



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Biomarkers in colorectal cancer

Swets, M.

Citation

Swets, M. (2020, January 7). *Biomarkers in colorectal cancer*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/82484>

Version: 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/1887/82484>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/82484> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Swets, M.

Title: Biomarkers in colorectal cancer

Issue Date: 2020-01-07

Appendices

Nederlandse samenvatting

List of publications

Curriculum Vitae

Dankwoord

ALGEMENE DISCUSSIE

Gedurende de laatste twee decennia is de behandeling van patiënten met colorectale tumoren aanzienlijk verbeterd. Met name door de introductie van de totale mesorecale excisie (TME), gecombineerd met preoperatieve (chemo)radiatie voor patiënten met een rectumtumor, is het aantal lokale recidieven drastisch teruggebracht¹. Voor maligniteiten gelokaliseerd in het colon (stadium III en hoog-risico stadium II tumoren) is na de introductie van adjuvante chemotherapie met 5-fluoruracil capecitabine en oxaliplatin de mortaliteit gedaald²⁻⁴. Tot voor kort werden zowel patiënten met een colontumor als met een rectumtumor behandeld met adjuvante chemotherapie. Echter staat adjuvante behandeling middels chemotherapie in patiënten met een rectumtumor ter discussie. In een veel geciteerde Japanse studie werd dit positieve effect van adjuvante chemotherapie beschreven. Noemenswaardig is het feit dat de patiënten in deze Japanse studie niet werden behandeld met preoperatieve (chemo) radiotherapie gevolgd door gestandaardiseerde TME chirurgie⁵. In 2012 verscheen een Cochrane review, waarin opnieuw een positief effect van adjuvante chemotherapie werd beschreven. Opvallend is dat in geen van de 21 geïncludeerde studies chirurgie middels het TME principe werd toegepast. Daarbij werd in slechts twee studies (chemo) radiotherapie toegepast⁶. In tegenstelling tot de geïncludeerde studies in de Cochrane review is in Nederland preoperatieve (chemo)radiatie gevolgd door TME chirurgie de standaard. Zoals eerder beschreven door Breugom *et al.* en later in een meta-analyse, opgenomen in dit proefschrift (hoofdstuk 2), kan in patiënten met stadium II-III rectumtumoren geen overlevingswinst worden aangetoond bij toepassing van adjuvante chemotherapie na behandeling met preoperatieve (chemo)radiatie en TME chirurgie⁷⁻⁹. Met name op basis van de resultaten uit hoofdstuk 2 kan gesteld worden dat er geen plaats is voor de behandeling met adjuvante chemotherapie voor patiënten met een rectumtumor. In de huidige richtlijnen is het pathologische stadium van de tumor leidend voor de toe te passen behandelstrategie¹⁰. Ondanks continue verbetering van het pathologisch classificatiesysteem (TNM classificatie) verschilt de klinische uitkomst tussen patiënten met dezelfde pathologisch geclassificeerde colorectale tumor¹¹. Mede daarom zou het huidige stadiëringssysteem aangevuld moeten worden met biomarkers, om zodoende meer individuele behandelingen toe te kunnen passen en overbehandeling te voorkomen. In dit proefschrift worden naast het effect van adjuvante chemotherapie verschillende biomarkers bestudeerd.

Om de leesbaarheid van dit proefschrift te vergroten is het verdeeld in drie delen. In deel I wordt de uitvoering van een meta-analyse beschreven, waarin het effect van adjuvante chemotherapie, na preoperatieve (chemo)radiatie en TME chirurgie, in patiënten met stadium II-III rectumtumor werd geëvalueerd. In hoofdstuk 3 werd in het bijzonder

gekeken naar het effect van adjuvante chemotherapie in patiënten met rectumtumoren gelokaliseerd >10cm van de anus. In hoofdstuk 4 werden pathologische kenmerken van rectumtumoren bestudeerd, om zodoende patiënten te kunnen selecteren welke wel baat zouden kunnen hebben van adjuvante chemotherapie. Deel II van dit proefschrift beschrijft de expressie van eiwitten op colorectale tumorcellen, betrokken bij het 'ontwijken' van het immuunsysteem. De expressie van het klassieke HLA klasse I molecuul en het niet-klassieke HLA-G molecuul werden uitgebreid bestudeerd¹²⁻¹⁵. In deel III zijn kenmerken van colorectale tumoren bestudeerd op het niveau van genetica en epigenetica. In hoofdstuk 8 werd gebruik gemaakt van de LINE-1 methylatiestatus. De methylatiestatus van LINE-1, een repeterende sequentie in het DNA, kan gezien worden als surrogaat marker voor de methylatiestatus van het gehele genoom. Hypomethylatie van het genoom zou in maligniteiten geassocieerd kunnen zijn met een slechtere overleving. In hoofdstuk 9 werd de welbekende biomarker microsatelliet instabiliteit (MSI) bestudeerd. Deze, reeds in de kliniek gebruikte biomarker, voorspelt een goede prognose in vroeg stadium colontumoren. Ondanks het gebruik in de kliniek is deze biomarker tot op heden niet goed bestudeerd in een specifieke groep van patiënten met een rectumtumor. Daarom werd in hoofdstuk 8 het voorkomen van MSI positieve tumoren en de relatie tot overleving in deze patiëntengroep bestudeerd.

