

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/32781> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Benard, Anne

Title: Epigenetic prognostic biomarkers in colorectal cancer

Issue Date: 2015-04-21

Appendices

Nederlandse samenvatting

List of publications

Curriculum Vitae

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

Darmkanker is wereldwijd één van de meest voorkomende soorten van kanker, en neemt een tweede plaats in als het gaat om sterfte door kanker in Europa (1). Ongeveer twee derde van de colorectale tumoren (dikkedarmkanker) ontstaat in het colon, en een derde in het rectosigmoid of rectum. Colorectale tumoren worden geclassificeerd met behulp van het “tumor, nodes and metastasis” (TNM) stageringssysteem (2,3), en vervolgens wordt aan de hand van de geldende richtlijnen bepaald hoe de patiënt behandeld wordt. Colorectale tumoren worden primair verwijderd door middel van een operatie. Daarnaast wordt aan een deel van de patiënten aanvullende behandelingen gegeven in de vorm van chemotherapie en/of bestraling. Met de introductie van pre-operatieve bestraling en de “total mesorectal excision” (TME) operatietechniek voor rectale tumoren, is het percentage van patiënten bij wie de tumor lokaal terugkeert gereduceerd van 11% naar 5% (4). Dit houdt echter ook in dat een groot deel van de patiënten (minimaal 94%) onnodig behandeld wordt met pre-operatieve bestraling, met kans op bijwerkingen zoals seksuele dysfunctie of incontinentie (5,6). De huidige TNM classificatie van colorectale tumoren is vooralsnog ontoereikend, aangezien patiënten met tumoren in hetzelfde stadium grote verschillen laten zien in overleving en het terugkeren van een tumor (7). Er is dus een grote behoefte aan biomarkers die kunnen helpen bij het identificeren van hoog-risicopatiënten en bij het bepalen van de behandelingsstrategie. Biomarkers zijn biologische markers die gemeten kunnen worden in bijvoorbeeld bloed of tumorweefsel, en die gebruikt kunnen worden als indicatoren voor de aanwezigheid en het verloop van pathologische processen of om de respons op therapie te bepalen. Tot op heden is maar een klein aantal biomarkers goedgekeurd voor gebruik in de kliniek, waaronder “carcinoembryonisch antigeen” (CEA) in het bloed voor post-operatieve monitoring en KRAS mutaties voor het eventueel toedienen van anti-EGFR therapie (8,9). Vele andere biomarkers zijn beschreven, maar er is voor deze markers onvoldoende bewijs om deze in de kliniek te gebruiken. Voor het vinden van klinisch relevante biomarkers is het begrijpen van de onderliggende tumorbiologie van groot belang. Met deze informatie van individuele tumoren kan per patiënt gekeken worden wat het risicoprofiel is en kunnen nieuwe therapieën ontwikkeld worden die ingrijpen op de in de tumor verstoorde processen.

Doel van dit proefschrift

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift richt zich op het vinden van nieuwe prognostische biomarkers in colorectale tumoren op het gebied van epigenetische mechanismen, die kunnen voorspellen wat het klinisch verloop zal zijn met betrekking tot lokaal terugkeren of metastasering (uitzaaien) van de tumor en overleving van de patiënt.

Genetische en epigenetische veranderingen in tumoren

Een kankercel ontstaat doordat een serie van opeenvolgende veranderingen plaatsvindt, die ervoor zorgen dat de cel zich ongeremd kan vermenigvuldigen, niet dood gaat, en waardoor de cel kan metastaseren (uitzaaien) naar andere organen. Deze eigenschappen zijn beschreven door Hanahan en Weinberg als de “hallmarks of cancer” (10,11). De veranderingen die leiden tot

tumorvorming kunnen hun oorsprong vinden op genetisch niveau, door bijvoorbeeld mutaties in specifieke genen, zoals beschreven in een model voor colorectale tumoren door Vogelstein (12). Deze veel voorkomende mutaties zijn in veel tumoren aanwezig, maar verklaren niet het ontstaan van alle tumoren.

Naast veranderingen in het DNA, is er in het wetenschappelijk onderzoek steeds meer aandacht voor de regulatie van genexpressie door epigenetische mechanismen. Epigenetica betreft de wetenschap die veranderingen in een organisme door modificatie van de genexpressie bestudeert, die niet worden veroorzaakt door veranderingen in de onderliggende DNA sequentie. De epigenetische mechanismen die in dit proefschrift aan bod komen beïnvloeden de genexpressie via regulatie van de lokale structuur van chromatine, het complex van histon eiwitten waar het DNA omheen gewikkeld is. In een “open” chromatine structuur kunnen transcriptiefactoren binden aan de specifieke genen in het DNA, wat vervolgens resulteert in expressie van het betreffende gen. Is de chromatinestructuur echter gesloten, zal er geen genexpressie plaatsvinden. De chromatinestructuur wordt gereguleerd door het toevoegen of verwijderen van chemische groepen aan het DNA (DNA-methylering) of aan histon-eiwitten (histonmodificaties). Deze modificaties worden hieronder verder besproken. Veranderingen in deze epigenetische mechanismen zijn in verschillende typen tumoren beschreven (13,14).

