgezet wordt in humorale immuniteit (T-helper 2) ³⁰ wat tevens een verklaring zou kunnen zijn voor het geobserveerde verschil in behandelresultaat tussen aromataseremmers en tamoxifen ^{30;32}. Onze resultaten lieten alleen bij patiënten in de sequentiële behandelarm een significante associatie zien tussen een hoge mate van FoxP3+ en overleving. Dit resultaat werd tevens ondersteund door een significante interactie tussen FoxP3+ infiltratie en endocriene therapie. Door de kenmerken van de patiënten van de TEAM studie (post-menopausaal: gaat gepaard met een functionele toename van ontstekingsparameters; en hormoonreceptor-positiviteit: waardoor hogere oestrogeenconcentraties in en om de tumor aanwezig zijn, welke leidt tot meer verlies van ontstekingsremmende Adenosine (ADO)), wordt er een voorkeur uitgesproken voor zogeheten 'Natural Tregs' (in tegenstelling tot de 'geïnduceerde Tregs', welke de antitumorimmuunmodulatie beïnvloeden), welke zorgdragen voor onderdrukking van het ontstekingsproces rondom de tumor en hiermee de carcinogenese vertragen ³³⁻³⁵. Het ontbreken van deze associatie in de exemestane behandelde patiënten kan verklaard worden door het verlies van het hoge gehalte van oestrogeen in en om de tumor. Een vergelijkbaar resultaat werd gezien voor de tumorimmuunsubtypes (laag, gemiddeld en hoog immuun-gevoelige tumoren) in relatie met de twee endocriene

behandelarmen. Gedacht wordt dat ook hier Tregs een belangrijke rol spelen in het verlies van prognostische waarde in de exemestane behandelde patiëntengroep. Reeds werd aangetoond dat met exemestane behandeling er een significante toename van de CD8+/Treg ratio optreedt bij patiënten die goed reageren op aromatase remmende behandeling, en daarnaast werd er ook een afname van FoxP3+ cellen gezien na exemestane behandeling^{36;37}. Voorgesteld wordt dat verlies van zeer prognostische Treg cellen leidt tot het gelijktrekken van de klinische uitkomsten van de drie (laag, gemiddeld, hoog) tumorimmunsotypes onder exemestane behandeling. Tot de tijd dat dit bewezen wordt, kan er gespeculeerd worden over het grote belang van Treg cellen bij de inhibitie van tumorontwikkeling in de postmenopauzale, hormoonreceptor-positieve borstkankerpatiënt.

Hoofdstuk 6 van dit proefschrift beschrijft de prognostische waarde van de moleculair intrinsieke borstkankersubtypes in de oudere borstkankerpatiënt. De afgelopen jaren heeft de identificatie van de moleculair intrinsieke borstkankersubtypes aangetoond dat borstkanker een heterogene ziekte is met een variatie in de respons op adjuvante systemische behandeling. Daarom is het, zeker in deze oudere borstkankerpopulatie, waar een groot deel van de tumoren hormoonreceptor positief is, met vaak een lage proliferatiegraad, van grote waarde om het prognostische effect van de moleculaire borstkankersubtypes te bepalen.

Er zijn vier veelvoorkomende moleculaire borstkankersubtypes beschreven; Luminaal A en B: grotendeels hormoonreceptor positief en met een indolent karakter³⁸⁻⁴⁰; De basal-like tumoren: triple negatieve tumoren, gecombineerd met expressie van genen betrokken bij de basale epitheliale laag, zoals Cytokeratine 5 en 6; en tot slot de ERBB2 tumorsubtypes, welke veel overeenkomsten tonen met de basal-like subtypes, maar waarbij er hoge mate van HER-2 expressie op de tumor aanwezig is. Deze laatste twee moleculaire tumorsubtypes hebben een agressiever karakter met ongunstige prognose³⁸. In deze studie werden, vanwege het gebrek aan in situ hybridisatie en het feit dat de oudere borstkankerpatiënten geen significant verschil in klinische uitkomst toonden in vergelijking met patiënten met HER-2 scores 0 en 1+ (hoofdstuk 8), alle HER-2 2+ tumoren als HER-2 negatief beschouwd.

Eerder onderzoek toonde aan dat moleculaire borstkankersubtypes, in vergelijking met de jongere populatie een ander distributiepatroon had in de oudere borstkankerpopulatie⁴, en dat de prognostisch voorspellende waarde verloren ging. Echter, gezien de kleine aantallen patiënten van 65 jaar of ouder in voorgaande studie, welke resulteerde in een klein discriminatief vermogen, waren wij van mening dat het herhalen van deze studie in een grote oudere borstkankerpopulatie van toegevoegde waarde zou zijn.

Resultaten van onze studie toonden aan dat de verdeling van moleculaire subtypes wel van significante prognostische waarde was in de oudere (≥ 65 jaar) borstkanker-

populatie. Zoals verwacht, lieten onze data een hogere mate van ziekte terugkeer zien in de ERBB2 en de basal-like moleculaire tumorsubtypes. Tevens werd er een slechtere relatieve overleving gezien voor alle moleculaire borstkankersubtypes wanneer deze vergeleken werd met de Luminal A subtypes. In vergelijking met de jongere borstkankerpopulatie toonde onze oudere borstkankerpopulatie een hogere prevalentie van de indolente Luminal A tumoren en een lage prevalentie van de agressievere moleculaire tumorsubtypes⁴¹. Deze observatie is overeenkomstig met de vaak genoemde mildere tumorkarakteristieken op oudere leeftijd.

Dit is de eerste studie, uitgevoerd in een omvangrijk ouder borstkankercohort, welke de significante prognostische waarde van de moleculaire borsttumorsubtypes aantoont, waarbij er rekening wordt gehouden met het grote risico van concurrerende doodsoorzaken. Derhalve ondersteunt deze studie het gebruik van de moleculaire borstkankersubtypes in de oudere borstkankerpatiënt voor prognosticatie en therapiekeuze. Echter, juist in deze oudere borstkankergroep moet het belang van de functionele status en de persoonlijke behandelwens niet bedolven raken onder het moleculaire geweld van de moderne diagnostiek.

