



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Clinical applications of DNA methylation in gastrointestinal cancer

Maat, M.F.G. de

Citation

Maat, M. F. G. de. (2010, May 12). *Clinical applications of DNA methylation in gastrointestinal cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15373>

Version: Corrected Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/15373>

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

Samenvatting Nederlands

Biomarkers: voor inclusie en exclusie

Dit proefschrift heeft als onderwerp maagkanker en dikke darmkanker. Dikke darmkanker kan onderverdeeld worden in het colon carcinoom (vanaf de klep van Bauhin tot en met de S-bocht) en het rectum carcinoom (endeldarmkanker). Deze maligniteiten ontarden uit de cellen van het bekleedende slijmvlies van darm en maag en zijn de meest voorkomende vormen van kanker van het spijsverteringsstelsel. Zij zorgen voor een aanzienlijk deel van de kankersterfte, niet alleen in Nederland maar ook wereldwijd. Hiernaast vormen ze een grote belasting voor de Nederlandse gezondheidszorg en met het stijgen van de levensverwachting zal dit alleen maar toenemen. De enige kans op overleving in het overgrote deel van de gevallen bestaat uit het radicaal verwijderen middels open of laparoscopische buikchirurgie. Deze operaties kennen een niet gering risico op complicaties en sterfte. Deze risico's nemen toe bij oudere patiënten. Om de overlevingskansen van maag- en darmkankerpatiënten te vergroten worden behandelstrategieën steeds agressiever. Men moet dan bijvoorbeeld denken aan het wegnemen van meer omliggende structuren en klierweefsel tijdens de operatie of het toevoegen van radiotherapie en/of chemotherapie voor en/of na de operatie. Door middel van gerandomiseerde studies is aangetoond dat voorbehandelen met chemotherapie de overleving verbetert in aanvulling op een radicale chirurgische verwijdering van maagkanker. Zo ook resulteert het voorbestralen van rectum tumoren in combinatie met het ruimer wegnemen van omgevend vet en bindweefsel tijdens de operatie in een aanzienlijke afname van een recidief tumor lokaal in het geopereerde gebied. De toegevoegde morbiditeit van deze aanvullende behandelingen treffen veel patiënten en komt wederom vaker voor bij de oudere patiënt. Voorbehandelen met chemo- en/of radiotherapie vergroot eveneens het risico op complicaties van de operatie en vermindert de kans op een volledig herstel. De data van klinische studies die chirurgie in combinatie met een aanvullende behandeling vergelijken met chirurgie alleen laten ook zien dat een aanzienlijk deel van de patiënten gebaat zouden zijn bij alleen een operatie. Dit wijst erop dat deze nabehandeling, oftewel adjuvante therapie vaak een overbehandeling is. Een betere inschatting van de agressiviteit van maag- en darmtumoren in aanvulling op de huidige stadiëringsmethoden is daarom een belangrijk onderwerp om patiënten te kunnen selecteren die ook daadwerkelijk baat hebben bij een agressievere behandeling. De huidige belangrijkste voorspeller van overleving van maag- en dikke darmtumoren is het al dan niet vinden van uitzaaiingen in de regionale lymfeklieren. De voordelen van verbeterde risico-inschatting in aanvulling op deze parameter zijn tweeledig. Aan de ene kant zouden hoog-risico, klier-negatieve patiënten geïncludeerd kunnen worden in trials om het nut van aanvullende therapie te testen. Aan de andere kant zouden laag-risico, klier-negatieve en mogelijk ook klier-positieve patiënten geëxcludeerd kunnen worden van morbiditeit- en mortaliteit verhogende aanvullende therapie.

Het is bekend dat voorbehandelen (neoadjuvant) de uitkomst van ziekte van endeldarmkanker en maagkanker na radicale chirurgie verbetert, is het dus ook van belang om de risico-inschatting voorafgaand aan de operatie te kunnen doen. Beeldvormende technie-

ken zoals CT-, MRI- en PET/CT-scans zijn van grote waarde bij het opstellen van een individueel toegespitst behandelplan. Bijvoorbeeld voor metastaseringsonderzoek of voor het identificeren van “locally advanced, T3/4” rectum tumoren. Deze onderzoeken worden gebruikt om zo goed mogelijk het TNM-stadium in te schatten vóór de operatie. De N-stadiëring die de belangrijkste voorspeller is, kan echter niet met 100% betrouwbaarheid worden bepaald met de huidige beeldvorming en met name niet in het geval van maag- en coloncarcinomen. Moleculaire kenmerken van de primaire tumor op DNA niveau zijn een aantrekkelijk preoperatief diagnosticum omdat deze bepaald kunnen worden in tumorbiopsen verkregen met scopisch onderzoek die horen bij het standaard diagnostisch proces. DNA kenmerken zijn verder aantrekkelijk vanwege de chemische stabiliteit van het molecuul waardoor slechts een minimale hoeveelheid weefsel nodig is.