DNA-methylering

De modificatie van DNA door het toevoegen van methylgroepen op Cytosines (DNA-methylering) vertoont een specifiek patroon voor elk celtype (15,16) en is betrokken bij vele functies in de cel, zoals het uitschakelen van één van de twee X-chromosomen bij vrouwen, het onderdrukken van repetitieve sequenties en de regulatie van cellulaire differentiatie (17). DNA-methylering beschermt tegen het spontaan ontstaan van mutaties (18) en speelt ook een belangrijke rol tijdens de embryonale ontwikkeling, waar in de verschillende stadia op het juiste moment verschillende sets van genen tot expressie moeten komen (19,20).

In tumorcellen vinden een aantal veranderingen plaats in DNA-methylering ten opzichte van normale cellen. Op globaal niveau neemt de hoeveelheid DNA-methylering af (21), wat resulteert in activatie van sequenties die normaal gesproken onderdrukt worden, zoals repetitieve sequenties en oncogenen die celdeling bevorderen en celdood tegengaan (22-25). Daarentegen kunnen sequenties die normaal gesproken actief zijn (geen DNA-methylering aanwezig), waaronder tumorsuppressor genen, juist gemethyleerd worden waardoor deze niet meer tot expressie komen. De prognostische waarde van DNA-methylering van vele genen is inmiddels beschreven in verschillende tumoren (26-29).

In dit proefschrift worden zowel globale als gen-specifieke veranderingen in DNA-methylering besproken. In **hoofdstuk 2** wordt beschreven dat een lage mate van DNA-methylering in rectumtumoren op de repetitieve sequentie “long interspersed element 1” (LINE-1, dat 17% van het humane genoom beslaat) gecorreleerd is met kortere overleving en een grotere kans op het terugkeren van de tumor bij patiënten met rectumtumoren. LINE-1 sequenties, indien geactiveerd door verlies van DNA-methylering, kunnen zichzelf verplaatsen in het genoom en daarmee andere genen verstoren, wat kan leiden tot tumorvorming. Ook kan de DNA-methylering van omliggende genen worden veranderd door de aan- of afwezigheid van DNA-methylering op de LINE-1 sequenties, wat kan leiden tot bijvoorbeeld activatie van oncogenen.

DNA-methylering op een andere repetitieve sequentie, Alu (short interspersed elements), was niet voorspellend voor overleving en/of terugkeer van de tumor, wat aangeeft dat de gevonden correlatie voor LINE-1 methylering specifiek is voor deze sequentie. Op gen-specifiek niveau wordt in **hoofdstuk 3** beschreven dat methylering van drie genen betrokken bij apoptose (geprogrammeerde celdood), namelijk Apaf1, Bcl2 en p53, in rectumtumoren voorspellend is voor de overleving van de patiënt en terugkeer van de tumor. Een combinatie van veel celdood maar tegelijkertijd ook veel celdeling was gecorreleerd met de slechtste overleving en de hoogste kans op terugkeer van de tumor.

De studies in deze twee hoofdstukken laten zien dat DNA-methylering op zowel genoom-wijd als op gen-specifiek niveau prognostische waarde heeft in rectumtumoren. Een goede risico-inventarisatie voor individuele patiënten zal verkregen kunnen worden door het bepalen van DNA-methylering van de beschreven factoren in bijvoorbeeld biopsieweefsels.

Histonmodificaties

Acht histon-eiwitten vormen in vier paren een kern van eiwitten waar het DNA omheen gewikkeld is. Het uiteinde van deze histon-eiwitten kan gemodificeerd worden door de toevoeging of verwijdering van onder andere methyl- en acetylgroepen. Histon-acetylering is geassocieerd met een open chromatinestructuur en dus activatie van genexpressie. Wat betreft methylering van histon-eiwitten bepaalt de specifieke locatie van methylgroepen op de histon-eiwitten het effect van deze modificatie: 3 methylgroepen op het vierde aminozuur (lysine, K) op histon H3 (H3K4me3) zijn bijvoorbeeld activerend, terwijl diezelfde groepen op aminozuur 27 op histone H3 (H3K27me3) juist geassocieerd zijn met een gesloten chromatinestructuur en dus genexpressie tegengaan. Daarbij is het aantal methylgroepen (een, twee of drie) dat wordt toegevoegd ook van belang voor hun specifieke functie in de cel (30). De specifieke histonmodificaties worden toegevoegd of verwijderd door zogenaamde histon-modificerende eiwitten, waaronder DNA methyltransferases (DNMTs) die methylgroepen toevoegen aan het DNA en histon deacetylases (HDACs) die acetylgroepen verwijderen van histon-eiwitten. Veranderingen in expressie van deze modificerende eiwitten, met als gevolg veranderingen in de aanwezigheid van bepaalde histonmodificaties, zijn veelvuldig gerapporteerd in verschillende tumoren (31,32), en hebben ook prognostische waarde (33-36).