DEEL II: PREDICTIEVE BIOMARKERS IN MAMMACARCINOOM EN GERICHTE BEHANDELING

Signalering via de *Insulin-like Growth Factor type 1 Receptor* (IGF1R) speelt een belangrijke rol in de ontwikkeling van vele soorten tumoren, inclusief borstkanker^{42;43}. Aangevoerd is dat IGF1R expressie gecorreleerd is aan de mate van oestrogeenreceptor expressie⁴⁴, en dat 17 β -Estradiol, hoewel in de mindere mate dan IGF1, zorg kan dragen voor activatie van de IGF1R, welke op zijn beurt leidt tot activatie van de *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK)^{45;46}. Deze data leidde tot de hypothese dat patiënten, behandeld met aromataseremmers, door de complete blokkade van oestrogeenproductie deze additionele tumor-groei-stimulerende-*pathway* verliezen. Daarbij zou metformine, reeds bekend om het verlagen van de plasma insuline- en insuline groeifactor-concentratie door het verhogen van de insulinesensitiviteit⁴⁷, van additionele therapeutische waarde zijn bij borstkankerbehandeling door de verminderde IGF1 binding op de IGF1R^{48;49}. In **hoofdstuk 7** van dit proefschrift, voerden we een substudy analyse uit bij 2.446 Nederlandse patiënten van het TEAM-cohort. Deze studie onderzocht het klinische effect van exemestane en metformine behandeling op de mate van IGF1R expressie van de borsttumor in een hormoonreceptor positief borstkankercohort. Resultaten van deze studie toonden, in vergelijking met sequentieel behandelde patiënten, een significante verbetering van de ziektevrije overleving aan voor patiënten die behandeld waren met exemestane monotherapie waarbij de tumoren een hoge mate van IGF1R tot

expressie brachten. Er werd geen associatie gezien voor patiënten van wie de tumoren een lage expressie hadden van IGF1R. Het additionele gebruik van metformine, naast exemestane behandeling, resulteerde in een verdere verbetering van de ziektevrije overleving en *overall* overleving in patiënten waarvan de tumoren een hoge mate van IGF1R tot expressie brachten. Deze interessante bevindingen staan in schril contrast met de hoofdbevindingen van de TEAM studie, waarbij er geen verschil gezien werd in *overall survival*, *breast cancer specific survival* of *disease free survival* tussen de twee behandelarmen ³¹. Een mogelijke verklaring voor onze bevinding is het toenemend bewijs voor de mogelijkheid van oestrogeen om, naast de binding en activatie van de klassieke oestrogeenreceptoren, tevens de capaciteit te bezitten om IGF1R te fosforyleren en activeren ⁴⁶. Onze resultaten, namelijk de sterke interactie tussen de mate van IGF1R expressie op het tumoroppervlak en de effectiviteit van exemestane, doen vermoeden dat het effect grotendeels afhankelijk is van de afgenomen oestrogeenproductie, waardoor de hierboven besproken oestrogeen geïnduceerde activatie van de IGF1R verstoord wordt. Deze hypothese wordt ook ondersteund door de observatie dat patiënten met hoge mate van IGF1R expressie op hun tumoroppervlak, maar behandeld werden met tamoxifen, geen klinisch voordeel hadden. Dit laatste berust waarschijnlijk op het feit dat zij nog circulerend oestrogeen hebben, welke de IGF1R kan activeren en zo de groei van borstkanker kan stimuleren. Een tweede hypothese-onderbouwende observatie is het feit dat er geen klinisch voordeel gezien werd voor patiënten behandeld met exemestane waarbij de tumoren een lage mate van IGF1R expressie toonden. Dit laatste zou kunnen berusten op het feit dat de oestrogeen geïnduceerde groeistimulatie van IGF1R te klein is in deze tumoren. Daarnaast stellen we voor dat het additieve effect van metformine behandeling geïnduceerd wordt door de directe verlaging van de IGF concentratie. Patiënten met hoge IGF1R expressie op het tumoroppervlak, die behandeld zijn met zowel exemestane als metformine, hebben een dubbele blokkade van de ER-IGF1R *cross-talk*, welke resulteert in een betere klinische uitkomst. Voor de alledaagse kliniek betekent dit dat door het stratificeren van de patiënten op basis van de IGF1R tumorexpressie, we patiëntsubgroepen kunnen identificeren die veel voordeel kunnen hebben van gecombineerde therapie. Deze bevinding is een ondersteuning van de hedendaagse trend waarbij individualisering van de behandeling, met als doel de klinische uitkomst te verbeteren, centraal staat in de heterogene borstkankerpopulatie. Tenslotte is dit een uitkomst, gezien het grote risico op chemotherapie toxiciteit, die van groot belang zou kunnen zijn voor de oudere borstkankerpatiënt ¹¹, Daarnaast zijn ongeveer 80% van de tumoren in de oudere borstkankerpopulatie hormoonreceptorpositief, welke louter met endocriene therapie behandeld worden ⁵⁰. Gezien borstkankersterfte toeneemt met de leeftijd, wat toegeschreven kan worden aan zowel onder- als overbehandeling ⁵¹, zijn nieuwe behandelstrategieën, bij voorkeur met een laag toxiciteitsprofiel zoals metformine, zeer gerechtvaardigd.

In **hoofdstuk 8** werd het potentiële herstel van de klinische interesse voor anti-HER-2 therapie in de oudere borstkankerpatiënten onderzocht. Het is reeds bekend dat HER-2 overexpressie geassocieerd is met een agressievere tumor fenotype⁵², met als gevolg een slechtere klinische uitkomst^{53;54}. Behandeling van HER-2 overexpressie op de tumor verbeterd de klinische uitkomst in zowel lymfeklier negatieve als lymfeklier positieve borstkanker^{55;56}. Aberrante activatie van de Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathway door PIK3CA mutaties, welke vaak voorkomt in combinatie met HER-2 overexpressie, resulteert ook in tumorgroei⁵⁷, en verkleint de mate van response op HER-2-gerichte therapieën^{58;59}. Een bekende tekortkoming van het huidige klinische onderzoek naar de waarde van de biologische tumormarkers is dat het grootste deel van de studies uitgevoerd wordt in een relatief jonge borstkankerpopulatie, wat extrapolatie naar de oudere borstkankerpatiënt bemoeilijkt. De hoge incidentie van cardiale bijwerkingen van anti-HER-2 behandeling leidt tot de vaak voorkomende angst voor het voorschrijven van anti-HER-2 behandeling in de oudere borstkankerpatiënt. Echter, tot op heden is er geen wetenschappelijk bewijs voor het achterwege laten van de anti-HER-2 behandeling in deze specifieke borstkankersubgroep. Gezien het gebrek aan wetenschappelijke onderbouwing en het gebrek aan klinische richtlijnen, zijn wij van mening dat onderzocht moet worden of de huidige *non-evidence based* behandelingsstrategieën met betrekking tot HER-2, bevestigt of weerlegt moeten worden.

Onze studie, bestaande uit 1.698 borstkankerpatiënten van 65 jaar of ouder (FOCUS cohort), toonde aan dat 5-jaar na diagnose, patiënten met een HER-2 score van 3+ een significant hoger risico hadden op ziekteretugkeer en een slechtere 10-jaars relatieve overleving hadden in vergelijking met HER-2 negatieve patiënten, zelfs als er rekening werd gehouden met een grotere kans op sterfte gezien de oudere leeftijd. Interessant genoeg, bleek dat patiënten met HER-2 2+ tumoren geen hoger risico hadden op ziekte terugkeer dan borstkanker patiënten *zonder* HER-2 overexpressie. PIK3CA mutaties waren niet van prognostische waarde in deze specifieke borstkankerpopulatie.