DEEL I

ADJUVANTE CHEMOTHERAPIE VOOR HET LOKAAL GEVORDERDE RECTUMTUMOR

De behandelstrategie van rectumtumoren wordt bepaald in een multidisciplinair team van medisch specialisten. De hoeksteen van de behandeling van niet gemetastaseerde rectumtumoren is chirurgisch ingrijpen, met name door het uitvoeren van de zogenoemde TME chirurgie. Door de invoering van TME chirurgie is de overleving van patiënten met een rectumtumor drastisch verbeterd¹. Ondanks deze verbetering ontwikkelt ongeveer 30% van de patiënten metastasen op afstand¹⁶⁻¹⁸. Adjuvante chemotherapie zou in theorie de metastaserende cellen kunnen elimineren om derhalve metastasering te voorkomen. Echter, het te verwachten positieve effect van adjuvante chemotherapie voor de behandeling van patiënten met rectumtumoren werd geëxtrapoleerd vanuit het bewezen effect van adjuvante chemotherapie in patiënten met tumoren gelokaliseerd in het colon. Daarbij is het positieve effect van adjuvante chemotherapie na behandeling met preoperatieve (chemo)radiatie gevolgd door TME chirurgie in patiënten met rectumtumoren tot op heden niet aangetoond in gerandomiseerde studies⁷⁻⁹. Ondanks het feit dat het effect van adjuvante chemotherapie niet is bewezen in studieverband, worden patiënten ermee behandeld. Om robuust bewijs te leveren werd in hoofdstuk 2 van dit proefschrift een meta-analyse met individuele patiëntgegevens uitgevoerd, waarin adjuvante chemotherapie werd vergeleken met observatie na behandeling met preoperatieve (chemo)radiatie en

TME chirurgie in patiënten met een stadium II-III rectumtumor. Na een literatuurstudie werden vier gerandomiseerde fase III studies geïnccludeerd. Deze studies vergeleken adjuvante chemotherapie met observatie in patiënten met niet gemetastaseerde rectumtumoren, welke behandeld waren met preoperatieve (chemo)radiatie en TME chirurgie. Het totaal aantal geïnccludeerde patiënten in de vier studies was 2195, waarvan 1196 patiënten voldeden aan de inclusiecriteria. Samenvattend; op basis van hoofdstuk 2 kan worden geconcludeerd dat patiënten met een stadium II of III rectumtumor, behandeld met preoperatieve (chemo)radiatie en TME, chirurgie geen baat hebben van behandeling met adjuvante chemotherapie. Echter liet een subgroep analyse een opvallende bevinding zien; patiënten met rectumtumoren, gelokaliseerd tussen de 10-15cm vanaf de anus, hebben mogelijk wel overlevingswinst van behandeling met adjuvante chemotherapie. Nader onderzoek voor deze subgroep van patiënten is essentieel. Daarom werd in hoofdstuk 3 van dit proefschrift specifiek onderzoek gedaan naar patiënten met rectumtumoren gelokaliseerd tussen de 10 en 15cm vanaf de anus, geïnccludeerd in de PROCTOR-SCRIPT studie. De PROCTOR-SCRIPT studie is een multicenter gerandomiseerde fase III trial, waarin werd gerandomiseerd tussen observatie of adjuvante chemotherapie bij patiënten met stadium (y)pTNM II-III rectumtumoren, behandeld met preoperatieve (chemo)radiatie en TME chirurgie. Overeenkomstig met de resultaten uit de meta-analyse werd een significant gunstig effect gezien van adjuvante chemotherapie ten opzichte van observatie op de ziektevrije overleving in patiënten met rectumtumoren tussen de 10 en 15cm vanaf de anus, in vergelijking met patiënten met rectumtumoren tussen de 0 en 10cm vanaf de anus (alle patiënten werden behandeld met preoperatieve (chemo)radiatie en TME chirurgie). Op basis van deze resultaten zou bediscussieerd kunnen worden of hoge rectumtumoren als colontumoren beschouwd moeten worden, aangezien patiënten met colontumoren wel baat hebben bij adjuvante chemotherapie.

