



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Clinical application of biomarkers in colon cancer : studies on apoptosis, proliferation and the immune system

Zeestraten, E.C.M.

Citation

Zeestraten, E. C. M. (2014, September 17). *Clinical application of biomarkers in colon cancer : studies on apoptosis, proliferation and the immune system*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/28735>

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/1887/28735>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/28735> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Zeestraten, Eliane

Title: Clinical application of biomarkers in colon cancer : studies on apoptosis, proliferation and the immune system

Issue Date: 2014-09-17

CHAPTER 11

Nederlandse samenvatting

De afgelopen jaren is er veel aandacht besteed aan de vroegtijdige opsporing en behandeling van het coloncarcinoom. En niet onterecht. Dikkedarmkanker heeft een belangrijke impact op de volksgezondheid met wereldwijd jaarlijks ruim 1 miljoen nieuwe patiënten bij wie de ziekte wordt vastgesteld (1, 2). Daarbij overlijden er per jaar nog altijd meer dan een half miljoen mensen aan de gevolgen van deze ziekte. De oorzaak van overlijden is vaak het gevolg van uitzaaiingen op afstand (metastasen), zoals naar de lever (1).

Dankzij ontwikkelingen in de wetenschap, die hebben geleid tot o.a. eerdere diagnose en betere behandeling, is de overleving van mensen, bij wie deze ziekte de afgelopen 10 jaar werd vastgesteld, toegenomen. Desondanks valt er nog veel winst te behalen. De basis van de behandeling van het coloncarcinoom blijft chirurgische resectie van de primaire tumor. Echter, sinds het begin van de jaren '90 is het duidelijk geworden dat, wanneer er sprake is van uitzaaiing naar lokale lymfeklieren, er na resectie een belangrijke rol is weggelegd voor nabehandeling met chemotherapie. Het is op dit moment standaardprotocol om alle stadium III patiënten deze adjuvante therapie aan te bieden. In tabel 1 wordt weergegeven hoe deze indeling in stadia voor dikkedarmtumoren werkt. Deze nabehandeling, ook wel adjuvante chemotherapie genoemd, heeft geleid tot een daling van het risico op terugkeren van de ziekte: voor metastasering op afstand in deze patiëntengroep tot 30%, en een verlaging van het overlijdensrisico naar 32% (3).

Bij stadium II patiënten is nabehandeling met chemotherapie controversieel. Voor een kleine groep stadium II patiënten is bewezen dat zij een grote kans hebben op het ontwikkelen van metastasen op afstand (met name naar de lever) wat natuurlijk zeer nadelige gevolgen heeft voor de overleving van deze patiënten. Deze patiënten zouden dus profijt kunnen hebben van een standaard nabehandeling met chemotherapie (4), ware het niet dat deze behandeling gepaard gaat met een hoge mate van morbiditeit. De algemene opvatting is dan ook dat het standaard nabehandelen van alle stadium II patiënten, waarvan een groot deel zonder behandeling nooit uitzaaiing op afstand zou ontwikkelen, niet opweegt tegen de risico's van deze, in de meeste gevallen dus onnodige, behandeling (5).

Vanwege de potentiële overlevingswinst in de selecte groep stadium II patiënten die uitzaaiingen ontwikkelt, is er de afgelopen jaren veel aandacht besteed aan het identificeren van deze patiënten. De American Society of Clinical Oncology (ASCO) heeft in 2004 een aanbeveling gedaan waarin een aantal criteria zijn opgesteld die artsen moet helpen deze hoogrisicogroep stadium II colonkankerpatiënten te identificeren (6). Het gaat dan om patiënten waarbij bij pathologisch onderzoek minder dan 12 lymfeklieren in het resectiepreparaat worden aangetroffen, patiënten waar bij de tumor reeds tot in de buitenwand van de darm (T4-tumoren genoemd) is gegroeid of waarbij deze al geperforeerd is door de darmwand heen bij diagnose, patiënten waarvan de tumor slecht gedifferentieerd is, of patiënten waarbij de tumor ingroei laat zien in de kleine bloed- en of lymfevaten of rondom de zenuwbanen bij pathologisch onderzoek. Uit onderzoek binnen een database, waarin vrijwel alle patiënten zijn geregistreerd, die in 2010 in Nederland aan een coloncarcinoom werden geopereerd (uitgevoerd door de DSCA, de Dutch Surgical

Tabel 1

Indeling van dikkedarmtumoren naar ziektestadium op basis van de TNM 5 criteria uit 1997