Bovenstaand resultaat impliceert dat oudere patiënten met HER-2 3+ tumoren mogelijk wel baat zouden hebben bij anti-HER-2 behandeling. Bovendien heeft recent onderzoek bewezen dat de vaak ernstig gevreesde, hoofdzakelijk cardiale bijwerkingen van anti-HER-2 behandeling in de praktijk minder ernstig en minder vaak voorkomen dan voorheen gedacht werd^{60;61}. In de huidige medische setting wordt anti-HER-2 behandeling vaak achterwege gelaten bij de oudere borstkankerpatiënt vanwege de gevreesde bijwerkingen en de vaak reeds beperkte levensverwachting. Echter, gezien de uitkomst van deze studie zou er gesuggereerd kunnen worden dat anti-HER-2 behandeling wel degelijk van meerwaarde zou kunnen zijn in de fitte, oudere borstkankerpatiënten. Daarnaast zou (dubbele) HER-2 blokkade in oudere patiënten, met een slechtere klinische conditie, of met een sterke voorkeur om chemotherapie achterwege te laten, een waardevolle optie kunnen zijn. Eén van de kenmerken van de oudere

kankerpatiënten is de heterogeniteit binnen dezelfde chronologische leeftijd. Onder de huidige omstandigheden zal, indien er geen verschil gemaakt wordt tussen fitte en zwakke(re) oudere patiënten, de zorg voor deze fitte populatie tekortschieten, met uiteindelijk oneerlijke overlevingskansen. Toekomstig onderzoek moet gaan uitwijzen of het haalbaar is om een effectieve anti-HER-2 behandeling met minimale toxiciteit voor de oudere borstkankerpatiënten te bewerkstelligen.

DEEL III: VEROUDERING IN DE BORSTKANKERPATIËNT

Van alle factoren die bijdragen aan de oncogenese brengt veroudering het grootste risico met zich mee ⁶². De *multi-hit*, ook wel de hypothese van Knudson genoemd, beweert dat kanker vaker voorkomt op oudere leeftijd omdat er tijd nodig is om genetische mutaties op te lopen en cellen over de mutagene drempel heen te duwen ⁶³. Echter, wat bovenstaande hypothese niet kan verklaren is waarom het risico op kanker fors verlaagd blijkt bij patiënten die zich aan een caloriebeperkt dieet houden en veel aan lichamelijke beweging doen ⁶⁴. Tijdens de veroudering wordt er een afname van de nucleair gelokaliseerde nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) gezien, wat resulteert in een afname van Sirtuin 1 (SIRT1) activiteit in de celkern waardoor Von Hippel-Lindau (VHL) afneemt en hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) zich stabiliseert ⁶⁵. Deze door leeftijd geïnduceerde stabilisatie van HIF-1 α resulteert in een pseudo-hypoxische cel-staat, welke verstoring van de oxidatieve fosforylering (OXPHOS) als gevolg heeft, en hiermee een zogeheten Warburg-effect veroorzaakt. De hieropvolgende toename van reactieve zuurstofradicalen (ROS) resulteren in een mutageen milieu met als gevolg carcinogenese. Bovenstaande bevindingen zouden een verklaring kunnen zijn voor het exponentieel toegenomen risico op kanker op oudere leeftijd ^{65;66}. Deze leeftijd gedreven metabole achteruitgang als een belangrijke oorzaak van tumorgenese wordt ook wel “geroncogenese” genoemd.

Hoewel hypoxie toxisch is voor een cel, kunnen kankercellen zich aanpassen door middel van genetische modificatie en hiermee de overleving en proliferatietendens beïnvloeden onder deze stressvolle omstandigheden. Een reeds bekend cellulair adaptatie mechanisme in geval van (pseudo) hypoxie in de weefsels is opregulatie van HIF-1. Bij (pseudo)hypoxie, bindt HIF-1 zich aan zogeheten hypoxie-respons elementen (HREs), welke op hun beurt de expressie van verscheidene hypoxische respons genen beïnvloeden ⁶⁷. Bekende HIF-1 *target* genen zijn betrokken bij celproliferatie, angiogenese, inflammatie, metabolisme, apoptose, immortalisatie en migratie ^{67;68}. In **hoofdstuk 9** laten we, in vergelijking met normaal borstweefsel, een toename zien van de HIF-1 α mRNA expressie en zijn *target* genen in het borstkankerweefsel. Deze observatie gold echter alleen voor patiënten van 65 jaar of ouder, ongeacht de overeenkomsten op het

gebied van pathologisch tumorstadium, tumorgraad en tumormorfologie tussen de leeftijdsgroepen (<65jr of ≥65jr). Opvallend was dat voor de jongere patiëntengroep wel dezelfde trend te zien was voor de mate van expressie van HIF-1α en de beschreven *targets* als voor de oudere borstkankerpopulatie. Dit doet vermoeden dat HIF-1α en bijbehorende *targets* waarschijnlijk wel een rol spelen bij de tumorgenese van de jongere borstkankerpatiënt maar dat deze van minder belang zijn dan in de patiëntengroep van 65 jaar of ouder. Een mogelijke verklaring hiervoor werd beschreven door Gomes *et al.* In deze publicatie wordt gepleit voor een zogenaamde 'priming' van de gezonde cellen op oudere leeftijd met als resultaat hoge mate van expressie van HIF-1α door de zogeheten leeftijd-geïnduceerde HIF-1α stabilisatie door de pseudo-hypoxische staat⁶⁵. Tumorontwikkeling, bekend vanwege de hoge mate van HIF-1α expressie⁶⁹, in een milieu met reeds verhoogde HIF-1α waarden, resulteert in een exponentiële toename van HIF-1α in de tumor. Voorgesteld wordt dat deze significant verhoogde mate van HIF-1α expressie in de borsttumoren van de oudere patiënten een belangrijke rol speelt in het agressievere, en minder therapiegevoelige karakter van de mammatumor van de oudere patiënt⁵¹. Therapeutische blokkade van HIF, door middel van antisense HIF-1α⁷⁰, of opregulatie van het VHL gen⁷¹, zou kunnen leiden tot een afname van de tumorgroei middels verstoring van de neovascularisatie en metabole reprogrammering, met als doel de klinische uitkomst verbeteren. Indien succesvol, zou dit een veelbelovende nieuwe farmacologische behandeltechniek zijn welke, gezien de resultaten van onze studie, van groot belang zou zijn voor de oudere borstkankerpatiënt.

Bovengenoemde metabole verandering waarbij oxidatieve fosforylering wordt vervangen door aerobe glycolyse is grotendeels afhankelijk van het glycolytisch enzyme pyruvate kinase (PK)⁷². Gezonde lichaamscellen brengen overwegend de pyruvate kinase M1 isoform (PKM1) tot expressie, terwijl tumorcellen hoofdzakelijk de M2 isoform (PKM2) tot expressie brengen.