In het kader van gepersonaliseerde zorg, zijn niet alleen macroscopische tumorkarakteristieken, maar ook microscopische tumorkarakteristieken van invloed. Zoals lymfatische invasie, perineurale invasie, veneuze invasie en tumor budding. Deze pathologische markers werden al eerder geassocieerd met een ongunstig ziektebeloop¹⁹⁻²³. Bovendien zouden deze pathologische markers kunnen bijdragen aan een meer gepersonaliseerde behandelingsstrategie, zoals het gebruik van adjuvante chemotherapie²³⁻²⁵. In hoofdstuk 4 van dit proefschrift werd bevestigd dat de eerder genoemde stadiumafhankelijke pathologische markers geassocieerd waren met een ongunstige uitkomst in een cohort met patiënten met een rectumtumor. Daarbij werd ook geconcludeerd dat overleving sterk geassocieerd was met de aanwezigheid van twee of meer van de genoemde pathologische markers. Een verklaring voor deze bevinding zou kunnen zijn dat patiënten met aanwezigheid van ≥ 2 pathologische

markers meer "toegang" hebben tot de verschillende routes van metastaseringen. Tumorcellen kunnen zodoende langs de hematogene, lymfogene of langs betrokken zenuwen metastaseren. Een misschien nog wel belangrijkere bevinding in hoofdstuk 4 is dat deze pathologische markers geen predictieve rol spelen in patiënten met rectumtumoren. Anders gezegd, ondanks de aanwezigheid van deze ongunstige pathologische markers heeft behandeling met adjuvante chemotherapie in deze patiëntengroep geen positief effect. Naast de uitgevoerde studies in dit proefschrift is in de literatuur steeds meer bewijs voor een belangrijkere rol voor preoperatieve behandeling van rectumtumoren vergeleken met adjuvante behandeling^{17, 26}. Daarbij wordt preoperatieve behandeling beter verdragen dan adjuvante behandelstrategieën. Op dit moment is chemoradiatie gevolgd door TME chirurgie de meest gebruikte therapie voor patiënten met rectumtumoren. Maar de optimale dosering van de chemoradiotherapie en timing van de daaropvolgende operatie zijn nog niet geoptimaliseerd²⁷. In een recente studie van Erlandsson *et al.*, waarin drie preoperatieve radiotherapieregimes werden vergeleken, werden significante verschillen gezien ten aanzien van het aantal lokale recidieven, metastasen op afstand en algehele overleving²⁸. Ook werden interessante resultaten beschreven ten aanzien van postoperatieve complicaties. In de groep patiënten behandeld met radiotherapie, waarbij de operatie werd uitgesteld tot 4-6 weken na de laatste behandeling, werden significant minder postoperatieve complicaties waargenomen. Wel werd 7% van de geïncludeerde patiënten in deze groep opgenomen met radiatietoxiciteit.

Samenvattend werd in deel I van dit proefschrift geen significant effect gezien van de behandeling met adjuvante chemotherapie na preoperatieve (chemo)radiatie en TME chirurgie in patiënten met stadium II-III rectumtumoren. Daarbij werd een prognostisch ongunstig effect waargenomen van pathologische markers (lymfatische invasie, perineurale invasie, veneuze invasie en tumor budding), maar kon geen predictieve waarde worden ontleed aan deze markers in relatie tot adjuvante chemotherapie. Verder is de huidige definitie van *het* rectum verschillend tussen landen; bijvoorbeeld gemeten in centimeters vanaf de anus of gedefinieerd ten aanzien van de peritoneale omslagplooi. Gebaseerd op de bevindingen uit hoofdstuk 2 en 3 rijst de vraag of rectumtumoren gelokaliseerd >10cm vanaf de anus als colontumoren moeten worden beschouwd, gezien het vergelijkbare prognostisch gunstige effect van adjuvante chemotherapie.

DEEL II**INTERACTIE TUSSEN HET IMMUUNSISTEEM EN COLORECTALE TUMOREN, HLA-G EXPRESSIE**

Zoals beschreven door Hanahan and Weinberg verkrijgen cellen in het proces van maligne transformatie de zes welbekende biologische kenmerken ²⁹. In 2011 werden hier twee nieuwe kenmerken aan toegevoegd, waarvan het omzeilen van het immuunsysteem door maligne cellen in dit deel van het proefschrift werd onderzocht ³⁰. De huidige hypothese is dat tumorcellen worden herkend door het immuunsysteem en zodoende worden geëlimineerd. Door dit systeem te omzeilen heeft een tumorcel de mogelijkheid om te metastaseren. Het niet-klassieke humaan leukocytenantigeen (HLA) klasse I molecuul HLA-G zou hierbij een rol kunnen spelen. In niet pathologische condities komt HLA-G tot expressie in immuun bevoorrechte weefsels zoals de placenta. *De novo* expressie van het HLA-G eiwit is beschreven in verschillende typen kanker, waaronder ook colorectale tumoren. HLA-G zou kunnen bijdragen aan het omzeilen van het immuunsysteem door het remmen van NK cellen en T-cel gemedieerde cellyse ¹⁵. Daarom zou HLA-G geassocieerd kunnen zijn met een ongunstige prognose. Een tweede manier om het immuunsysteem te omzeilen is om HLA klasse 1 in mindere mate tot expressie te brengen op de tumorcel. Door middel van HLA klasse 1 eiwitten presenteren tumorcellen tumor-geassocieerde-antigenen op het celoppervlak. Deze antigenen worden door cytotoxische t-cellen herkend en vervolgens worden deze cellen gedegradeerd ⁹. Deze vernietiging door cytotoxische T-cellen zou dus voorkomen kunnen worden door HLA-klasse 1 te downreguleren. Eerdere studies hebben laten zien dat downregulatie van HLA klasse 1 inderdaad geassocieerd is met een ongunstige overleving ³¹⁻³³. Bovendien werd bij colorectale tumoren met HLA klasse 1 downregulatie en HLA-G expressie een nog ongunstiger prognose gezien ³¹⁻³³. Deze bevindingen ondersteunen de hypothese van een verminderde opsporing van maligne cellen door het immuunsysteem, wanneer HLA klasse I moleculen minder tot expressie komen en HLA-G tot expressie komt. Om meer inzicht te verkrijgen in het immunologische profiel van metastaserende cellen werd in hoofdstuk 5 de expressie van HLA klasse 1 en HLA-G middels immunohistochemie (IHC) gevisualiseerd en vergeleken in zowel de primaire colorectale tumor als de bijbehorende levermetastase. In tegenstelling tot de hypothese werd gevonden dat het overgrote deel van de cellen in de metastasen HLA klasse 1 tot expressie brachten. Daarbij werd geen associatie gezien tussen de primaire tumoren en bijbehorende levermetastasen, positief bevonden voor HLA-G eiwit expressie. Op basis van deze bevindingen kon geconcludeerd worden dat HLA klasse 1 downregulatie en *de novo* expressie van HLA-G zouden kunnen bijdragen aan het omzeilen van het immuunsysteem, maar zeker niet absoluut noodzakelijk voor de formatie van metastasen.

