



## Samenvatting van het proefschrift

R.R.J. Coebergh van den Braak

*"Colon Cancer the clinical significance of molecular biomarkers"*

**Promotiedatum:** 31 januari 2018

**Universiteit:** Erasmus Universiteit Rotterdam

**Promotor:**

Prof. dr. J.N.M. IJzermans

**Copromotor:**

Prof. dr. J.W.M. Martens

De studies in dit proefschrift richten zich op de identificatie en validatie van moleculaire biomarkers waarmee identificatie mogelijk is van patiënten met een vroeg stadium coloncarcinoom die na een curatieve resectie een hoog risico lopen op het ontwikkelen van recidief ziekte. Dergelijke biomarkers zullen het mogelijk maken om therapie op maat succesvoller toe te passen.

Darmkanker wordt in veel ziekenhuizen behandeld. Bij het doen van onderzoek naar darmkanker is het belangrijk om standaardprocedures te ontwikkelen die in ieder ziekenhuis kunnen worden toegepast. In **Hoofdstuk 2** laten wij zien dat het snel invriezen van vers tumormateriaal in veel ziekenhuizen goed mogelijk is met behoud van hoogwaardige kwaliteit van het materiaal. Ruim 90% van de willekeurig onderzochte biopten uit het MATCH-onderzoek waren van zeer hoge kwaliteit waardoor het toepassen van onderzoekstechnieken zoals high throughput RNA sequencing mogelijk zijn. RNA sequencing data moet volgens een aantal stappen inclusief een normalisatiestap worden verwerkt voordat verdere analyses kunnen worden verricht. De huidige normalisatiemethoden maken het mogelijk om verschillen in genexpressie binnen één biopt óf verschillen in genexpressie tussen biopten te onderzoeken afhankelijk van het wel of niet corrigeren voor genlengte. In **Hoofdstuk 3** introduceren wij GeTMM (Gene length corrected Trimmed Mean of M-values), een nieuwe normalisatiemethode waarmee beide type analyses kunnen worden uitgevoerd door het combineren van de voordelen van twee normalisatiemethoden. De analyses lieten zien dat de uitkomsten van GeTMM niet worden beïnvloed door RNA kwaliteit of GC-inhoud. Bovendien zijn de uitkomsten beter dan de meest gebruikte normalisatiemethoden (EdgeR, DESeq2 en TPM), wanneer de genormaliseerde data vergeleken wordt met RT-qPCR expressedata. Genlengte correctie bleek een belangrijke invloed te hebben op het voorspellen van de CMS

classificatie, een belangrijke bevinding die meegewogen moet worden als CMS groepen worden voorspeld op basis van RNA sequencing data.

In **Hoofdstuk 4** laten we zien dat CMS4 (het mesenchymale subtype) vaker voor komt in meer gevorderde stadia van het colorectaal carcinoom, en dat het aantal onderzochte klieren in de onderzochte patiënten vaak te laag was om betrouwbaar stadium II van stadium III te onderscheiden. Het aantal onderzochte lymfklieren had invloed op de prognostische waarde van de CMS classificatie in het samengesteld cohort van patiënten met stadium II coloncarcinoom die geen adjuvante chemotherapie hebben ontvangen. CMS4 was alleen geassocieerd met een slechtere overleving in die patiënten waarbij te weinig klieren waren onderzocht, en niet in de patiënten waarbij voldoende lymfklieren onderzocht waren. Dit suggereert dat de migratie van kankercellen naar de lymfklieren een belangrijke rol speelt in de uitkomst voor de patiënt en invloed heeft op de prognostische waarde van CMS bij patiënten met een coloncarcinoom.

In **Hoofdstuk 5** presenteren wij een systematische analyse naar pathogenetisch relevante oncogene fusiegenen. Hierbij werden twee bekende *BRAF* fusies en één nieuwe *BRAF* fusie gevonden in tumoren die geen *BRAF*-mutatie hadden. Daarnaast werden er vier andere relevante fusies gevonden: een *RRBP1-RET* fusie, een *EML4-NTRK3* fusie, een *USP9X-ERAS* fusie en een *EIF3E-RSPO2* fusie. De tumor die de *RET*-fusie bevatte, had geen andere ‘driver’ mutaties waardoor de fusie een aantrekkelijk doelwit voor gerichte therapie is. De *ERAS*-fusie was interessant, omdat de fusie tot stand was gekomen door chromothripsis en omdat het *ERAS* eiwit normaal alleen tot expressie komt in embryonale cellen. De lage frequentie van R-spondin fusies in dit goed gedefinieerde patiënten cohort nuanceert de eerder gerapporteerde incidentie van 10% in een ander, kleiner cohort van patiënten met darmkanker. Alle fusies resulteerden in een verhoogde mRNA expressie, en fusies die werden geïntroduceerd in cellijnen lieten een verhoogde oncogene activiteit zien wat het oncogene potentieel van de fusies onderstreepte.