Stadium	T	N	M
I	1-2	0	0
II	3-4	0	0
III	1-4	+	0
IV	1-4	+	+

Het TNM classificatiesysteem van maligne tumoren is ontwikkeld door de International Union Against Cancer (UICC) en wordt wereldwijd gebruikt voor de classificatie van dikkedarmtumoren. De T staat voor tumor en beschrijft de lokale uitbreiding. T1 betekent groei van de tumor tot in de submucosa, het slijmvlies van de darm, maar er niet doorheen. T2 staat voor tumorgroei tot in de spierlaag van de darm, de muscularis propria, maar er niet doorheen. De T3 codering wordt gebruikt als de tumor doorgroeit tot in de buitenlaag van de darm, de subserosa of in het omliggend vet en een tumor wordt als T4 gecodeerd als deze ingroeit in omgevende organen of door het buikvlies heen. De N staat voor mate van metastasering naar lymfeklieren. Een N0 codering betekent dat er geen sprake is van kliermetastasen, een N+ codering geeft aan dat dit wel het geval is. De M staat voor metastase op afstand. De code M0 betekent dat er geen sprake is van metastasering op afstand, M+ betekent dat de tumor of afstand gemetastaseerd is bijvoorbeeld naar de lever of long.

Colorectal Audit), blijkt dat 37% van de colonkankerpatiënten werden geopereerd in verband met een stadium II tumor (7). Van deze patiënten werd 13% op basis van de ASCO-criteria ingeschat als hoog risico. Opvallend genoeg werd slechts 18% van deze hoogrisicopatiënten daadwerkelijk nabehandeld met chemotherapie ondanks dat de criteria van de ASCO op dat moment al als aanbeveling waren opgenomen in de landelijke richtlijn 'behandeling van dikkedarmkanker' welke is na te lezen op www.oncoline.nl. We kunnen dus concluderen dat de nabehandeling met chemotherapie van hoogrisico stadium II patiënten in Nederland nog niet tot de standaard hoort. Een reden hiervoor zou kunnen zijn dat een groot deel van de behandelend artsen (o.a. oncologen en chirurgen) de classificatie van hoogrisicopatiënten op basis van de ASCO-criteria onvoldoende vindt om over te gaan tot een dergelijke invaliderende nabehandeling. Kortom, de behandelaars van patiënten met een coloncarcinoom in Nederland, maar ook in de rest van de wereld zijn op zoek naar een betrouwbare methode om de hoogrisico stadium II patiënten te kunnen identificeren.

De afgelopen jaren is er daarom wereldwijd veel onderzoek gedaan naar betere identificatie van deze hoogrisico stadium II patiënten. Er is met name veel winst behaald door studies naar het gebruik van biomarkers. Biomarkers zijn organische substanties zoals bijvoorbeeld cellen, eiwitten en genen, die in het bloed of het tumorweefsel van patiënten in het laboratorium kunnen worden geanalyseerd. Door de aan- of juist afwezigheid van deze biomarkers te analyseren, bijvoorbeeld in relatie tot de overleving van patiënten, kan worden bestudeerd of deze voorspellend zijn voor de prognose van patiënten.

Ook in dit proefschrift ligt de focus op het gebruik en de ontwikkeling van biomarkers die informatie kunnen geven over de prognose van een patiënt met darmkanker. In deel 1 hebben wij gekeken naar een aantal processen die van belang

zijn voor tumorgroei en -ontwikkeling, zoals geregleerde celdood (apoptose) en ongecontroleerde celdeling (proliferatie). In deel 2 hebben wij de interactie tussen tumoren en het afweersysteem bestudeerd.

DEEL 1 BIOMARKERS GERELATEERD AAN APOPTOSE EN PROLIFERATIE

Vernieuwing van cellen door celdeling is een proces dat continu plaatsvindt in vrijwel alle weefsels in het lichaam, maar met name in weefsels met veel slijmvlies zoals de darm. Om te voorkomen dat dit resulteert in woekering van cellen en dus tumorvorming worden oude en/of beschadigde cellen regelmatig afgebroken. Dit resulteert in een balans van aanmaak en afbraak van cellen die ook wel weefselhomeostase wordt genoemd (8-10). Apoptose, ook wel geregleerde celdood genaamd, draagt in belangrijke mate bij aan de afbraak van deze oude en beschadigde cellen (11). Het is een complex proces, dat op meerdere niveaus wordt geregleerd. Het proces kan door de cel zelf worden geïnitieerd; van binnenuit (intrinsiek), bijvoorbeeld naar aanleiding van DNA-schade, of door stimuli van buiten af (extrinsiek), bijvoorbeeld door activering van het immuunsysteem (11). Beide routes leiden tot de activering van een bijzondere groep eiwitten, de caspases (12), die op basis van hun enzymatische activiteit in staat zijn een cel af te breken.