PKM2 katalyseert de laatste stap van de glycolyse en reprogrammeert de glycolytische flux wat van groot belang is voor prolifererende cellen⁷². Het laatste decennium trekt PKM2 steeds meer de aandacht als veelbelovende therapeutische *target* voor kankerbehandeling, en zou het tevens ook een prominente rol kunnen aannemen in anti-verouderingsbehandeling.

In **hoofdstuk 10** onderzochten we het verschil in de mate van expressie van HIF-1α en de geassocieerde *target* genen, waaronder PKM1 en 2, in patiënten tussen de 65 en 80 jaar en patiënten van ouder dan 80 jaar, in zowel gezond borstweefsel als tumorweefsel. Daarnaast onderzochten we of de mate van expressie, oftewel metabole reprogrammering, geassocieerd is met klinische kenmerken van veroudering en uitkomst. Onze resultaten toonden aan dat HIF1-α significant hoger tot expressie komt in het normale borstweefsel van de oudere patiënt, en dat de mate van HIF1-α expressie in het normale borstweefsel geassocieerd is met een hogere tumorgraad in de patiënt.

Verder was PKM2 significant geassocieerd met surrogaatmarkers voor functionaliteit zoals polyfarmacie en moeite met lopen, waarbij hoge mate van PKM2 expressie in het normale borstweefsel vaker geassocieerd is met slechte functionele uitkomsten, met een potentieel negatief effect op overleving.

Bovenstaande bevindingen ondersteunen de hypothese dat ontregeling van de HIF1- α metabole pathway, leidend tot een toename van ROS, een belangrijke rol speelt bij de hoge kankerincidentie van de oudere populatie.

Daarentegen toonde onze studie aan dat hoge mate van PKM2 eiwitexpressie in de borsttumoren geassocieerd was met een significant betere ziektevrije overleving en werd er een statische trend gezien voor minder ziekterugkeer dan in patiënten met weinig PKM2 eiwitexpressie in de tumor. Deze uitkomst komt overeen met de resultaten van een eerdere studie, waarbij aangetoond werd dat activatie van PKM2 het oncogene metabolisme *in vitro* veranderde welke leidde tot vertraagde xenograft tumorgroei⁷³. Een mogelijke verklaring hiervoor is het tekort aan *precursors* voor de synthese van bouwblokken, begunstigd door dimerisch PKM2, noodzakelijk in hoog proliferatieve cellulaire omstandigheden. Activatie van PKM2 in tetramere vorm leidt tot inhibitie van de cellulaire proliferatie^{73;74}, welke resulteert in minder kankerontwikkeling en -verspreiding. Op basis van bovenstaande bevindingen pleiten sommigen voor PKM2-activatie als een veelbelovende adjuvante behandelingsmodaliteit. Echter, de aanwezigheid van PKM2, en de rol die het vervult in het verouderingsproces moet niet onderschat worden en zou de antikanker therapeutische effectiviteit kunnen verstoren.

Er zal meer onderzoek moeten geschieden om de precieze rol, functie en bijdrage van HIF1- α en PKM2 op het verouderingsproces en de mogelijke invloed op tumorigenese te achterhalen.

Als metabole verandering inderdaad een belangrijke '*driver*' blijkt van veroudering en geroncogenese, zullen moleculen die metabole veroudering voorkomen, afremmen of terugdraaien een belangrijke rol gaan innemen in anti-veroudering en anti-kankerbehandeling. Veelbelovende ontwikkelingen hebben reeds plaatsgevonden met betrekking tot HIF1- α *inhibitors*, SIRT *activators*, en zowel PKM2 inhiberende, waarbij hnRNPA1, hnRNPA2 en PTB getarget worden, als PKM2 activerende behandeling⁷⁴⁻⁷⁷. Op basis van de huidige kennis is het aannemelijk dat behandeling welke leidt tot vertragen of terugdraaien van veroudering en leeftijd gerelateerde aandoeningen zoals kanker, een snelle ontwikkeling zal doormaken, met grote klinische consequenties in de komende jaren.

DEEL IV: GEPERSONALISEERDE KANKERBEHANDELING

Hedendaagse classificatie middels de TNM-stadiëring, waarbij rekening gehouden wordt met de tumor (T), de betrokken lymfeklieren (N), en de metastasering op afstand

(M), blijkt geen ideaal handvat te zijn voor klinici om een behandelingsstrategie te bepalen. Om deze reden is het van groot belang om additionele biomarkers te onderzoeken die de huidige tumorstadiëring kunnen verbeteren. Met de introductie van de aanvullende biomarkers naast de huidige tumorstadiëring zou de prognose van een patiënt beter kunnen worden ingeschat en kan de multidisciplinair bepaalde behandeling per individu worden geoptimaliseerd. Het uiteindelijke doel is om voor deze gepersonaliseerde benadering de moleculaire, (epi)genetische en klinische tumoreigenschappen met patiëntkarakteristieken te integreren, om zo betere preventieve, diagnostische en therapeutische methoden te ontwikkelen.

Eén van de ontwikkelingen die het afgelopen decennium een grote vlucht heeft genomen is de zogeheten '*genome-wide-approach*'. Hierbij worden RNA-expressie profielen met prognostische en predictieve waarde per tumortype ontwikkeld. De twee bekendste profielen, die reeds hun intrede op de diagnostische markt hebben gemaakt zijn *Oncotype DX* (Genomic Health Inc., Redwood City, CA, USA) en de *MammaPrint* (Agendia BV, Amsterdam, Nederland).

De laatste jaren heeft bovenstaande ontwikkeling een belangrijke voet aan de grond gekregen voor de behandeling van mammacarcinoom en colorectaalcarcinoom.

Alhoewel de toegevoegde waarde van genotypering voor het bepalen van systemische therapie duidelijk lijkt, is de impact op chirurgisch vlak onduidelijk. In **hoofdstuk 11** wordt de rol van genotypering in de chirurgische besluitvorming bediscussieerd. Behoudens enkele afzonderlijke genetische mutaties die een directe invloed hebben op chirurgisch ingrijpen, zoals *BRCA* mutaties in borstkanker waarvoor een profylactische bilaterale mastectomie wordt geadviseerd, is er tot op heden geen directe relatie tussen genotypering en chirurgische besluitvorming. Indirect is er voor genotypering wel een chirurgische besluitvormingsrol weggelegd. Zo kan het genotype van een preoperatief biopt leiden tot een gerichte neo-adjuvante therapie, leidend tot optimale tumorregressie, met als gevolg dat de timing en uitgebreidheid van de operatie kan worden beïnvloed. Indien door gerichte neo-adjuvante therapie complete remissie optreedt, zou zelfs een '*wait-and-see*' benadering tot de mogelijkheden behoren. Om uiteindelijk de veelbelovende gepersonaliseerde behandeling met behulp van biomarkers en genotypering van kankerpatiënten te bereiken, moeten er nog belangrijke stappen worden genomen. Ten eerste is het voor de ontwikkeling en validatie van biomarkers en genotyperingsprofielen belangrijk om gestandaardiseerde methoden en vergelijkbare patiëntcohorten te gebruiken, waarmee de klinische integratie verbeterd kan worden. Ten tweede is het, gezien de vergrijzing van onze populatie, niet onbelangrijk om het fenotype van een patiënt voor ogen te houden, waarbij zowel de comorbiditeiten als de effecten van deze comorbiditeiten op de tumorontwikkeling en de behandeling moeten worden meegewogen in het bepalen van de patiëntgerichte behandelingsstrategie. Ten slotte is het van cruciaal belang dat alle medische specialisten die betrokken zijn bij

de kankerbehandeling hun krachten bundelen in een multidisciplinair oncogeriatrisch-front, waardoor iedere individuele patiënt de meest efficiënte en draaglijke behandeling krijgt en de kankerbehandeling naar een hoger niveau getild kan worden.