Ondanks het feit dat IHC in het algemeen een zeer aanvaarde laboratoriumtechniek is, blijft de detectie van HLA-G middels IHC controversieel. Bijvoorbeeld, het commercieel verkrijgbare en veelvuldig gebruikte moleculair antilichaam (mAb) 4H84 staat bekend om zijn kruisreactie met het β 2-microglobulin (β 2m) van HLA klasse 1 eiwitten op geactiveerde leukocyten³⁴. Dit zou kunnen leiden tot vals positieve erkenning van het HLA-G eiwit in tumoren welke worden geïnfiltreerd met leukocyten, zoals vaak wordt gezien bij colorectale tumoren. Om deze reden wordt in de literatuur gesuggereerd om altijd meerdere mAbs te gebruiken om het HLA-G eiwit te visualiseren^{34, 35}. Het is daarom van belang om te noemen dat de meerderheid van de uitgevoerde studies waarin HLA-G expressie wordt geëvalueerd alleen gebruik maken van mAb 4H84. In hoofdstuk 5 werd gebruik gemaakt van drie verschillende mAbs (4H84, MEM-G/1 en MEM-G/2); alle drie de mAbs zijn gericht tegen het HLA-G eiwit. Een zeer onverwachte en opvallende bevinding in dit hoofdstuk is het verschil in aankleuringspatroon tussen deze drie verschillende mAbs. Hiermee werd in hoofdstuk 5 het bestaan van niet-specifieke binding van de verschillende mAbs gericht tegen HLA-G aangetoond. Omdat IHC alleen niet afdoende lijkt te zijn werden aanvullende biochemische onderzoeken uitgevoerd om de aanwezigheid van het HLA-G molecuul in colorectale tumoren nader te onderzoeken. In hoofdstuk 6 werden 21 recent vervaardigde cellijnen met een zeer laag aantal passages gebruikt voor verder onderzoek naar HLA-G. In deze cellijnen werd gekeken naar de DNA methylatiestatus van het *HLA-G* gen en de aanwezigheid van HLA-G coderend mRNA. Daarbij werd HLA-G membraanexpressie onderzocht middels flowcytometrie en IHC. Voor IHC werd gebruik gemaakt van drie verschillende mAbs (4H84, MEM-G/1 en MEM-G/2). Bovendien werden niet alleen de cellijnen, maar ook de bijbehorende tumoren waarvan de cellijnen waren afgeleid, middels IHC onderzocht. Samenvattend werd er opvallend genoeg geen correlatie gevonden tussen de hoeveelheid DNA methylatie van het *HLA-G* gen en de aanwezigheid van HLA-G coderend mRNA. In de uitgevoerde polymerase chain reaction (PCR) werd in 6 van de 21 cellijnen een zwak signaal gevonden. Na sequensen van het PCR product werd in vier van deze cellijnen een homologie gezien met HLA-G3, een van de HLA-G isovormen. In overeenstemming met de resultaten gevonden met PCR werd geen HLA-G1 expressie waargenomen bij analyse middels flow-cytometrie. Ook werd geen associatie gezien tussen met IHC aankleurende cellijnen en de bijbehorende primaire tumor. Evenals in hoofdstuk 5 werd in hoofdstuk 6 opvallende discrepantie gezien in aankleuring met IHC tussen de drie anti-HLA-G mAbs. Ondanks het feit dat HLA-G als een veelbelovend immune-checkpoint molecuul wordt gezien, kan worden geconcludeerd dat de huidige detectietechnieken nog niet selectief genoeg zijn om alle aspecten van het HLA-G eiwit in colorectale tumoren te ontrafelen. In hoofdstuk 7 werd verder uitgezocht hoe de discrepantie tussen de aankleuring met IHC verklaard zou kunnen worden. De eerder gebruikte cellijnen werden nu nogmaals gebruikt voor