Eerder onderzoek uit ons laboratorium heeft aangetoond dat de hoeveelheid aan apoptotische activiteit in het tumorweefsel van patiënten met een endeldarmtumor significant gerelateerd is aan de mate van lokale terugkeer van tumor in deze patiëntenpopulatie (13, 14). In de literatuur is deze relatie (tussen de mate van tumorcelapoptose en de prognose van patiënten) ook vastgesteld voor dikkedarmtumoren (15). Bepaalde eiwitten die onderdeel zijn van het proces leidend tot apoptose in dikkedarmtumoren zouden daarom kunnen functioneren als biomarkers. In **Hoofdstuk 2** geven we een overzicht van de wetenschappelijk literatuur die op dit moment beschikbaar is op het gebied van biomarkers gerelateerd aan apoptose. Hierbij hebben wij met name gekeken naar prognostische relevantie en specifiek ook naar studies waarin deze biomarkers met behulp van immunohistochemie werden bepaald. Immunohistochemie (IHC) is een techniek waarbij de aanwezigheid van een bepaald eiwit kan worden aangetoond door deze te labelen met antilichamen die specifiek binden aan dit eiwit. In de literatuur hebben we 26 potentiële biomarkers, gerelateerd aan apoptose en bestudeerd met IHC, gevonden. De functie van deze biomarkers binnen het proces van apoptose en de resultaten van de afzonderlijke studies worden in het overzichtsartikel in hoofdstuk 2 beschreven. De belangrijkste conclusie van dit artikel was dat geen enkele biomarker op zich zelf, dus als 'single' biomarker, significant gerelateerd was aan de klinische prognose van patiënten. Derhalve zijn deze biomarkers op dit moment als 'single' biomarkers niet bruikbaar in de kliniek voor de identificatie van hoogrisico stadium II patiënten.

Een verklaring voor het uitblijven van prognostische relevantie van deze zogenaamde 'single biomarkers' kan zijn dat voor het voorkomen van tumorvorming niet alleen een intact proces van apoptose nodig is, maar ook een goed gereguleerde nieuwvorming of proliferatiecyclus. Immers beide dragen bij aan weefsel-homeostase. Ons literatuuronderzoek toonde dat een combinatie van biomarkers, zowel gerelateerd aan apoptose als aan proliferatie, betere resultaten geeft voor wat betreft het voorspellen van de prognose van patiënten. Vanwege deze betere voorspellende waarde van de combinatie van biomarkers zowel betrokken bij apoptose als bij proliferatie hebben wij een studie opgezet welke wordt beschreven in **Hoofdstuk 3**. Hierin kijken we naar een combinatie van biomarkers, ki67 en geactiveerd caspase-3, die respectievelijk betrokken zijn bij celproliferatie en apoptose. Wij bepaalden deze biomarkers op een zogenaamde 'tissue micro array' (TMA) met de eerder genoemde immunohistochemie (IHC) techniek. Het voordeel van het gebruik van een dergelijke TMA is dat de analyse goedkoper is en met een minimaal gebruik van weefsel kan worden uitgevoerd. De combinatie van de ki67 en caspase-3 markers werd geanalyseerd op tumorweefselsamples van bijna alle patiënten die in een periode van 10 jaar (tussen 1990-2000) in het LUMC werden geopereerd aan een coloncarcinoom. De resultaten van dit onderzoek toonden aan dat de gecombineerde aanwezigheid van deze markers, verwerkt in de door ons ontwikkelde CAP (Combined Apoptosis and Proliferation) parameter, zowel correleerde met prognose, de locatie van de tumor in de dikke darm, als met tumorstadium.

Ondanks de positieve uitkomst van de studie in Hoofdstuk 3 is een dergelijke uitgebreide vorm van IHC voor toepassing van deze combinatie van biomarkers in de kliniek niet haalbaar. Alhoewel IHC relatief goedkoop is kost een dergelijke gecombineerde analyse veel tijd (16). Maar een belangrijker nadeel is dat de analyse nog niet objectief kan worden uitgevoerd. Alle afzonderlijke bepalingen worden door analisten op het oog gescoord hetgeen kan leiden tot variaties tussen de verschillende beoordelaars; interbeoordelaarsvariatie genoemd (16). Op dit moment wordt in ons laboratorium gewerkt aan een geautomatiseerde methode waarbij de analyse van de IHC resultaten door een computer wordt uitgevoerd. Deze automatische analysemethode is echter nog niet gevalideerd en voor toepassing op individuele patiënten relatief kostbaar. Om de klinische toepasbaarheid van onze parameter te realiseren werd daarom gekozen tot het ontwikkelen van een test waarbij zowel de mate van apoptose als proliferatie kunnen worden bepaald, op minimale hoeveelheid materiaal door middel van real-time testing. Het voordeel hiervan is dat een dergelijke analyse geen gebruik maakt van IHC en daardoor een gestandaardiseerde uitkomstmaat biedt die niet gevoelig is voor de eerder genoemde interbeoordelaarsvariatie. Voor het analyseren van de mate van apoptose is een dergelijke test al ontwikkeld en in het verleden met succes uitgevoerd in ons laboratorium (17). In deze test wordt naast de hoeveelheid van het aanwezige caspase-3 enzym ook de enzymatische activiteit van het eiwit bepaald. Wereldwijd wordt deze bepaling geaccepteerd als een marker voor de mate van apoptotische activiteit in tumorweefsel (16).