Epigenetica

De voltooiing van het “human genome project” in 2003 dat de nucleotide-volgorde van het menselijk genoom in kaart bracht was een mijlpaal in de wetenschap. Echter is de functie van slechts 5-10% van het genoom bekend. De term “voltooiing” van dit project kan daarom misleidend genoemd worden. De resterende 90-95% van het genoom is lange tijd “junk DNA” genoemd, een term geïntroduceerd in 1972 door Susumu Ohno. De verborgen complexiteit van het menselijk genoom werd nog eens benadrukt na de ontcijfering van volledige genomen van andere levensvormen die gezien worden als minder complex. Het genoom van een fruitvlieg (*Drosophila Melanogaster*) heeft bijvoorbeeld een geschat aantal van 27.463 coderende genen vergeleken met de 31.896 bij de mens (*Homo Sapiens*). Dit relatief kleine verschil wijst er op dat in het onbegrepen deel “junk DNA” belangrijke elementen verborgen moeten liggen die het verschil maken tussen een mens en een fruitvlieg. Het verschil van minder dan 9 percent laat dus zien dat het aantal genen van ondergeschikt belang is. Activering, interactie en modulatie van expressie van genen is dan ook cruciaal voor de vorming van gedifferentieerde cellen en de onderlinge communicatie tussen gedifferentieerde celstructuren binnen en tussen orgaansystemen. Het zich ontwikkelende gebied van epigenetica heeft aangetoond een zeer belangrijke rol te hebben in gen regulatie. De laatste definitie van epigenetica is dat dit overerfbare elementen zijn van cel op cel, en soms van generatie op generatie, die geen betrekking hebben op veranderingen in de onderliggende DNA volgorde. Een belangrijk DNA regulerend element is methylgroep plaatsing op cytosine-guanine dinucleotiden oftewel DNA methylering. Enkele belangrijke fenomenen kunnen inmiddels verklaard worden door DNA methylering. Bijvoorbeeld: X-chromosoom inactivatie, cel differentiatie, DNA stabilisatie en specifieke gen inactivatie bij kanker. Veranderingen in DNA methylering worden meer/vaker gezien in kankercellen in vergelijking met gezonde cellen. DNA methylering is zelfs meer afwijkend in kankercellen dan het DNA zelf. De klinische betekenis van veranderingen in DNA methylering in kanker vormen een onderwerp van veel studies.

Het doel van de studies beschreven in dit proefschrift is om de rol van DNA methylering te bestuderen in maag-, colon- en rectumcarcinomen. En meer specifiek om te exploreren of deze epigenetische elementen in de primaire tumor gebruikt kunnen worden als markers om de multidisciplinaire therapie verder te kunnen sturen. Het gaat hierbij niet

alleen om patiënten te kunnen includeren die baat zullen hebben van meer agressieve behandeling, maar het gaat er ook om patiënten te kunnen excluderen van onnodig belastende therapie.