**Hoofdstuk 6** beschrijft de bevindingen betreffende de prognostische waarde van *SYK* en de *SYK* splice varianten *SYK(S)* en *SYK(L)*. De expressieverschillen tussen MSI en MSS tumoren, en tussen tumoren met en zonder een *BRAF* en/of *PTEN* mutatie suggereerde een verschillende rol voor totaal *SYK* [*SYK(T)*] en de *SYK* splice varianten in hypergemuteerde en niet-hypergemuteerde tumoren. Verder was hoge expressie van *SYK(S)* geassocieerd met een slechte levermetastasevrije overleving bij patiënten met stadium I-II coloncarcinoom die alleen met een operatie werden behandeld. Deze associatie werd niet bevestigd in twee kleinere, onafhankelijke, minder goed gedefinieerde cohorten. Verder onderzoek naar de rol van *SYK* en de splice varianten bij het colorectaal carcinoom is nodig.

In **Hoofdstuk 7** beschrijven wij de validatie van een metastase-specifieke signatuur, een combinatie van *Let-7i* en *miR-10b* expressie, in een cohort dat vrijwel identiek was aan het cohort dat gebruikt werd in hoofdstuk 7. Daarnaast werd *miR-30b* geïdentificeerd als additionele prognostische marker. Het toevoegen van deze marker aan de bestaande signatuur (gemodificeerde signatuur) vergrootte het onderscheidend vermogen van de signatuur wat betreft de metastasevrije overleving in dit cohort. Een additionele analyse liet zien dat *Let-7i* expressie geassocieerd was met celadhesie, celmigratie en celmotiliteit,

en met de hedgehog, Wnt en TGF- $\beta$  signaaltransductieroutes. *MiR-30b* expressie was geassocieerd met axon geleiding. Vervolgstudies zullen moeten worden uitgevoerd om de prognostische waarde van de gemodificeerde signatuur te valideren.

In **hoofdstuk 8** wordt het studieprotocol van het Prospectief Landelijk ColoRectaal Carcinoom cohort (PLCRC) samengevat. Dit landelijke cohortonderzoek is een onderzoeksinitiatief dat gestructureerd data, weefsel, en patiëntrapporteerde uitkomsten verzameld van patiënten met een colorectaal carcinoom om de uitkomsten van patiënten met deze ziekte te verbeteren. De klinische data worden opgevraagd bij de Nederlandse kankerregistratie, die werd gereviseerd en uitgebreid om onderzoek te kunnen faciliteren. Het verzamelen van weefsel en bloed gebeurt in samenwerking met de lokale pathologie- en chemielaboratoria. De vragenlijsten worden uitgestuurd en ingenomen door PROFIEL, een nationaal, vanuit onderzoek gedreven initiatief op het gebied van kwaliteit van leven. Patiënten kunnen optioneel toestemming geven voor de verzameling en opslag van weefsel, bloedafnames, het ontvangen van vragenlijsten over kwaliteit van leven en het in de toekomst uitgenodigd worden voor interventiestudies. Dit unieke initiatief maakt het mogelijk homogene patiëntcohorten te selecteren voor bijvoorbeeld de identificatie en validatie van moleculaire biomarkers waarmee patiënten met een vroeg stadium coloncarcinoom die recidief ziekte zullen ontwikkelen na curatieve chirurgie kunnen worden geïdentificeerd.

**Hoofdstuk 9** beschrijft de samenwerking tussen PLCRC en twee vergelijkbare initiatieven op het gebied van het pancreascarcinoom (PACAP), en het slokdarm- en maagcarcinoom (POCOP): het 3P initiatief. In dit hoofdstuk gaven wij het belang en de onvermijdelijkheid aan van intensieve samenwerking tussen organisaties op het gebied van dataregistratie, kwaliteit van leven vragenlijsten en IT onderzoeksinfrastructuur om kankeronderzoek te bevorderen. We bespraken de mogelijkheden die deze cohorten bieden zoals het uitvoeren van een onderzoek volgens innovatieve onderzoeksmethoden zoals het ‘cohort multiple randomized controlled trial’. Daarnaast bespraken we de uitdagingen zoals het verkrijgen van structurele financiering en het ontwerpen van een robuuste, breed ondersteunde bestuursstructuur die mee kan evolveren met de zich ontwikkelde platformen. Daarnaast werd de progressie besproken die gemaakt is in de eerste jaren van PLCRC zoals de overeenkomst met de METC over het afnemen van bloed om observationeel onderzoek waarbij bloedafnames worden gebruikt beter te faciliteren. Na het geven van toestemming voor PCLRC mogen er per jaar 10 buizen worden afgenomen in het kader van onderzoek zonder dat hiervoor opnieuw toestemming moet worden gevraagd bij de METC. Het 3P initiatief zal naar verwachting de inclusieperiode voor onderzoeken verkorten waardoor snellere resultaten worden behaald en de voortgang in het kankeronderzoek wordt versneld.