Een dergelijke marker, waarbij gebruik wordt gemaakt van enzymatische activiteit, voor tumorcelproliferatie was nog niet voorhanden voor het coloncarcinoom. In **Hoofdstuk 4** hebben wij daarom een nieuwe marker, ontwikkeld door het Japanse bedrijf Sysmex, die representatief is voor de hoeveelheid tumorcelproliferatie, getest voor klinische relevantie in samenwerking met collegae van de technische universiteit van de Rechts an der Isar Klinikum in München. Deze marker is genaamd CDK1SA ('cyclin dependent kinase 1 specific activity'). Het CDK1 eiwit is nauw betrokken bij de verschillende fases van celdeling, die in normale cellen worden doorlopen en functioneert als een poortwachter in de regulatie van dit proces(18). Een hoge mate van CDK1 activiteit is bewezen gerelateerd te zijn aan een hoge mate van celproliferatie en eerdere studies uit ons laboratorium hebben een klinische relevantie van deze marker met betrekking tot prognose in borstkankerpatiënten aangetoond (18-20). Ter analyse van de klinische relevantie van deze marker met betrekking tot de stadium II coloncarcinoompatiënten werd materiaal afkomstig van twee min of meer gelijkwaardige patiëntengroepen uit Duitsland en Nederland gebruikt. De resultaten van dit onderzoek toonden dat de specifieke enzymatische activiteit van CDK1 (CDK1SA), in essentie op dezelfde wijze bepaald als de enzymatische activiteit van caspase-3, significant gerelateerd is aan de kans op het ontwikkelen van een metastase op afstand. Opvallend genoeg was er een sterke relatie met de tumormicrosatellietstatus. Microsatellieten zijn kleine repeterende nucleotidensequenties in het DNA. Een toename in de frequentie van deze repeterende sequenties ontstaat door niet goed functionerend DNA herstelsysteem (het MMR, mismatch repair systeem) (21-23). Dit uit zich in instabiliteit van het genoom wat microsatelliet-instabiliteit (MSI) wordt genoemd. Onder normale omstandigheden zorgen de eiwitten die het MMR vormen er voor dat fouten, die tijdens celdeling spontaan kunnen ontstaan en resulteren in de vorming van microsatellieten, worden gecorrigeerd. In sommige tumoren kunnen MMR eiwitten hun functie niet goed uitvoeren doordat er of wel een mutatie optreedt in het gen verantwoordelijk voor de productie van deze MMR eiwitten, of doordat er te weinig MMR eiwitten worden geproduceerd door hypermethylering van de promotor van een van de betrokken genen, dit resulteert in MSI. Patiënten met tumoren waarvan het DNA MSI laat zien hebben over het algemeen een betere prognose (23). Wij concludeerden dan ook dat als CDK1SA wordt geanalyseerd ten einde een uitspraak te doen over de prognose van een patiënten, de tumormicrosatellietstatus ook altijd in overweging dient te worden genomen.

Aangezien we in hoofdstuk 4 hebben aangetoond een betrouwbare biomarker te hebben ontwikkeld, representatief voor de mate van tumorproliferatie, hebben wij in **Hoofdstuk 5** gekeken naar de combinatie van deze biomarker met de reeds bekende biomarker voor de mate van apoptose, het geactiveerd caspase-3. In een patiëntengroep bestaande uit alleen stadium II colonkankerpatiënten werden de resultaten van beide analyses gecombineerd. We waren in staat om in dit cohort met behulp van onze assay in 87.5% van de stadium II patiënten met microsatellietstabiele tumoren correct te classificeren als hoogrisicopatiënten.

Kortom, de gecombineerde analyse van biomarkers die zowel betrekking hebben op de mate van apoptose in tumorweefsel als de mate van proliferatie, kan worden gebruikt om hoogrisico stadium II patiënten met colontumoren te identificeren. In hoofdstuk 5 werd onze classificatie, gebaseerd op gecombineerde biomarkers, tevens vergeleken met de classificatie in hoog- en laagrisicopatiënten op basis van de door de ASCO voorgestelde criteria (6). Vooralsnog was onze gecombineerde analyse even specifiek als sensitief in het identificeren van hoogrisicopatiënten als wanneer de ASCO criteria werden toegepast. Dit biedt perspectieven voor een eventuele, gecombineerde toepassing in de toekomst.