analyse middels de western-blot techniek³⁶. Aanvullend werd de HLA-G expressie bepaald op vers ingevroren colorectale tumorweefsels. De resultaten verkregen met western-blot analyse werden vergeleken met de klassieke IHC methode. Ook in dit hoofdstuk werd gebruikt gemaakt van verschillende mAbs gericht tegen alle HLA-G isovormen, zoals 4H84 en MEM-G/1, en mAb 5A6G7 gericht tegen de oplosbare HLA-G moleculen. In hoofdstuk 7 werd gezien dat de resultaten verkregen met western-blot niet vergelijkbaar zijn met de resultaten verkregen middels IHC op hetzelfde weefsel. Daarbij werden met de western-blot methode additionele eiwit bandjes waargenomen, welke in molecuul gewicht niet corresponderen met HLA-G. Dit fenomeen werd waargenomen in experimenten uitgevoerd met de drie eerder genoemde mAbs. Gebaseerd op hoofdstuk 5, 6 en 7 kan worden geconcludeerd dat de rol van HLA-G als immuun modulator in colorectale tumoren prematuur is. Tot het moment dat het technisch mogelijk is om HLA-G expressie op betrouwbare wijze te detecteren in biologische samples in plaats van in getransfecteerde cellijnen of in langdurig gekweekte cellijnen, zullen conclusies met grote voorzichtigheid getrokken moeten worden en zijn therapeutische implicaties voor het HLA-G eiwit nog niet op zijn plaats.

DEEL III

GENETISCHE EN EPIGENETISCHE BIOMARKERS IN COLORECTALE TUMOREN

Hypomethylatie van het genoom wordt geassocieerd met een nadelige prognose in patiënten met colorectale tumoren³⁷⁻⁴¹. Om genoomwijde hypomethylatie te meten wordt gebruik gemaakt van LINE-1 (Long Interspersed Element-1) als surrogaat marker⁴². LINE-1 repeterende elementen zijn aanwezig op nagenoeg alle chromosomen en beslaan ongeveer 17% van het gehele humane genoom⁴³. In colorectale tumoren zou hypomethylatie geassocieerd zijn met een slechtere prognose⁴⁰. Daarbij werd gezien dat hypomethylatie toeneemt in meer voortgeschreden tumorstadia^{37, 41}. Eerder werd een prognostische waarde gezien in vroeg stadium rectumtumoren. Echter, tot op heden ontbrak gedegen onderzoek in een patiënten cohort bestaande uit specifiek vroeg stadium colontumoren. In hoofdstuk 8 werd de prognostische waarde van LINE-1 methylatiestatus onderzocht in patiënten met stadium II colon tumoren (n=164). Patiënten met een lage LINE-1 methylatiestatus (hypomethylatie) hadden een significant slechtere overleving dan patiënten met een hogere methylatiestatus. Dit effect werd in sterkere mate waargenomen bij patiënten boven de 65 jaar. Deze bevindingen steunen de hypothese dat LINE-1 methylatiestatus gebruikt zou kunnen worden als prognostische marker. Opvallend genoeg werd het waargenomen verschil in overleving niet teruggezien in ziektevrije overleving. Daarom kan op basis van deze studie geen prognostische waarde aan LINE-1 hypomethylatie worden toegeschreven. Ook in de huidige literatuur wordt frequent geen relatie gevonden

tussen overleving en methylatiestatus. Wel wordt hypomethylatie vaak waargenomen en vooral in meer gevorderde ziektestadia^{38, 41, 44}. Het lijkt dus zo te zijn dat algeheel verlies van DNA methylatie een vroege gebeurtenis is in de vorming van colonkanker, in plaats van een bijdragende factor aan progressie van de ziekte. Deze hypothese wordt ondersteund door de resultaten van Pavicic *et al.*⁴⁵. Zij evalueerden de LINE-1 methylatiestatus in normale epitheelcellen van patiënten met hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC), familiere colorectale tumoren en sporadische colorectale tumoren. De laagste methylatiestatus werd gevonden in de normale epitheelcellen van patiënten met familiere colorectale tumoren. Dit suggereert dat de mucosa door de hypomethylatie is gepredisponeerd voor tumor ontwikkeling. Verder zijn interessante studies gepubliceerd over de hypothese dat de methylatiestatus van het DNA in het colon een leeftijdsgebonden aspect heeft^{46, 47}. Dit suggereert dat het verlies van DNA methylatie toeneemt met de leeftijd en derhalve bijdraagt aan de stijgende incidentie van colorectale tumoren met de leeftijd^{48, 49}. Door het toenemende verlies van DNA methylatie met de leeftijd kan de leeftijd van een persoon geschat worden op basis van het verlies aan methylatie. Beschreven werd dat een discrepantie tussen kalenderleeftijd en geschatte leeftijd op basis van DNA methylatie (bijvoorbeeld; de voorspelde leeftijd op basis van methylatiestatus is hoger dan de huidige kalenderleeftijd) is geassocieerd met een hogere mortaliteit^{48, 49}. Op basis van deze literatuur zou globale hypomethylatie kunnen functioneren als een "hit" in de "multi-hit hypothese" van Knudson. Hierom zou globale hypomethylatie meer beschouwd kunnen worden als een "driver" van carcinogenese, in plaats van een prognostische factor zoals beschreven werd gezien in hoofdstuk 8.