De Nederlandse Trials

In Nederland bestaat een uitstekende infrastructuur om multicenter studies uit te voeren bij kankerpatiënten. Een samenwerkingsverband van chirurgisch oncologen startte in 1989 een gerandomiseerde trial naar chirurgie voor maagcarcinoom die twee niveaus van lymfeklierdissectie met elkaar vergeleek. Deze succesvolle trial leidde tot meer studies en multidisciplinaire uitbreiding van de samenwerking. Het resulteerde in de oprichting van de “Dutch Colorectal Cancer Group” (DCCG). Vandaag de dag is de DCCG een landelijk samenwerkingsverband tussen medische disciplines (o.a. chirurgen, radiotherapeuten, internist-oncologen, pathologen, radiologen en gastro-enterologen) en is betrokken bij de diagnose en behandeling van colorectale en maagtumoren. Dit proefschrift bevat enkele studies waarbij gebruik werd gemaakt van weefsel van primaire tumoren van patiënten die deelnamen in twee grote trials gecoördineerd door de DCCG. Ten eerste, de zogenaamde D1D2 gerandomiseerde chirurgische trial voor patiënten met maagcarcinoom (zie hierboven) met meer dan 700 geïncludeerde patiënten. Deze trial is mogelijk de grootste prospectief verzamelde Westerse populatie van patiënten met maagcarcinoom met follow-up data gemiddeld tot 14 jaar postoperatief. Ten tweede, de zogenaamde TME trial voor patiënten met rectum carcinoom die totale mesorectale excisie (TME) chirurgie met en zonder vooraf radiotherapie vergeleek. Deze trial is één van de grootste studies specifiek naar rectumcarcinoom met protocollen om de chirurgische procedure en het pathologisch diagnostisch proces te controleren. De kwaliteit van studies die gebruik maken van humaan materiaal om klinische waarde van biomarkers te evalueren staat of valt met de oorsprong van de patiëntgroep. Prospectieve verzameling, uniforme behandeling, uniforme diagnostiek en uniforme follow-up zijn van groot belang voor andere onderzoekers om de resultaten te kunnen interpreteren. De kwaliteit en omvang van de D1D2 en TME trial heeft dus in belangrijke mate bijgedragen aan de resultaten beschreven in dit proefschrift.

Sectie I: Technische verbeteringen.

Het proefschrift is verdeeld in twee secties. De eerste sectie behelst vier studies die gaan over technische verbeteringen bij de analyse van DNA methylering in weefselcoupes afkomstig van gearhiveerd, met paraffine gefixeerd tumor materiaal. Dit paraffine materiaal was de beschikbare bron van de DCCG trial patiënten. Gewoonlijk wordt voor een initiële bepaling van de waarde van biomarkers paraffine materiaal gebruikt. Simpelweg omdat vele coupes van enkele micrometers dik gesneden kunnen worden en het weefsel makkelijk toegankelijk ligt opgeslagen in de archieven van de patholoog. Verder geven paraffine coupes het voordeel van direct visualisatie van de histopathologie. Een probleem is dat de meest toegepaste techniek voor analyse van DNA methylering gebruikt maakt van langdurige incubaties met DNA degraderende chemicaliën (sodium bisulfit modificatie oftewel SBM). Daarnaast resulteren DNA isolatie- en zuiveringsmethoden in verlies van veel DNA. Veel studies beschrijven dan ook het gebruik van grote hoeveelheden startmateriaal bestaande uit meerdere gehele coupes of zelfs blokjes tumorweefsel. Dit compromit-

teert het detail van het startmateriaal en verhoogd de kans op contaminatie met gezond weefsel. In sectie I worden twee technieken beschreven die het mogelijk maken om DNA methylering te bepalen in een minimale hoeveelheid startmateriaal zoals 1-2 vierkante millimeter van een 7 micrometer dikke weefselcoupe of van enkele duizenden cellen geïsoleerd door middel van laser capture microscopie. Hiermee kan dus in potentie DNA methylering vergeleken worden tussen vroege dysplastische cellen in een crypte van het colon slijmvlies met de gezonde gedifferentieerde cellen van de aanliggende villus.

Hoofdstuk één beschrijft een nuttig protocol voor onderzoekers die methylering-specifieke polymerase chain reaction (PCR) technieken gebruiken of afgeleiden daarvan. Het protocol behelst de synthese van compleet ongemethyleerd humaan genomisch materiaal dat niet voorkomt in de natuur. Dit DNA kan gebruikt worden als een negatieve controle in PCR reacties om de methyleringsstatus te testen van iedere gewenste regio van het genoom.

Hoofdstuk twee test de behandeling van coupes gedeparaffiniseerd weefsel op glaasjes **direct** met sodium bisulfiet, zogenaamd on-slide sodium bisulfiet modificatie (SBM). Resultaten laten zien dat deze behandeling van het ruwe DNA, nog opgeslagen in de cellen (*in situ*), dezelfde resultaten heeft als wanneer van geïsoleerd DNA opgelost in water gebruik wordt gemaakt. Omdat de isolatie- en zuiveringstappen overgeslagen kunnen worden resulteert onslide-SBM in een veel hogere DNA opbrengst voor verdere PCR analyse. Als toepassing van deze bevinding wordt aangetoond dat DNA methylering van kleine stukjes weefsel van 1-2 vierkante millimeters van één enkele coupe paraffine materiaal met elkaar vergeleken kan worden. Als voorbeeld was in een colon tumor de promotor-regio van een belangrijk tumor-gerelateerd gen gemethyleerd in carcinoomateus weefsel en ongemethyleerd in het aanliggend weefsel met daarin benigne voorloper cellen. Dit soort analyses waren voorheen moeilijk uitvoerbaar en onslide-SBM maakt dit aanzienlijk eenvoudiger.