DEEL 2 INTERACTIE TUSSEN HET COLONCARCINOOM EN HET IMMUUNSISTEEM

Een belangrijke rol in de controle van tumorgroei en de ontwikkeling van metastasen is weggelegd voor het immuunsysteem(24-27). In 2000 werden door Hanahan en Weinberg een zestal kerneigenschappen van tumorcellen ook wel 'Hallmarks of cancer development' genaamd beschreven (28). Het betreft veranderingen die normale cellen moeten ondergaan om zich te ontwikkelen tot kwaadaardige kankercellen. Deze kenmerken hebben betrekking op het in stand houden van de proliferatie en onbeperkte celdeling, het vermijden van apoptose, het vermogen tot invasie van weefsel en het ontwikkelen van metastasen op afstand en het vermogen tot het aanzetten van bloedvatvorming (29). Voortschrijdend inzicht in het proces van tumorgroei en ontwikkeling leidde er in 2011 toe dat er een tweetal kenmerken werden toegevoegd aan deze kerneigenschappen. Een daarvan was het vermogen van tumorcellen om vernietiging door het immuunsysteem te voorkomen. Tijdens het proces van maligne celtransformatie vindt er een belangrijke interactie plaats tussen de tumorcellen en het omringende weefsel, ook wel genaamd de tumor-microenvironment genoemd (29). In een belangrijke hypothese genaamd de 'tumor immune surveillance hypothesis' wordt gesteld dat het immuunsysteem van elk mens in staat is kankercellen te identificeren en te elimineren, nog voordat deze tot een kwaadaardigheid kunnen leiden (30). Deze hypothese vormde de basis voor de studies die worden gepresenteerd in het tweede deel van het proefschrift. In hoofdstuk 6 en 7 behandelen wij hoe het immuunsysteem van de patiënt gebruikt zou kunnen worden in de behandeling van kanker met behulp van zogenaamde tumorvaccins. In hoofdstuk 8 en 9 tonen wij vervolgens hoe deze interactie tussen de tumorcel en immuunsysteem ook kan worden gebruikt voor de ontwikkeling van nieuwe biomarkers.

Tumorvaccinatie

Onderzoek naar tumorvaccinaties is een veelbelovende stap in de richting van de ontwikkeling van nieuwe behandelstrategieën van het coloncarcinoom. Eind verleden jaar nog werd immunotherapie als behandeling van kanker verkozen tot de 'Breakthrough' van het jaar 2013 door Science Magazine. In het kort wordt bij dit

soort vaccinaties gebruik gemaakt van tumorspecifieke eiwitten (genaamd antigenen) om het immuunsysteem te activeren en zo de tumorcellen te vernietigen. In **Hoofdstuk 6** wordt een overzicht gegeven van de literatuur met betrekking tot een aantal klinische studies waarin dergelijke vaccins zijn onderzocht. Uit dit overzicht blijkt dat er een aantal kerneigenschappen zijn waar een tumorvaccin aan moet voldoen. Het vaccin moet veilig zijn in gebruik en, zoals al genoemd, gericht zijn tegen tumorspecifieke eiwitten. Het vaccin moet een reactie van specifieke T-cellen opwekken welke in staat zijn de tumorcellen te vernietigen en het moet een dusdanig effect hebben op de tumor-microenvironment dat deze T-cellen hun werk kunnen doen.

Binnen het LUMC, in een samenwerkingsverband tussen de afdeling Klinische Oncologie en de afdeling Heelkunde, is de afgelopen jaren gewerkt aan de ontwikkeling van het zogenoemde p53-SLP[®] vaccin, een synthetisch gefabriceerd p53 'long peptide' vaccin (31). Het eiwit p53 leent zich goed als doelwit voor tumorvaccinatie omdat het in bijna de helft van de colontumoren in grote hoeveelheden wordt geproduceerd terwijl de normale variant (het wildtype) van het eiwit in tumoren nauwelijks voorkomt (32). Eerdere studies hebben aangetoond dat het vaccin voldoet aan kerneigenschappen van een vaccin: het is veilig in gebruik en in staat om een specifieke (CD4+) T-celreactie op te wekken (31). Deze CD4+ T-celrespons is cruciaal voor de werking van een vaccin. De CD4+ T-cellen zorgen er namelijk voor dat CD8+ T-cellen, ook wel cytotoxische T cellen genaamd, kunnen ontstaan die gericht zijn tegen tumorcellen. Daarnaast ondersteunen ze de CD8+ T-cellen in hun functie: het herkennen van de tumorcellen op basis van het antigen wat verwerkt is in het vaccin en destructie van deze tumorcellen. Daarin spelen de cytokines interferon- γ (IFN- γ) en interleukine-2 (IL-2), geproduceerd door de CD4+ T-cellen, een belangrijke rol.

Helaas lieten de resultaten van de eerste studies met het p53-SLP[®] vaccin zien dat de opgewekte CD4+ T-celrespons, ook wel een Type 1 T-helperrespons genaamd, slechts leidde tot de productie van een zeer kleine hoeveelheid van deze belangrijke cytokines. De opgewekte respons was dus niet effectief genoeg. Daarom is getracht, kijkend naar de kerneigenschappen uit het literatuuronderzoek van hoofdstuk 6, het p53-SLP[®] vaccin te optimaliseren. De belangrijkste aanpassing richtte zich op het verbeteren van de tumor-microenvironment om zo de ontwikkeling van de CD4+ T-celrespons te stimuleren. Het nieuwe vaccin bevat dan ook naast het originele p53-SLP[®] vaccin, interferon-alpha (INF- α). Van deze stof is eerder beschreven dat het een positieve uitwerking heeft op het tumor-microenvironment (33).