REFERENCE LIST

- (1) DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin* 2011;61:409-418.
- (2) Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127:2893-2917.
- (3) Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
- (4) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- (5) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.
- (6) Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 2009;20:1319-1329.
- (7) Italiano A. Prognostic or predictive? It's time to get back to definitions! *J Clin Oncol* 2011;29:4718-4719.
- (8) Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer* 2008;44:946-953.
- (9) Benz CC. Impact of aging on the biology of breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:65-74.
- (10) Guralnik JM. Assessing the impact of comorbidity in the older population. *Ann Epidemiol* 1996;6:376-380.
- (11) Hurria A, Lichtman SM. Clinical pharmacology of cancer therapies in older adults. *Br J Cancer* 2008;98:517-522.
- (12) Kiderlen M, de Glas NA, Bastiaannet E *et al.* Impact of comorbidity on outcome of older breast cancer patients: a FOCUS cohort study. *Breast Cancer Res Treat* 2014;145:185-192.
- (13) Schonberg MA, Marcantonio ER, Li D, Silliman RA, Ngo L, McCarthy EP. Breast cancer among the oldest old: tumor characteristics, treatment choices, and survival. *J Clin Oncol* 2010;28:2038-2045.
- (14) NABON. Richtlijn Mammacarcinoom versie 2.0. 13-2-2012.
- (15) van de Water W, Kiderlen M, Bastiaannet E *et al.* External validity of a trial comprised of elderly patients with hormone receptor-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014;106:dju051.
- (16) Jager JJ, Jansen RL, Arends JW. Clinical relevance of apoptotic markers in breast cancer not yet clear. *Apoptosis* 2002;7:361-365.
- (17) Ross JS, Linette GP, Stec J *et al.* Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:573-585.
- (18) Esserman L, Shieh Y, Thompson I. Rethinking screening for breast cancer and prostate cancer. *JAMA* 2009;302:1685-1692.
- (19) Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006;6:715-727.
- (20) Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004;22:329-360.
- (21) Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:904-910.
- (22) Wischhusen J, Waschbisch A, Wiendl H. Immune-refractory cancers and their little helpers--an extended role for immunetolerogenic MHC molecules HLA-G and HLA-E? *Semin Cancer Biol* 2007;17:459-468.

- (23) Palmisano GL, Contardi E, Morabito A, Gargaglione V, Ferrara GB, Pistillo MP. HLA-E surface expression is independent of the availability of HLA class I signal sequence-derived peptides in human tumor cell lines. *Hum Immunol* 2005;66:1-12.
- (24) Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 2002;3:999-1005.
- (25) de Kruijf EM, van Nes JG, Sajet A *et al.* The predictive value of HLA class I tumor cell expression and presence of intratumoral Tregs for chemotherapy in patients with early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:1272-1280.
- (26) de Kruijf EM, Sajet A, van Nes JG *et al.* HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients. *J Immunol* 2010;185:7452-7459.
- (27) Zeestraten EC, Van Hoesel AQ, Speetjens FM *et al.* FoxP3- and CD8-positive Infiltrating Immune Cells Together Determine Clinical Outcome in Colorectal Cancer. *Cancer Microenviron* 2013;6:31-39.
- (28) Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res* 2004;6:R149-R156.
- (29) Mathieu MC, Rouzier R, Llombart-Cussac A *et al.* The poor responsiveness of infiltrating lobular breast carcinomas to neoadjuvant chemotherapy can be explained by their biological profile. *Eur J Cancer* 2004;40:342-351.
- (30) Behjati S, Frank MH. The effects of tamoxifen on immunity. *Curr Med Chem* 2009;16:3076-3080.
- (31) van de Velde CJ, Rea D, Seynaeve C *et al.* Adjuvant tamoxifen and exemestane in early breast cancer (TEAM): a randomised phase 3 trial. *Lancet* 2011;377:321-331.
- (32) Cuzick J, Sestak I, Baum M *et al.* Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol* 2010;11:1135-1141.
- (33) Baumgarten SC, Frasor J. Minireview: Inflammation: an instigator of more aggressive estrogen receptor (ER) positive breast cancers. *Mol Endocrinol* 2012;26:360-371.
- (34) Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol (1985)* 1994;76:5-13.
- (35) Xie W, Duan R, Safe S. Estrogen induces adenosine deaminase gene expression in MCF-7 human breast cancer cells: role of estrogen receptor-Sp1 interactions. *Endocrinology* 1999;140:219-227.
- (36) Chan MS, Wang L, Felizola SJ *et al.* Changes of tumor infiltrating lymphocyte subtypes before and after neoadjuvant endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast cancer patients--an immunohistochemical study of Cd8+ and Foxp3+ using double immunostaining with correlation to the pathobiological response of the patients. *Int J Biol Markers* 2012;27:e295-e304.
- (37) Generali D, Bates G, Berruti A *et al.* Immunomodulation of FOXP3+ regulatory T cells by the aromatase inhibitor letrozole in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2009;15:1046-1051.
- (38) Boucharly C, Rapiti E, Fioretta G *et al.* Undertreatment strongly decreases prognosis of breast cancer in elderly women. *J Clin Oncol* 2003;21:3580-3587.
- (39) Katz SJ, Morrow M. Addressing overtreatment in breast cancer: The doctors' dilemma. *Cancer* 2013;119:3584-3588.
- (40) Kinne DW. Staging and follow-up of breast cancer patients. *Cancer* 1991;67:1196-1198.
- (41) Pathmanathan N, Balleine RL. Ki67 and proliferation in breast cancer. *J Clin Pathol* 2013;66:512-516.
- (42) Hartog H, Wesseling J, Boezen HM, van der Graaf WT. The insulin-like growth factor 1 receptor in cancer: old focus, new future. *Eur J Cancer* 2007;43:1895-1904.