Hoofdstuk drie beschrijft een kwantitatieve PCR techniek genaamd AQAMA (absolute quantitation of methylated alleles). Onze onderzoeksgroep gebruikte hiervoor klassieke methylerings-specifieke PCR met capillaire array elektroforetische analyse van de PCR producten (CAE-MSP) die slechts semi-kwantitatief is. Als toepassing werd AQAMA gecombineerd met *in situ*, on-slide SBM. DNA methylerings-gehalten van specifieke genomische loci kunnen nu vergeleken worden met histopathologisch verschillende weefselstukjes van dezelfde paraffine coupe in plaats van met een dichotome uitkomst: gemethyleerd of ongemethyleerd. De resultaten lieten significante verschillen zien in gehalte DNA methylering van methylated-in-tumor (MINT) loci tussen colon adenomateus en carcinoomateus weefsel. De bevindingen illustreren het belang van bepaling van het methylerings-gehalte in plaats van methylerings-status.

Hoofdstuk vier gaat over de zogenaamde “on-cap SBM” van DNA die de eerdere *in situ* behandeling van een weefselcoupe op een glaasje (on-slide) integreert met laser-capture microscopie. Met deze techniek kunnen individuele cellen of groepen cellen van een paraffine coupes geïsoleerd worden. On-cap SBM verbetert dus het detail van DNA methylering analyse van kleine stukjes weefsel van een paraffine coupe naar individuele cellen. Als toepassing werd het methyleringsgehalte van DNA repetitieve elementen (long-interspersed-nucleotide-elements oftewel LINE-1) gemeten met AQAMA en vergeleken met colon kankercellen van de lumenale zijde van een tumor en de kankercellen geïsoleerd van

het invasieve front. Het belangrijkste voordeel van on-cap SBM is dat het contaminatie met fibroblasten, lymfocyten en ander stromale componenten tot een minimum beperkt.

Bij elkaar beschrijven de studies van Sectie I niet alleen nuttige technieken maar ook hun toepassing en dat ze nieuwe vormen van DNA methylering-analyses mogelijk maken. Daarbij komt dat AQAMA gecombineerd met on-slide SBM een geschikte techniek is voor de analyse van het primaire tumor materiaal van grote patiëntengroepen van de DCCG trials.

Sectie II: Klinische toepassing

Na robuuste en “high-throughput” technieken te hebben ontwikkeld voor paraffine materiaal is er gestart met de analyse van tumor materiaal van patiënten van de D1D2 en TME trial.

De behandeling van maagkanker staat weer meer in de belangstelling omdat recent is aangetoond dat chemotherapie voorafgaand aan chirurgie de overleving verbeterd. Deze ontwikkeling schept een behoefte aan het ontwikkelen van voorspellende, preoperatief te bepalen biomarkers, om risico-inschatting van patiënten met maagcarcinoom te verbeteren. Zo kan wellicht de chemotherapie toegespitst worden op patiënten met een meer agressieve ziekte. Het maagcarcinoom is bekend om zijn infiltrerende, infectieuze component waarbij door de tumor tot expressie gebrachte enzymen, die de ontstekingsreactie van het lichaam kunnen reguleren, mogelijk een belangrijke rol spelen. Eerdere studies laten zien dat de expressie van *cyclooxygenase 2 (COX-2)*, welke een sleutelrol speelt in het inflammatoire proces, wordt gereguleerd door DNA methylering van zijn promotor regio in maagcarcinoom. Andere studies hebben laten zien dat patiënten met maagtumoren met een hoge expressie van *COX-2* een slechtere overleving hebben.