In **Hoofdstuk 7** wordt de studie beschreven waarin het verbeterde vaccin werd getest op allereerst veiligheid maar natuurlijk ook op de mate waarin het vaccin in staat was een CD4+ T-celrespons te induceren. In de studie werd het verbeterde vaccin getest in 11 patiënten, allemaal succesvol behandeld voor gemetastaseerd coloncarcinoom. De resultaten lieten zien dat het verbeterde vaccin veilig was in gebruik; de enige bijwerkingen die werden gerapporteerd betroffen kleine zwelling van de huid rondom het geïnjecteerde gebied. Daarnaast blijkt uit de data van

de immunologische deelstudies dat alle patiënten een specifieke T-celrespons ontwikkelden tegen het vaccin. Maar misschien nog belangrijker, in vergelijking tot het p53-SLP® vaccin alleen leverde de combinatie van het vaccin met IFN- α significant meer IFN- γ p53-specifieke T-cellen op. Kortom, door toevoeging van IFN- α aan het bestaande vaccin werd het immunologisch resultaat duidelijk verbeterd. Deze data scheppen ruimte en mogelijkheden voor verdere ontwikkeling van het vaccin. Er zal met name nog veel aandacht moeten worden besteed aan het optimaliseren van het immunologisch resultaat. Het is namelijk nog niet bewezen dat de mate waarin wij nu een reactie hebben kunnen induceren ook daadwerkelijk een klinisch significant resultaat oplevert.

Biomarkers en de interactie tussen colontumoren en het immuunsysteem

In hoofdstuk 8 en 9 wordt, zoals eerder genoemd, aandacht geschonken aan de tumor, zijn omgeving op celniveau en de interactie die hier plaatsvindt tussen tumorcellen en het immuunsysteem. Het doel; het identificeren van biomarkers gerelateerd aan deze interactie welke van prognostische waarde zijn. In dit proefschrift wordt met name gefocussed op biomarkers van invloed op de identificatie van de hoogrisicopopulatie binnen het cohort van de stadium II colonkankerpatiënten. Het verworven immuunsysteem, ook wel het adaptieve immuunsysteem genaamd, bestaat uit meerdere typen cellen. De belangrijkste, met betrekking tot tumorgroei en -ontwikkeling, zijn de al eerder genoemde CD8⁺ cytotoxische T-cellen (CTLs) die tumorcellen kunnen herkennen en afbreken (25). Tijdens de maligne transformatie kan het uiterlijk (het fenotype) van een cel dusdanig gewijzigd worden dat de tumorcel feitelijk onherkenbaar wordt voor het immuunsysteem. Dit gebeurt door veranderde expressie van bepaalde eiwitten, humaan leucocytenantigen (HLA) genaamd, die voor een belangrijk deel de interactie met het immuunsysteem reguleren (26, 27). Van het HLA bestaan verschillende groepen of klassen bestaan. HLA klasse type I zorgt voor de interactie met de CTLs. Door verminderde expressie van de HLA klasse type I eiwitten zorgen tumorcellen er dus in feite voor dat ze onherkenbaar worden voor CTLs en zo ontsnappen aan destructie door het immuunsysteem, ook wel 'immune surveillance' genaamd (34, 35). Een andere manier om aan immune surveillance te ontkomen is onderdrukking van de interactie tussen tumorcellen en het immuunsysteem. Cellen die deze uitwerking hebben op het immuunsysteem zijn regulatoire T cellen, ook wel 'regulatory T cells' of Foxp3⁺ T-cellen genaamd (36-38). Door het aantrekken van deze cellen in de omgeving van de tumor wordt de aanval van het immuunsysteem op de tumor als het ware onderdrukt. In **Hoofdstuk 8** wordt bestudeerd of de aanwezigheid van CTLs, regulatoire T-cellen en de mate waarin het fenotype van een tumor op HLA klasse I niveau is veranderd, van invloed is op de prognose van colonkankerpatiënten. Omdat de CTLs en regulatoire T-cellen elkaar feitelijk tegenwerken hebben we ook gekeken naar de ratio tussen de aanwezige cellen van beide groepen. En inderdaad, relatief meer aanwezigheid CD8⁺ T-cellen dan regulatoire T-cellen had een positief effect op de prognose van deze patiënten met betrekking tot de duur van overleving zonder afstandsmetastasen. Ook in deze

studie werden meerdere factoren, zoals MSI-status, mogelijk van invloed op de prognose van patiënten meegenomen in de analyse. De belangrijkste conclusie van deze studie was dat de interactie tussen het immuunsysteem, de tumor en de tumoromgeving uit zoveel facetten bestaat dat ook op dit gebied meerdere biomarkers nodig zijn om het effect van de uitkomst van deze interactie op de overleving van patiënten te beschrijven.