Een ander zeer bekende genetische marker die bijdraagt aan colorectale kankerformatie is MSI (microsatelliet instabiliteit). MSI is geassocieerd met een prognostisch voordeel in vroeg stadium colorectale tumoren⁵⁰⁻⁵². Bovendien werd in patiënten met MSI colontumor resistentie tegen 5-FU gebaseerde chemotherapie gezien⁵¹⁻⁵⁴. Daarom werd zeer recent standaard screening op MSI aangeraden door de richtlijnen van de American Society of Clinical Oncology (ASCO) en de European Society for Medical Oncology (ESMO)^{55, 56}. In tegenstelling tot colontumoren zijn de implicaties van MSI in rectumtumoren tot op heden niet opgehelderd. Dit is echter zeer relevant om toe te kunnen werken naar gepersonaliseerde behandelstrategieën gedreven door biomarkers. Door de relatief lage incidentie van MSI in rectumtumoren bestaat er gelimiteerd bewijs aangaande de prognostische en predictieve waarde van MSI in rectumtumoren. Daarom werden in hoofdstuk 9 de prevalentie en de prognostische waarde van MSI bepaald in het tot nu toe grootste cohort van patiënten met rectumtumoren. Deze patiënten waren eerder geïncludeerd in twee prospectieve fase III studies (TME trial en PROCTOR-SCRIPT trial). In lijn met de reeds bestaande literatuur werd MSI gevonden

in 3.8% van de patiënten met rectumtumoren. Zowel op de overleving als het ontstaan van afstandsmetastasen of lokale recidieven werd geen verschil gevonden tussen patiënten met MSI of MSS rectumtumoren. Zoals beschreven in hoofdstuk 9, is de literatuur rondom de prognostische waarde van MSI in rectumtumoren conflicterend. Bijvoorbeeld Colombino *et al.* beschrijft een significant betere overleving voor patiënten met MSI rectumtumoren⁵⁷. Daarentegen wordt door bijvoorbeeld Samowitz *et al.* een significant slechtere overleving beschreven voor patiënten met MSI rectumtumoren⁵⁸. De laatste decennia is de behandeling van rectumtumoren sterk veranderd. Door de verandering in behandelstrategie is het lastig om de bestaande literatuur te vergelijken. Hierdoor bestaat een gebrek aan bewijs voor patiënten met MSI of MSS rectumtumoren behandeld met de huidige conventionele therapie. Samenvattend zijn MSI rectumtumoren een aparte subklasse van colorectale tumoren. Gezien de lage incidentie van MSI in rectumtumoren zal het echter een uitdaging zijn om de invloed van MSI op prognose geheel te kunnen evalueren.

TOEKOMSTPERSPECTIEF

Het baseren van behandelstrategieën op enkel de huidige TNM classificatie heeft niet de potentie om de meest optimale en meer geïndividualiseerde patiëntenzorg te leveren. De conventionele stadiëring moet daarom aangevuld worden met biomarkers om zodoende meer 'personalized medicine' toe te kunnen passen. Ondanks intensief onderzoek naar genetische, epigenetische, moleculaire en pathologische markers schiet de klinische toepassing van biomarkers in de dagelijkse praktijk tekort. Gedurende het proces van tumorontwikkeling verwerven tumorcellen meerdere eigenschappen. Daarom zouden meerdere biomarkers gecombineerd moeten worden voor prognostische en predictieve doeleinden. Het gebruik van een enkele prognostische of predictieve biomarker is zeker niet afdoende. Daarbij zou biomarkeronderzoek waardevoller worden wanneer het uitgevoerd kan worden op biopten genomen voor de start van de behandeling, in het bijzonder voor rectumtumoren. Informatie verkregen uit biopten zou de timing en toepassing van preoperatieve behandeling kunnen beïnvloeden. Door de huidige behandeling van rectumtumoren met preoperatieve (chemo)radiatie en TME chirurgie is het aantal lokale recidieven flink gedaald. Een groot effect op algehele overleving werd echter nog niet waargenomen. Zoals beschreven in hoofdstuk 2 laat de toevoeging van adjuvante chemotherapie na behandeling met preoperatieve (chemo)radiatie en TME chirurgie geen verbetering zien op de overleving. Een alternatief voor het elimineren van micrometastasen in de behandeling van rectumtumoren zou systemische therapie voorafgaand aan de operatie kunnen zijn. Deze verschuiving naar meer intensievere