Hoofdstuk vijf beschrijft de resultaten van een studie met als hypothese dat de promotor regio DNA methylerings-status van *COX-2* in primaire tumor cellen een voorspeller is van de ziekteoverleving van maagkanker. In twee onafhankelijke trial patiënt groepen met een mediane follow up van twaalf jaar na chirurgie kon worden aangetoond dat *COX-2* methylering een voorspeller van ziekte recidief en overleving is onafhankelijk van alle bekende prognostische factoren zoals lymfeklier metastasen. *COX-2* activiteit in maagkanker kan worden bepaald met kleuring van tumorweefsel coupes met een specifiek antilichaam. Deze immunohistochemische techniek heeft als nadeel bij maagkanker (bekend om zijn moeilijke histopathologie) dat er een inter-individuele bias ontstaat bij het scoren van de mate van aankleuring onder de microscoop. De resultaten van de studie suggereren dus dat bepaling van de eiwit expressie door middel van immunohistochemie van genen zoals *COX-2*, die gereguleerd worden door DNA methylering, vervangen kan worden door een geautomatiseerde, operatoronafhankelijke PCR test. Verder bestaan er geneesmiddelen die specifiek *COX-2* remmen en deze worden gebruikt als analgetica bij reumatische aandoeningen. De toepassing van *COX-2* remmers ter voorkoming van darmpoliepen is onderzocht en laat een gunstig effect zien. Onze resultaten toonden aan dat er een correlatie bestaat tussen de *COX-2* methylerings test en de *COX-2* eiwit expressie. Mogelijke kan deze test dus gebruikt worden om patiënten te selecteren die baat hebben bij een therapie met *COX-2* remmers. Dit is van belang omdat cardiovasculaire bijwerkingen in een klein percentage van de behandelde patiënten is aangetoond.

In de **hoofdstukken zes en zeven** worden de bevindingen beschreven van twee studies naar de klinische toepassing van kwantitatieve DNA methyleringsanalyse bij patiënten met rectumcarcinoom. Rectum tumoren vormen klinisch een aparte groep van dikke darm tumoren. Het belangrijkste verschil is de nauwe anatomische relatie door de fixatie van het rectum in het kleine bekken vergeleken met het colon proximaal van de omslagplooï. Dit maakt een radicale chirurgische resectie tot een grotere uitdaging. Rectumtumoren hebben dan ook een groter risico op lokaal recidief, zelfs in vroege stadia. Dit risico neemt toe naarmate de tumoren dichterbij de anus gelokaliseerd zijn. De fixatie van het rectum in het kleine bekken maakt het toepassen van externe radiotherapie mogelijk hetgeen niet mogelijk is in het mobiele colon. De hierboven genoemde DCCG trial voor rectumcarcinoom evalueerde een chirurgische techniek genaamd Totale Mesorectale Excisie (TME) wel of niet voorafgegaan door een korte kuur radiotherapie. TME chirurgie is een rectumextirpatie met en-bloc resectie van het omliggende rectale vet welke gebruikt maakt van de mesorectale posterieure fascia als een anatomische scheidingsvlak met sparen van de sacrale zenuwen. Voor de introductie van TME chirurgie door Bill Heald in de vroege jaren tachtig van de vorige eeuw was het stomp vrijprepareren posterieur van het rectum (vaak met de hand) gebruikelijk. Deze techniek resulteerde in 20-25% lokaal recidief. De TME trial liet echter een forse afname zien van deze belangrijke morbiditeit veroorzakende parameter van 10% lokaal recidief na TME chirurgie alleen. En nog een significante verdere reductie naar 4% met de toevoeging van preoperatieve radiotherapie. Ondanks deze belangrijke verbetering verschilde de algehele overleving 6 jaar na de operatie niet tussen de twee groepen en lieten deze analyses zien dat overleving wordt bepaald door het optreden van uitzaaiingen op afstand.