- (43) Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2008;8:915-928.
- (44) Happerfield LC, Miles DW, Barnes DM, Thomsen LL, Smith P, Hanby A. The localization of the insulin-like growth factor receptor 1 (IGFR-1) in benign and malignant breast tissue. *J Pathol* 1997;183:412-417.
- (45) Richards RG, DiAugustine RP, Petrusz P, Clark GC, Sebastian J. Estradiol stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor-1 receptor and insulin receptor substrate-1 in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:12002-12007.
- (46) Song RX, Zhang Z, Chen Y, Bao Y, Santen RJ. Estrogen signaling via a linear pathway involving insulin-like growth factor I receptor, matrix metalloproteinases, and epidermal growth factor receptor to activate mitogen-activated protein kinase in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 2007;148:4091-4101.
- (47) Giugliano D, De RN, Di MG *et al.* Metformin improves glucose, lipid metabolism, and reduces blood pressure in hypertensive, obese women. *Diabetes Care* 1993;16:1387-1390.
- (48) Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH *et al.* Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:3297-3302.
- (49) Kiderlen M, de Glas NA, Bastiaannet E *et al.* Diabetes in relation to breast cancer relapse and all-cause mortality in elderly breast cancer patients: a FOCUS study analysis. *Ann Oncol* 2013;24:3011-3016.
- (50) Bastiaannet E, Liefers GJ, de Craen AJ *et al.* Breast cancer in elderly compared to younger patients in the Netherlands: stage at diagnosis, treatment and survival in 127,805 unselected patients. *Breast Cancer Res Treat* 2010;124:801-807.
- (51) van de Water W, Markopoulos C, van de Velde CJ *et al.* Association between age at diagnosis and disease-specific mortality among postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer. *JAMA* 2012;307:590-597.
- (52) Bartlett JM, Ellis IO, Dowsett M *et al.* Human epidermal growth factor receptor 2 status correlates with lymph node involvement in patients with estrogen receptor (ER) negative, but with grade in those with ER-positive early-stage breast cancer suitable for cytotoxic chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007;25:4423-4430.
- (53) Paik S, Hazan R, Fisher ER *et al.* Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1990;8:103-112.
- (54) Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol* 1989;7:1120-1128.
- (55) Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P *et al.* Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006;354:809-820.
- (56) Romond EH, Perez EA, Bryant J *et al.* Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673-1684.
- (57) Chakrabarty A, Rexer BN, Wang SE, Cook RS, Engelman JA, Arteaga CL. H1047R phosphatidylinositol 3-kinase mutant enhances HER2-mediated transformation by heregulin production and activation of HER3. *Oncogene* 2010;29:5193-5203.
- (58) Hanker AB, Pfeifferle AD, Balko JM *et al.* Mutant PIK3CA accelerates HER2-driven transgenic mammary tumors and induces resistance to combinations of anti-HER2 therapies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:14372-14377.

- (59) Loibl S, von MG, Schneeweiss A *et al.* PIK3CA mutations are associated with lower rates of pathologic complete response to anti-human epidermal growth factor receptor 2 (her2) therapy in primary HER2-overexpressing breast cancer. *J Clin Oncol* 2014;32:3212-3220.
- (60) de AE, Procter MJ, van Veldhuisen DJ *et al.* Trastuzumab-associated cardiac events at 8 years of median follow-up in the Herceptin Adjuvant trial (BIG 1-01). *J Clin Oncol* 2014;32:2159-2165.
- (61) Nagayama A, Hayashida T, Jinno H *et al.* Comparative effectiveness of neoadjuvant therapy for HER2-positive breast cancer: a network meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2014;106.
- (62) Frank SA. 2007.
- (63) Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:820-823.
- (64) Ligibel J. Lifestyle factors in cancer survivorship. *J Clin Oncol* 2012;30:3697-3704.
- (65) Gomes AP, Price NL, Ling AJ *et al.* Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell* 2013;155:1624-1638.
- (66) Wu LE, Gomes AP, Sinclair DA. Geroncogenesis: metabolic changes during aging as a driver of tumorigenesis. *Cancer Cell* 2014;25:12-19.
- (67) Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002;2:38-47.
- (68) Clottes E. [Hypoxia-inducible factor 1: regulation, involvement in carcinogenesis and target for anticancer therapy]. *Bull Cancer* 2005;92:119-127.
- (69) Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* 2000;59:47-53.
- (70) Sun X, Vale M, Jiang X, Gupta R, Krissansen GW. Antisense HIF-1alpha prevents acquired tumor resistance to angiostatin gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2010;17:532-540.
- (71) Sun X, Kanwar JR, Leung E, Vale M, Krissansen GW. Regression of solid tumors by engineered overexpression of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and antisense hypoxia-inducible factor-1alpha. *Gene Ther* 2003;10:2081-2089.
- (72) Chen M, Zhang J, Manley JL. Turning on a fuel switch of cancer: hnRNP proteins regulate alternative splicing of pyruvate kinase mRNA. *Cancer Res* 2010;70:8977-8980.
- (73) Anastasiou D, Yu Y, Israelsen WJ *et al.* Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. *Nat Chem Biol* 2012;8:839-847.
- (74) Iqbal MA, Gupta V, Gopinath P, Mazurek S, Bamezai RN. Pyruvate kinase M2 and cancer: an updated assessment. *FEBS Lett* 2014;588:2685-2692.
- (75) Hubbard BP, Sinclair DA. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2014;35:146-154.
- (76) Israelsen WJ, Dayton TL, Davidson SM *et al.* PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells. *Cell* 2013;155:397-409.
- (77) Onnis B, Rapisarda A, Melillo G. Development of HIF-1 inhibitors for cancer therapy. *J Cell Mol Med* 2009;13:2780-2786.

LIST OF PUBLICATIONS

HIF1 α and its metabolic targets are highly expressed in breast tumors of patients of 65 years or older but not in patients younger than 65 years of age

Engels CC, Bochaton TG, Smit VTHBM, Kuppen PJK, van de Velde CJH, Sinclair DA, Liefers GJ

Article submitted

HIF1 α and PKM2 are important drivers of age associated clinical functional decline in the elderly breast cancer population: A FOCUS study analysis

Engels CC, de Glas NA, Davidson S, Bochaton TG, de Vizio D, Smit VTHBM, van de Velde CJH, Liefers GJ, Sinclair DA

Article submitted

The clinical value of HER-2 (ERBB2) overexpression and PIK3CA mutations in the older breast cancer population: A FOCUS Study analysis

Engels CC, Kiderlen M, Bastiaannet E, van Eijk R, Mooyaart A, Smit VTHBM, de Craen AJM, Kuppen PJK, Kroep JR, van de Velde CJH, Liefers GJ

Breast Cancer Res Treat. 2016 Apr;156(2):361-70

Validity of the online PREDICT tool in older patients with breast cancer: a population based study

de Glas NA, Bastiaannet E, Engels CC, de Craen AJM, Putter H, van de Velde CJH, Hurria A, Liefers GJ, Portielje JE

Br J Cancer. 2016 Feb 16;114(4):395-400

The clinical prognostic value of molecular intrinsic subtypes in older breast cancer patients: a FOCUS study analysis

Engels CC, Kiderlen M, Bastiaannet E, van Vlierberghe RLP, Smit VTHBM, Kuppen PJK, van de Velde CJH, Liefers GJ