preoperatieve behandeling is op dit moment gaande en de resultaten hiervan zullen worden beschreven in de RAPIDO trial. Preoperatieve therapie wordt beter verdragen dan postoperatieve therapie. Bovendien wordt bij meer intensievere preoperatieve behandeling van rectumtumoren een complete pathologische respons waargenomen in ongeveer 30% van de patiënten. Daaruit rijst de vraag of een grote operatie vermeden zou kunnen worden in patiënten met een rectumtumor. De zogenoemde 'watch-and-wait' benadering geïntroduceerd door Harb-Gama en recent beschreven door van der Valk *et al.* laat zien dat in een strikt geselecteerde patiënten met een complete pathologische respons de watch-and-wait benadering sterk te overwegen valt^{59, 60}. Een andere veelbelovende toekomstige toepassing van biomarkers in de behandeling van colorectale tumoren is het peroperatief visualiseren van tumorweefsel. Door middel van tumor-specifiek contrastmiddel, zoals Surgimab (een monoclonaal antilichaam met fluorescent label gericht tegen het carcinoembryonisch antigeen (CEA)) kan tumorweefsel in real-time worden gevisualiseerd om zodoende radicale resectie te bewerkstelligen⁶¹. De ultieme uitdaging voor de komende jaren is om kennis rondom het voorspellen van therapierespons in patiënten met een rectumtumor te vergaren door klinische, pathologische en moleculaire markers te combineren. Daarvoor zal intensieve samenwerking nodig zijn tussen de verschillende medisch specialisten om zodoende de meest effectieve therapie toe te passen, toegespitst op de individuele patiënt in plaats van een patiëntengroep.

REFERENTIES

1. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 638-646.
2. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2343-2351.
3. Andre T, Boni C, Navarro M et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3109-3116.
4. Andre T, Sargent D, Tabernero J et al. Current issues in adjuvant treatment of stage II colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 887-898.
5. Akasu T, Moriya Y, Ohashi Y et al. Adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for pathological stage III rectal cancer after mesorectal excision with selective lateral pelvic lymphadenectomy: a multicenter randomized controlled trial. *Jpn J Clin Oncol* 2006; 36: 237-244.
6. Petersen SH, Harling H, Kirkeby LT et al. Postoperative adjuvant chemotherapy in rectal cancer operated for cure. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; CD004078.
7. Bosset JF, Calais G, Mineur L et al. Fluorouracil-based adjuvant chemotherapy after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: long-term results of the EORTC 22921 randomised study. *Lancet Oncol* 2014; 15: 184-190.
8. Breugom AJ, van Gijn W, Muller EW et al. Adjuvant chemotherapy for rectal cancer patients treated with preoperative (chemo)radiotherapy and total mesorectal excision: a Dutch Colorectal Cancer Group (DCCG) randomized phase III trial. *Ann Oncol* 2015; 26: 696-701.
9. Glynne-Jones R, Counsell N, Quirke P et al. Chronicle: results of a randomised phase III trial in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation randomising postoperative adjuvant capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) versus control. *Ann Oncol* 2014; 25: 1356-1362.
10. Sobin L H GMK, Wittekind Ch. TNM classification of malignant tumours Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ : Wiley-Blackwell, 2010.
11. Puppa G, Sonzogni A, Colombari R, Pelosi G. TNM staging system of colorectal carcinoma: a critical appraisal of challenging issues. *Arch Pathol Lab Med* 2010; 134: 837-852.
12. Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T et al. 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.
13. Atkins D, Breuckmann A, Schmahl GE et al. MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 109: 265-273.
14. Momburg F, Degener T, Bacchus E et al. Loss of HLA-A,B,C and de novo expression of HLA-D in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 1986; 37: 179-184.
15. 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.
16. Engelen SM, Maas M, Lahaye MJ et al. Modern multidisciplinary treatment of rectal cancer based on staging with magnetic resonance imaging leads to excellent local control, but distant control remains a

- challenge. *Eur J Cancer* 2013; 49: 2311-2320.
17. Sauer R, Liersch T, Merkel S et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol* 2012; 30: 1926-1933.
 18. van Gijn W, Marijnen CA, Nagtegaal ID et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol* 2011; 12: 575-582.
 19. Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer* 2012; 118: 628-638.
 20. Chand M, Siddiqui MR, Swift I, Brown G. Systematic review of prognostic importance of extramural venous invasion in rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 1721-1726.
 21. Choi HJ, Park KJ, Shin JS et al. Tumor budding as a prognostic marker in stage-III rectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 863-868.
 22. Knijn N, Mogk SC, Teerenstra S et al. Perineural Invasion is a Strong Prognostic Factor in Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Am J Surg Pathol* 2016; 40: 103-112.
 23. Nikberg M, Chabok A, Letocha H et al. Lymphovascular and perineural invasion in stage II rectal cancer: a report from the Swedish colorectal cancer registry. *Acta Oncol* 2016; 55: 1418-1424.
 24. Quah HM, Chou JF, Gonen M et al. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 503-507.
 25. Petrelli F, Pezzica E, Cabiddu M et al. Tumour Budding and Survival in Stage II Colorectal Cancer: a Systematic Review and Pooled Analysis. *J Gastrointest Cancer* 2015; 46: 212-218.
 26. Park JH, Yoon SM, Yu CS et al. Randomized phase 3 trial comparing preoperative and postoperative chemoradiotherapy with capecitabine for locally advanced rectal cancer. *Cancer* 2011; 117: 3703-3712.
 27. Glimelius B. Optimal Time Intervals between Pre-Operative Radiotherapy or Chemoradiotherapy and Surgery in Rectal Cancer? *Front Oncol* 2014; 4: 50.
 28. Erlandsson J, Holm T, Pettersson D et al. Optimal fractionation of preoperative radiotherapy and timing to surgery for rectal cancer (Stockholm III): a multicentre, randomised, non-blinded, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol* 2017; 18: 336-346.
 29. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
 30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674.
 31. Reimers MS, Engels CC, Putter H et al. Prognostic value of HLA class I, HLA-E, HLA-G and Tregs in rectal cancer: a retrospective cohort study. *BMC Cancer* 2014; 14: 486.
 32. Watson NF, Ramage JM, Madjd Z et al. Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int. J. Cancer* 2006; 118: 6-10.
 33. Zeestraten EC, Reimers MS, Saadatmand S et al. Combined analysis of HLA class I, HLA-E and HLA-G predicts prognosis in colon cancer patients. *Br. J. Cancer* 2014; 110: 459-468.
 34. Polakova K, Kuba D, Russ G. The 4H84 monoclonal antibody detecting beta2m free nonclassical HLA-G molecules also binds to free heavy chains of classical HLA class I antigens present on activated