AQAMA tests werden ontwikkeld om het methyleringsgehalte te bepalen van zeven verschillende MINT loci in DNA gelokaliseerd op zeven verschillende chromosomen. Deze MINT loci werden ontdekt als gehypermethyleerd in een genoom-wijde screen van een bekende coloncarcinoom cellijn vergeleken met gezond DNA. MINT loci zijn zogenaamde CpG eilanden van niet coderende gebieden DNA en hadden tot zover bekend geen functie. MINT loci zijn echter door diverse onderzoeksgroepen bestudeerd in maag- en darmkanker en bleken wel van klinische waarde te zijn. In onze studie werd allereerst het DNA methyleringsgehalte van de MINT loci onderzocht in tumorweefsel en aangrenzend adenomateus en normaal weefsel. Dit liet zien dat toename van MINT methylering vroeg optreedt in rectale carcinogenese, met de grootste toename tijdens adenomateuze verandering van normaal weefsel in vergelijking met carcinomateuze verandering van adenomen. De distributie van de gemeten MINT methyleringsgehalten in tumoren en adenomen was niet normaal en dit wees erop dat de data gebruikt konden worden voor clusteranalyse. Vervolgens werd in primair tumorweefsel van meer dan 300 patiënten van de chirurgie arm van de TME trial methyleringsgehalte bepaald van de zeven MINT loci met AQAMA. Deze data werden geanalyseerd met een ongesuperviseerde clustermethode om patronen te identificeren zonder bias. De resultaten lieten zien dat MINT loci 3 en 17 een sterke negatieve correlatie met elkaar hadden en op basis van deze twee biomarkers konden de patiënten ingedeeld worden in duidelijk te onderscheiden groepen zonder overlapping.

Hoofdstuk zes rapporteert de bevinding dat deze onderverdeling een groep van vroeg stadium rectum carcinoom patiënten identificeert van ongeveer 25% van het totaal. Deze patiënten hadden significant meer risico om levermetastasen te ontwikkelen en hadden een kortere overlevingstijd na curatieve chirurgie.

In **hoofdstuk zeven** wordt beschreven dat dezelfde groep patiënten met een hogere kans op uitzaaiingen op afstand een significant lagere kans hadden op lokaal recidief. De DCCG heeft in publicaties met TME trial data laten zien dat patiënten die vooraf bestraald werden meer kans hadden op fecale incontinentie, seksuele disfunctie, vertraagde wondgenezing en verminderd kwaliteit van leven na chirurgie. Het percentage lokaal recidief van de overige 75% van de patiënten was significant hoger vergeleken met bestraalde patiënten uit de TME trial terwijl van de andere 25% dit iets lager was (niet significant). Dit suggereert dat een kwart van de patiënten met rectumcarcinoom, geïdentificeerd door middel van AQAMA van MINT 3 en 17, veilig geëxcludeerd kunnen worden van morbiditeit verhogende preoperatieve bestraling.

Bij elkaar beschrijven **hoofdstuk zes** en **zeven** de identificatie van een groep bestaande uit ongeveer een kwart van de patiënten met rectumcarcinoom welke een significant hoger risico heeft op het ontwikkelen van afstandsrecidief en een significant lager risico op het ontwikkelen van lokaal recidief. In veel biomarker studies worden groepen gevormd door middel van een afkappunt bij een mediane waarde van een normaal verdeling. Omdat de meeste waarden liggen rondom de mediaan leiden dit soort afkappmethoden tot een slechte scheiding van de groepen. Een belangrijk gegeven is dat de groep in onze studie werd herkend door een onge-superviseerde clustermethode zonder bias en dat de clusters geen overlap met elkaar hebben. Onze studie is de eerste die laat zien dat kwantitatieve epigenetische biomarkers specifiek in rectumcarcinomen de multidisciplinaire behandeling kunnen sturen in de richting van controle op afstands- of lokaal recidief, zelfs bij tumoren in een vroeg stadium.

Het laatste **hoofdstuk acht** richt zich op voorloper laesies zoals poliepen en adenomen van dikke darmkanker. Er wordt gebruik gemaakt van de technieken beschreven in hoofdstuk twee en drie (onslide SBM en AQAMA) en laat de meerwaarde zien van meer gedetailleerde analyses. Ongeveer de helft van de rechtzijdige coloncarcinomen hebben een aangeast DNA “mismatch repair (MMR)” systeem dat wordt veroorzaakt door epigenetische afschakeling van het *human mut-l-homologue (hMLH1)* MMR gen door DNA methylering van de promoter regio. Het falende MMR systeem resulteert in verkorting van zogenaamde microsatelliet regio's hetgeen eenvoudig bepaald kan worden door middel van PCR techniek. MMR aangedane tumoren worden ook wel microsatelliet instabiel genoemd. Het is aangetoond dat de epigenetische afschakeling van *hMLH1* een onderdeel is van een genoom wijd toegenomen methylering van promoter regio's en ook van MINT loci. We onderzochten in **hoofdstuk acht** de hypothese dat methyleringsgehalte van MINT loci verhoogd is in voorloper laesies van microsatelliet instabiele tumoren. De resultaten laten zien dat AQAMA van specifieke MINT loci adenomen kunnen identificeren die zich zullen ontwikkelen tot een microsatelliet instabiel colon carcinoom. Deze bevinding is biologisch relevant omdat het laat zien dat epigenetische veranderingen ontstaan in de vroegste fase van colorectale tumorvorming waarin histopathologisch slechts polypeus weefsel met laag tot gemiddelde dysplasie is te zien. Deze veranderingen leiden veel later tot een apart fenotype darmkanker.