Mol Oncol. 2016 Apr;10(4):594-600

The influence of Insulin-like Growth Factor 1-receptor expression and endocrine treatment on clinical outcome of postmenopausal hormone receptor positive breast cancer patients: A Dutch TEAM substudy analysis

Engels CC, Nienke A de Glas, Anita Sajet, Esther Bastiaannet, Vincent THBM Smit, Peter JK Kuppen, Caroline Seynaeve, Cornelis JH van de Velde, Gerrit Jan Liefers

Mol Oncol. 2016 Apr;10(4):509-16

Alternatively spliced Tissue Factor synergizes with the estrogen receptor pathway in promoting breast cancer progression

Kocatürk B, Tieken C, Vreeken D, Ünlü B, [Engels CC](#), de Kruijf EM, Kuppen PJ, Reitsma PH, Bogdanov VY, Versteeg HH

J Thromb Haemost. 2015 Sep;13(9):1683-93

Comment on: The prognostic significance of tumour-stroma ratio in oestrogen receptor-positive breast cancer

Mesker WE, Dekker TJ, de Kruijf EM, [Engels CC](#), van Pelt GW, Smit VT, Tollenaar RA

Br J Cancer. 2015 May 26;112(11):1832-3

Contralateral breast cancer risk in relation to tumor morphology and age-in which patients is preoperative MRI justified?

de Glas NA, [Engels CC](#), Bastiaannet E, van de Water W, Siesling S, de Craen AJM, van de Velde CJ, Liefers GJ, Merkus JW

Breast Cancer Res Treat. 2015 Feb; 150(1):191-8

The prognostic and predictive value of Tregs and tumor immune subtypes in postmenopausal, hormone receptor-positive breast cancer patients treated with adjuvant endocrine therapy: a Dutch TEAM study analysis

[Engels CC](#), Charehbili A, van de Velde CJH, Bastiaannet E, Sajet A, Putter H, van Vliet EA, van Vlierberghe RLP, Smit VTHBM, Bartlett JM, Seynaeve C, Liefers GJ, Kuppen PJK

Breast Cancer Res Treat. 2015 Feb;149(3):587-96

Prognostic value of HLA class I, HLA-E, HLA-G and Tregs in rectal cancer: a retrospective cohort study

Reimers MS, [Engels CC](#), Putter H, Morreau H, Liefers GJ, van de Velde CJH, Kuppen PJK

BMC Cancer. 2014 Jul 5;14:486

How does genomic-profiling impact surgery?

[Engels CC](#), Reimers MS, Kuppen PJK, van de Velde CJH, Liefers GJ

Nat Rev Clin Oncol. 2014 Oct 11(10):610-8

Immunological subtypes in breast cancer are prognostic for invasive ductal but not for invasive lobular breast carcinoma

[Engels CC](#), Fontein DBY, Kuppen PJK, de Kruijf EM, Smit VTHBM, Nortier JWR, Liefers GJ, van de Velde CJH, Bastiaannet E

Br J Cancer. 2014 Jul 29;111(3):532-8

Diabetes in relation to breast cancer relapse and all-cause mortality in elderly breast cancer patients: a FOCUS study analysis

Kiderlen M, de Glas NA, Bastiaannet E, [Engels CC](#), van de Water W, de Craen AJM, Portielje JE, van de Velde CJH, Liefers GJ

Ann Oncol. 2013 Dec; 24 (12):3011-6

The prognostic value of apoptotic and proliferative markers in breast cancer

[Engels CC](#), Ruberta F, de Kruijf EM, van Pelt GW, Smit VTHBM, Liefers GJ, Matsushima T, Shibayama M, Ishihara H, van de Velde CJH, Kuppen PJK

Breast Cancer Res Treat. 2013 Nov; 142(2):323-39

Tumor immune subtypes distinguish tumor subclasses with clinical implications in breast cancer patients

De Kruijf EM, [Engels CC](#), van de Water W, Bastiaannet E, Smit VTHBM, van de Velde CJH, Liefers GJ, Kuppen PJK

Breast Cancer Res Treat. 2013 Nov; 142 (2):355-64

Alternatively spliced tissue factor promotes breast cancer growth in a $\beta 1$ integrin-dependent manner

Kocaturk B, van den Berg YW, Tieken C, Mieog JS, de Kruijf EM, [Engels CC](#), van der Ent MA, Kuppen PJ, van de Velde CJ, Ruf W, Reitsma PH, Osanto S, Liefers GJ, Bogdanov VY, Versteeg HH

PNAS 2013 Jul 9; 110(28):11517-22

Cell size and velocity of injection are major determinants of the safety of intracranial stem cell transplantation

Janowski M, Lyczek A, [Engels CC](#), Xu J, Lukomska B, Bulte JW, Walczak P

Cereb Blood Flow Metab. 2013 Jun;33(6):921-7

Survival of Neural Progenitors Allografted into the CNS of Immunocompetent Recipients is Highly Dependent on Transplantation site.

Janowski M, [Engels CC](#), Gorelik M, Lyczek A, Bernard S, Bulte JW, Walczak P

Cell Transplant. 2013 Jan 2

Visualizing TGF- β and BMP signaling in human atherosclerosis: a histological evaluation based on Smad activation

van Dijk RA, [Engels CC](#), Schaapherder AF, Mulder-Stapel A, ten Dijke P, Hamming JF, Lindeman JH

Histol Histopathol. 2012 Mar;27(3):387-96

LIST OF CO-AUTHORS

John M.S. Bartlett, Ontario Institute for Cancer Research, Director of Transformative Pathology, Toronto, Canada

Esther Bastiaannet, Leiden University Medical Center, Department of Surgery and Department of Geriatrics and Gerontology, Leiden, the Netherlands

Thomas G. Bochaton, Université Claude Bernard Lyon, Faculté de Médecine, France, department of Cardiology & Glenn Labs for the Biological Mechanisms of Aging, Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, USA

Ayoub Charehbili, Leiden University Medical Center, Department of Surgery and Department of Clinical Oncology, Leiden, the Netherlands

Anton J.M. de Craen, Leiden University Medical Center, Department of Geriatrics and Gerontology, Leiden, the Netherlands

Shawn M. Davidson, Koch Institute for Cancer Research, Departments of Bioengineering and Pharmacology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA

Dolores Di Vizio, Children's Hospital Boston, Department of Surgery, Boston, USA

Ronald van Eijk, Leiden University Medical Center, Department of Pathology, Leiden, the Netherlands

Duveken B.Y. Fontein, Leiden University Medical Center, Department of Surgery, Leiden, the Netherlands

Nienke A. de Glas, Leiden University Medical Center, Department of Surgery, Leiden, the Netherlands

Hideki Ishihara, Sysmex Corporation, Central Research Laboratories, Kobe, Japan

Mandy Kiderlen, Leiden University Medical Center, Department of Surgery, Leiden, the Netherlands