- lymphocytes. *Hum Immunol* 2004; 65: 157-162.
35. Apps R, Gardner L, Moffett A. A critical look at HLA-G. *Trends Immunol* 2008; 29: 313-321.
 36. Swets M, Seneby L, Boot A et al. Promoter methylation and mRNA expression of HLA-G in relation to HLA-G protein expression in colorectal cancer. *Hum Immunol* 2016; 77: 764-772.
 37. Baba Y, Huttenhower C, Nosho K et al. Epigenomic diversity of colorectal cancer indicated by LINE-1 methylation in a database of 869 tumors. *Mol Cancer* 2010; 9: 125.
 38. Benard A, van de Velde CJ, Lessard L et al. Epigenetic status of LINE-1 predicts clinical outcome in early-stage rectal cancer. *Br J Cancer* 2013; 109: 3073-3083.
 39. Mima K, Nowak JA, Qian ZR et al. Tumor LINE-1 methylation level and colorectal cancer location in relation to patient survival. *Oncotarget* 2016.
 40. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ et al. A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1734-1738.
 41. Sunami E, de Maat M, Vu A et al. LINE-1 hypomethylation during primary colon cancer progression. *PLoS One* 2011; 6: e18884.
 42. Yang AS, Estecio MR, Doshi K et al. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e38.
 43. Lander ES, Linton LM, Birren B et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
 44. Murata A, Baba Y, Watanabe M et al. Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2013; 109: 408-415.
 45. Pavicic W, Joensuu EI, Nieminen T, Peltomaki P. LINE-1 hypomethylation in familial and sporadic cancer. *J Mol Med (Berl)* 2012; 90: 827-835.
 46. Ahuja N, Issa JP. Aging, methylation and cancer. *Histol Histopathol* 2000; 15: 835-842.
 47. Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A et al. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell* 2006; 9: 199-207.
 48. Lin Q, Weidner CI, Costa IG et al. DNA methylation levels at individual age-associated CpG sites can be indicative for life expectancy. *Aging (Albany NY)* 2016; 8: 394-401.
 49. Marioni RE, Shah S, McRae AF et al. DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life. *Genome Biol* 2015; 16: 25.
 50. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer* 2010; 46: 2788-2798.
 51. Hutchins G, Southward K, Handley K et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1261-1270.
 52. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3219-3226.
 53. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 609-618.
 54. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from

- fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 247-257.
55. Balmana J, Balaguer F, Cervantes A et al. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2013; 24 Suppl 6: vi73-80.
 56. Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines. *J Clin Oncol* 2015; 33: 209-217.
 57. Colombino M, Cossu A, Manca A et al. Prevalence and prognostic role of microsatellite instability in patients with rectal carcinoma. *Ann Oncol* 2002; 13: 1447-1453.
 58. Samowitz WS, Curtin K, Wolff RK et al. Microsatellite instability and survival in rectal cancer. *Cancer Causes Control* 2009; 20: 1763-1768.
 59. Habr-Gama A, de Souza PM, Ribeiro U, Jr. et al. Low rectal cancer: impact of radiation and chemotherapy on surgical treatment. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 1087-1096.
 60. van der Valk MJM, Hilling DE, Bastiaannet E et al. Long-term outcomes of clinical complete responders after neoadjuvant treatment for rectal cancer in the International Watch & Wait Database (IWW): an international multicentre registry study. *Lancet* 2018; 391: 2537-2545.
 61. Boogerd LSF, Hoogstins CES, Schaap DP et al. Safety and effectiveness of SGM-101, a fluorescent antibody targeting carcinoembryonic antigen, for intraoperative detection of colorectal cancer: a dose-escalation pilot study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2018; 3: 181-191.