Een mogelijke klinische toepassing is dat sommige MINT markers gebruikt kunnen worden als onderdeel van een panel om fecaal DNA te screenen om patiënten te selecteren voor colonoscopie. Verder is bekend dat microsatelliet instabiele tumoren anders reageren op chemotherapie. Het veel gebruikte 5-fluorouracil is bijvoorbeeld minder effectief in deze tumoren, echter reageren ze beter op bijvoorbeeld irinotecan. Preventieve specifieke behandelstrategieën zijn dan ook denkbaar bij patiënten bij wie met colonoscopie veel poliepen met hoge MINT locus DNA methylering worden gevonden. Verder is bekend dat bij patiënten met microsatelliet instabiele tumoren zogenaamde frameshift peptiden detecteerbaar zijn. Deze peptiden kunnen middels antilichamen een immuunreactie van het lichaam tegen de tumorcellen opwekken. Poliepvormende patiënten met hoge DNA MINT locus methylering in hun adenomen kunnen dan ook mogelijk baat hebben van vaccinatie studies.

De toekomst

Dit proefschrift beschrijft verbeteringen van moleculaire technieken voor bestudering van DNA methylering en beschrijft toepassingen van deze technieken om biomarkers te identificeren die potentieel de behandeling verbeteren van patiënten met maag-, colon- en rectumcarcinoom. Bij de studie naar *COX-2* methyleringsstatus als prognostische marker bij maagcarcinoom werd ook de volgende stap gezet, namelijk validatie in een tweede onafhankelijke groep patiënten eveneens afkomstig van een gerandomiseerde klinische studie. Het is nu mogelijk een klinische trial te ontwerpen waarbij als volgt kan worden gerandomiseerd: patiënten waarvan het preoperatief tumor biot een gemethyleerd *COX-2* gen laat zien worden direct geopereerd zonder perioperatieve therapie terwijl de patiënten met een ongemethyleerd *COX-2* gen neoadjuvant behandeld zullen worden. Aan de hand van de resultaten van de CRITICS trial kan dan worden besloten om *COX-2* ongemethyleerde en/of klier positieve tumoren dan adjuvant te behandelen met chemo-radiotherapie. De primaire uitkomstmaat van de studie zou moeten zijn dat klier-negatieve, *COX-2* gemethyleerde tumoren behandeld met chirurgie alleen een niet significant verschillende overleving hebben vergeleken met de wel aanvullend behandelde patiënten.

Toekomstige studies die verder gaan met MINT3 en MINT17 als biomarkers in rectumcarcinoom dienen zich allereerst te richten op de validatie in een onafhankelijke groep patiënten behandeld met en zonder preoperatieve radiotherapie. Indien de voorspellende waarde voor afstands- en lokaal recidief kan worden bevestigd dan kan de volgende trial worden ontworpen; Allereerst wordt de MINT3 and MINT17 methylerings index bepaald in weefsel van het preoperatieve tumorbiot. Indien er sprake is van een non-locally advanced tumor zoals bepaald per MRI onderzoek ondergaat ongeveer 25 procent van de patiënten van het specifiek risicocluster TME chirurgie zonder voorbestraling maar wel met postoperatieve systemische chemotherapie. Alle locally advanced tumoren ondergaan de meer uitgebreide neoadjuvante behandeling en afhankelijk van de MINT3 en MINT17 methyleringsstatus al dan niet adjuvante therapie. De andere 75% van de non-locally advanced patiënten ondergaan 5x5Gy preoperatieve radiotherapie gevolgd door TME chirurgie. De uitkomsten van de SCRIPT trial kunnen verder bepalen of patiënten met lymfekliermetastasen of zonder lymfekliermetastasen waarvan de tumor door de hele darmwand groeit nog verder baat zullen hebben van nabehandeling met het goed verdraagbare oraal in te nemen Xeloda (5-fluorouracil).