In de studie beschreven in **Hoofdstuk 9** proberen we deze ingewikkelde interactie tussen tumorcel en immuunsysteem vast te leggen in aantal patronen waarin de verschillende markers werden gecombineerd en deze te relateren aan de klinische prognose van de patiënt. Er werd gekeken naar HLA-expressie, de aan- of afwezigheid van Foxp3⁺ cellen en de tumormicrosatellietstabiliteitstatus. Daarbij werd uitgebreider dan in hoofdstuk 8 gekeken naar het HLA-fenotype met meerdere markers zoals de klassieke HLA type I markers, HLA-A,-B en -C, maar ook niet-klassieke markers als HLA-E en -G. Op basis van de kwantitatieve IHC data van deze markers konden we 3 patronen onderscheiden. Een zogenaamd hoog, gemiddeld of laag immuunreactief tumorpatroon welke significant gerelateerd waren aan de prognose van patiënten. In de toekomst zal moeten worden gevalideerd in onafhankelijke patiëntenpopulaties of de door ons geïdentificeerde patronen inderdaad van klinisch prognostische waarde zijn.

CONCLUSIES EN EEN BLIK OP TOEKOMST

In dit proefschrift wordt op vele, uiteenlopende manieren getracht biomarkers te ontwikkelen welke mogelijk in de toekomst in een klinische setting op eenvoudige wijze toegepast kunnen worden ten einde de hoogrisico stadium II darmkankerpatiënten te identificeren. In alle studies werd een strategie gevolgd waarbij deze biomarkers werden opgespoord door te kijken naar de biologie van tumorgroei en -ontwikkeling en enkele van de belangrijkste processen zoals apoptose, proliferatie en interactie met het immuunsysteem te bestuderen. Deze studies hebben geleid tot een biochemische test waarin zowel apoptose als proliferatie gelijktijdig kunnen worden geanalyseerd, maar ook tot de ontwikkeling van tumor-immuunreactieve patronen met prognostische implicaties. De kennis verkregen in deze studies zal ons in de toekomst tevens helpen met de verdere ontwikkeling van de toepassing van therapeutische tumorvaccinatiestrategieën.

Alhoewel de resultaten veelbelovend zijn, zijn de door ons ontwikkelde biomarkerprofielen nog niet geschikt voor klinische toepassing. In hoofdstuk 2 wordt een vijf-stappenplan beschreven, ontwikkeld door Pepe *et al.*, dat kan worden gebruikt als leidraad voor de klinische introductie van een dergelijk biomarkerprofiel (39). Op dit moment bevinden wij ons wat betreft onze biomarkerprofielen pas in stappen 1 en 2 van dit plan, de zogenaamde pre-klinische 'exploratory' fase en de klinische toetsing en validatiefase. Er zijn verschillende problemen die nog aangepakt dienen te worden voor daadwerkelijk klinische introductie. De rol van tumormicrosatellietstatus bijvoorbeeld. Zoals al beschreven is duidelijk dat deze van invloed is

op prognose. Ook onze biomarkers lieten een evidente relatie zien met de tumor-microsatellietstatus, maar hoe deze interactie precies plaatsvindt blijft onduidelijk. Voor eventuele klinische introductie dient deze interactie te worden verhelderd. Er wordt gesuggereerd dat het mogelijk niet de microsatellietstatus op zich zelf is die de prognostische relatie beïnvloedt, maar de locatie van de tumor en de daarmee samenhangende embryologische oorsprong van het weefsel waaruit de tumor ontstaat, dan wel mate van mutaties die samenhangen met de microsatellietstatus (22, 23, 40, 41).

De resultaten van onze studies laten in ieder geval zien dat voor de ontwikkeling van prognostische biomarkers uitermate belangrijk is de biologische context van tumorgroei en -ontwikkeling als uitgangspunt te nemen. We hebben laten zien dat dit een gecompliceerd, uit meerdere stappen bestaand en op meerdere niveaus gereguleerd proces is. Door biomarkers te analyseren representatief voor een aantal van deze stappen zoals tumorcelapoptose, -proliferatie en interactie met het immuunsysteem binnen de tumoromgeving, kunnen tumorfenotypes worden ontwikkeld. Deze fenotypes zijn derhalve, meer dan de veelvuldig bestudeerde single markers, representatief voor de mate van tumoragressiviteit en daarom beter geschikt voor introductie als klinisch prognostische biomarkers. Op basis van dit proefschrift kan dan ook met vertrouwen worden gesteld dat de ontwikkeling van op biomarkers gebaseerde tumorfenotypen van grote klinische waarde is. Op basis van dergelijke fenotypen zal in de toekomst zeer accuraat het klinische gedrag van colontumoren kunnen worden voorspeld op basis waarvan uitspraken kunnen worden gedaan over de individuele prognose van patiënten. Derhalve zijn dergelijke fenotypen van grote klinische waarde en zullen in de toekomst veel bijdragen aan het bepalen van een optimale behandelstrategie, wat met name van groot belang is voor stadium II colonkankerpatiënten.