Judith R. Kroep, Leiden University Medical Center, Department of Clinical Oncology, Leiden, the Netherlands

Esther M. de Kruijf, Leiden University Medical Center, Department of Surgery, Leiden, the Netherlands

Peter J.K. Kuppen, Leiden University Medical Center, Department of Surgery, Leiden, the Netherlands

Gerrit Jan Liefers, Leiden University Medical Center, Department of Surgery, Leiden, the Netherlands

Tomoko Matsushima, Sysmex Corporation, Life Science Business, Kobe, Japan

Antien Mooyaart, Leiden University Medical Center, Department of Pathology, Leiden, the Netherlands

Johan W.R. Nortier, Leiden University Medical Center, Department of Medical Oncology, Leiden, the Netherlands

Gabi W. van Pelt, Leiden University Medical Center, Department of Surgery, Leiden, the Netherlands

Hein Putter, Leiden University Medical Center, Department of Medical Statistics, Leiden, the Netherlands

Marlies S. Reimers, Leiden University Medical Center, Department of Surgery, Leiden, the Netherlands

Francesca Ruberta, Leiden University Medical Center, Department of Surgery, Leiden, the Netherlands

Anita Sajet, Leiden University Medical Center, Department of Surgery, Leiden, the Netherlands

Caroline M. Seynaeve, Erasmus Medical Center, Department of Oncology, Rotterdam, the Netherlands

Masaki Shibayama, Sysmex Corporation, Central Research Laboratories, Kobe, Japan

David A. Sinclair, Glenn Labs for the Biological Mechanisms of Aging, Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, USA & Department of Pharmacology, School of Medical Sciences, The University of New South Wales, Sydney, Australia

Vincent T.H.B.M. Smit, Leiden University Medical Center, Department of Pathology, Leiden, the Netherlands

Cornelis J.H. van de Velde, Leiden University Medical Center, Department of Surgery, Leiden, the Netherlands

Ronald L.P. van Vlierberghe, Leiden University Medical Center, Department of Surgery, Leiden, the Netherlands

E. Annelies van Vliet, Leiden University Medical Center, Department of Surgery, Leiden, the Netherlands

Willemien van de Water, Leiden University Medical Center, Department of Surgery, Leiden, the Netherlands

CURRICULUM VITAE

Charla Chábeli Engels was born on February 24th 1986 in Willemstad, Curaçao.

After graduating from the Peter Stuyvesant College in 2004, she moved to the Netherlands to commence with her medical studies at the Leiden University Medical Center. After completing her preclinical training in medicine, she started with her clinical rotations in December 2008. After receiving her medical degree in November 2010, she joined Professor Jeff Bulte's lab at the institute for cell engineering (ICE) at the Johns Hopkins University, School of Medicine in Baltimore, MD, USA. During her six-month research fellowship, she studied enhanced cerebral targeting of magnetically labelled glial precursor cells using the VLA-4/VCAM-1 adhesion pathway. In December 2011 she started with her PhD training at the department of Surgical Oncology at the Leiden University Medical Center in the Netherlands, under the supervision of Professor C.J.H. van de Velde, Dr. G.J. Liefers and Dr. P.J.K. Kuppen. During her graduate training Charla was able to join the laboratory of Professor David Sinclair at the Harvard Medical School in Boston, MA, USA. During this research fellowship she studied the role of HIF-1 α and its metabolic targets in geroncogenesis in breast cancer patients. The results of her studies are presented in this thesis and have been published in several international journals. After finalizing her graduate program, she started working at the department of Surgery of the Alrijne Hospital, Leiderdorp, under the supervision of Dr. A.M. Zeillemaker. In April 2016, Charla will start her residency training in Radiology at the MCH Westeinde hospital under the supervision of Drs. E.G. Coerkamp.

DANKWOORD

De totstandkoming van dit proefschrift heeft niet kunnen geschieden zonder de hulp en steun van een groot aantal mensen, waarvan ik er een paar in het bijzonder wil noemen.

Ten eerste Prof. Dr. C.J.H. van de Velde, het was een enorme eer en een waargenomen om deel te hebben mogen uitmaken van uw onderzoeksgroep. Dank voor uw vertrouwen en steun. Uw expertise op het gebied van de chirurgische oncologie is een inspiratie voor velen.

Dr. G.J. Liefers, beste GJ, je onuitputbaar enthousiasme en liefde voor de wetenschap zijn voor mij een groot voorbeeld. Dank voor deze mooie tijd.

Dr P.J.K. Kuppen, beste Peter, je interesse voor de tumorimmunologie is onmiskenbaar. Succes met de verdere wetenschappelijke ontrafeling.

Prof. D.A. Sinclair, dear David, thank you for believing in our project and the possibilities you have created for us at your renowned lab at the HMS. It has been an incredible experience for which I am forever grateful. Sinclair lab members, thank you for the warm welcome, patience, hard work, but above all, the fun times in Boston.

Mijn paranimfen Marlies en Marc; Marlies, wat heb jij een belangrijke stempel gedrukt op deze periode van mijn leven. Bedankt voor alle wijze woorden, intellectuele prikkeling maar bovenal gezelligheid en vriendschap van de afgelopen jaren. Ik ben ervan overtuigd dat ons eveneens gedeelde vervolgtraject ons nog meer plezier zal brengen. Marc, wat ben ik trots dat je tijdens de verdediging van mijn proefschrift aan mijn zijde staat. Vanaf het eerste moment dat ik voet op Nederlandse bodem heb gezet sta je altijd voor me klaar. Je doorzettingsvermogen om je doelen te realiseren zijn ook voor mij een drijfveer voor het maximale.

Lieve Gabi, dank voor de mooie tijd op de P-01. Het was een genoegen om de kamer met je te mogen delen. De vriendschap die hieruit is voortgekomen is blijvend.

Willemien, Esther de Kruijf, Mandy, Nienke, Marloes, Anne, Esther Bastiaannet, en alle andere collegae promovendi, heel veel dank voor de leuke samenwerking, welke geresulteerd heeft in mooie publicaties en jullie bijdrage aan de onvergetelijke herinneringen.

Lieve collega's van het Heelkunde laboratorium, zonder jullie hulp met het verzamelen, voorbereiden en opwerken van de duizenden weefselblokken van het FOCUS-cohort had dit proefschrift nooit gerealiseerd kunnen worden. Veel dank daarvoor.

Dank aan alle vrienden en familie, in Nederland en op Curaçao, in het bijzonder Ramon, Ivonne en Diane, voor hun steun.

Dear Becca, thank you for your support and 'gezelligheid'.

Opi en omi, het heeft niet zo mogen zijn. In gedachten zijn jullie erbij.

Liefste Ludo, ontzettend dankbaar ben ik voor je begrip, geduld en grenzeloze liefde van de afgelopen jaren.

Lieve mama en papa, dank voor jullie onvoorwaardelijke steun, geloof en vertrouwen in mij. Zonder jullie had ik dit proefschrift nooit kunnen realiseren.