REFERENCES

- (1) Jemal A, Bray F, Center MM, et al.: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90, 2011
- (2) Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al.: Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127:2893-2917, 2010
- (3) Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al.: Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 322:352-358, 1990
- (4) Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, et al.: Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol* 28:264-271, 2010
- (5) Van CE, Borrás JM, Castells A, et al.: Improving outcomes in colorectal cancer: Where do we go from here? *Eur J Cancer*, 2013
- (6) Benson AB, III, Schrag D, Somerfield MR, et al.: American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 22:3408-3419, 2004
- (7) Dutch Surgical Colorectal Audit: Dutch Surgical Colorectal Audit Jaarrapportage 2010 Uitkomst van zorg registratie; transparantie, uitkomst van zorg en kwaliteit. Online, 2010 (abstr)
- (8) Takano Y, Saegusa M, Ikenaga M, et al.: Apoptosis of colon cancer: comparison with Ki-67 proliferative activity and expression of p53. *J Cancer Res Clin Oncol* 122:166-170, 1996
- (9) Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, et al.: Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res* 55:1811-1816, 1995
- (10) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501, 1992
- (11) Fulda S, Debatin KM: Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25:4798-4811, 2006
- (12) Degterev A, Boyce M, Yuan J: A decade of caspases. *Oncogene* 22:8543-8567, 2003
- (13) de HP, de Bruin EC, Klein-Kranenburg E, et al.: Caspase-3 activity predicts local recurrence in rectal cancer. *Clin Cancer Res* 13:5810-5815, 2007
- (14) de Bruin EC, van de Velde CJ, van de Pas S, et al.: Prognostic value of apoptosis in rectal cancer patients of the dutch total mesorectal excision trial: radiotherapy is redundant in intrinsically high-apoptotic tumors. *Clin Cancer Res* 12:6432-6436, 2006
- (15) Michael-Robinson JM, Reid LE, Purdie DM, et al.: Proliferation, apoptosis, and survival in high-level microsatellite instability sporadic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 7:2347-2356, 2001
- (16) Soini Y, Paakko P, Lehto VP: Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *Am J Pathol* 153:1041-1053, 1998
- (17) Jonges LE, Nagelkerke JF, Ensink NG, et al.: Caspase-3 activity as a prognostic factor in colorectal carcinoma. *Lab Invest* 81:681-688, 2001
- (18) Ishihara H, Yoshida T, Kawasaki Y, et al.: A new cancer diagnostic system based on a CDK profiling technology. *Biochim Biophys Acta* 1741:226-233, 2005
- (19) Kim SJ, Nakayama S, Miyoshi Y, et al.: Determination of the specific activity of CDK1 and CDK2 as a novel prognostic indicator for early breast cancer. *Ann Oncol* 19:68-72, 2008

- (20) van Nes JG, Smit VT, Putter H, et al.: Validation study of the prognostic value of cyclin-dependent kinase (CDK)-based risk in Caucasian breast cancer patients. *Br J Cancer* 100:494-500, 2009
- (21) Lao VV, Grady WM: Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8:686-700, 2011
- (22) Grady WM, Carethers JM: Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 135:1079-1099, 2008
- (23) Soreide K, Janssen EA, Soiland H, et al.: Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg* 93:395-406, 2006
- (24) Naito Y, Saito K, Shiiba K, et al.: CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 58:3491-3494, 1998
- (25) Menon AG, Janssen-van Rhijn CM, Morreau H, et al.: Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest* 84:493-501, 2004
- (26) Murphy J, O'Sullivan GC, Lee G, et al.: The inflammatory response within Dukes' B colorectal cancers: implications for progression of micrometastases and patient survival. *Am J Gastroenterol* 95:3607-3614, 2000
- (27) Halvorsen TB, Seim E: Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 42:162-166, 1989
- (28) Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70, 2000
- (29) Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674, 2011
- (30) BURNET M: Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J* 1:841-847, 1957
- (31) Speetjens FM, Kuppen PJ, Welters MJ, et al.: Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 15:1086-1095, 2009
- (32) Russo A, Bazan V, Iacopetta B, et al.: The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 23:7518-7528, 2005
- (33) Verdegaal EM, Visser M, Ramwadhoebe TH, et al.: Successful treatment of metastatic melanoma by adoptive transfer of blood-derived polyclonal tumor-specific CD4+ and CD8+ T cells in combination with low-dose interferon-alpha. *Cancer Immunol Immunother* 60:953-963, 2011
- (34) Khong HT, Restifo NP: Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3:999-1005, 2002
- (35) Wischhusen J, Waschbisch A, Wiendl H: Immune-refractory cancers and their little helpers--an extended role for immunotolerogenic MHC molecules HLA-G and HLA-E? *Semin Cancer Biol* 17:459-468, 2007
- (36) Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al.: Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-949, 2004
- (37) 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* 16:1272-1280, 2010
- (38) Gao Q, Qiu SJ, Fan J, et al.: Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T

cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. J Clin Oncol 25:2586-2593, 2007

- (39) Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, et al.: Phases of biomarker development for early detection of cancer. J Natl Cancer Inst 93:1054-1061, 2001
- (40) Edmonston TB, Cuesta KH, Burkholder S, et al.: Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. Hum Pathol 31:1506-1514, 2000

- (41) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature 487:330-337, 2012