In dit proefschrift zijn een aantal studies beschreven waarin is gekeken naar globale expressie van histonmodificaties en de bijbehorende histon-modificerende eiwitten. **Hoofdstuk 4** beschrijft de prognostische waarde van histon deacetylases SIRT1, HDAC1 en HDAC2 samen met histonmodificaties H3K56Ac en H4K16Ac in colorectale tumoren, allen betrokken bij reparatie van het DNA en het onderdrukken van onder ander repetitieve sequenties. Hoge expressie van de combinatie van de drie histon deacteylases met een van beide histonmodificaties was geassocieerd met betere overleving en een kleinere kans op terugkeer van de tumor. In **hoofdstuk 5** wordt de prognostische waarde van Polycomb eiwitten EZH2, BMI1 and SUZ12 samen met de geassocieerde histonmodificatie H3K27me3 in colorectale tumoren beschreven. Hoge expressie van deze Polycomb eiwitten en H3K27me3 was gecorreleerd met betere overleving en een kleinere kans op terugkeer van de tumor. Expressie van histonmodificaties H3K4me3, H3K9me3 en H4K20me3, zoals beschreven in **hoofdstuk 6**, had alleen prognostische waarde in stadium I en II colon tumoren. Lage expressie van H3K4me3 en hoge expressie van H3K9me3

en H4K20me3 waren geassocieerd met een goede prognose, zowel in individuele marker analyses als in gecombineerde analyses.

Histonmodificaties hebben ook op gen-specifiek niveau predictieve waarde. In **hoofdstuk 7** wordt beschreven dat de aanwezigheid van activerende of onderdrukkende histonmodificaties invloed heeft op de genexpressie van apoptose genen en daarmee op de gevoeligheid van colorectale cellijnen voor chemotherapie, immuuntherapie of bestraling. Expressie van apoptose genen, door de aanwezigheid van activerende histonmodificaties, was gecorreleerd met een goede respons (celdood) op het toedienen van de verschillende therapieën.

In de beschreven studies naar histonmodificaties zijn verschillende prognostische factoren geïdentificeerd in colorectale tumoren. Deze studies onderstrepen het combineren van meerdere markers en dus op signaleringsroute-gerichte benaderingen (pathways) om de onderliggende tumorbiologie te kunnen ontrafelen. Vervolgstudies zullen zich dus ook moeten richten op het combineren van meerdere (epigenetische) therapieën om een beter behandelingseffect te verkrijgen. De bepaling van de aanwezigheid van histonmodificaties in biopsieweefsel kan belangrijke informatie opleveren wat betreft de keuze voor therapie voor individuele patiënten. Kennis van de regulatie van specifieke genen, zoals beschreven in het laatste hoofdstuk, zal in de toekomst hopelijk leiden tot het ontwikkelen van meer specifieke epigenetische therapieën, die gericht zijn op het behandelen van individuele tumoren.

Toekomstperspectieven

Vanwege de dynamische eigenschappen van epigenetische modificaties, die op elk moment toegevoegd of verwijderd kunnen worden afhankelijk van de behoeften van de cel, zijn epigenetische mechanismen aantrekkelijke kandidaten voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën. Epigenetische therapieën gericht op DNA-methylering (37,38) of histon deacetylases (39,40) worden momenteel getest in klinische trials. Tot op heden zijn deze therapieën echter voornamelijk effectief in hematologische ziekten (leukemieën), maar beduidend minder in solide (waaronder colorectale) tumoren. Voor het ontwikkelen van effectievere therapieën voor individuele patiënten met colorectale tumoren, is kennis van de onderliggende tumorbiologie essentieel. Ook zullen signaleringsroute-gerichte benaderingen belangrijk zijn in het identificeren van prognostische en predictieve biomarkers in colorectale tumoren. Multidisciplinair onderzoek, waarbij klinici en onderzoekers nauw samenwerken, is hierbij van groot belang, om kennis uit het wetenschappelijk onderzoek te kunnen toepassen en potentieel nieuwe behandelingen te testen in klinische studies. Klinisch relevante biomarkers zullen moeten worden toegevoegd aan de classificatiesystemen die momenteel in de kliniek gebruikt worden, zoals het TNM classificatiesysteem. Identificatie en toepassing van nieuwe biomarkers in de kliniek zal bijdragen aan betere classificatie van patiënten en daarmee een kans op gerichte behandeling van individuele patiënten.

Samenvattend onderstrepen de verschillende studies gepresenteerd in dit proefschrift dat epigenetische mechanismen een belangrijke rol spelen in het proces van tumorvorming. Er is de afgelopen decennia veel onderzoek gedaan naar genetische mutaties in tumoren, maar het wordt steeds duidelijker dat andere factoren zoals epigenetische mechanismen hierbij ook een grote rol spelen. Genmutaties kunnen bijvoorbeeld leiden tot verhoogde of juist verlaagde expressie van het betreffende gen, waar dus ook veranderingen in de epigenetische regulatie van deze genen bij

betrokken zijn. Aangezien de expressie van een gen nooit op zichzelf staat en altijd is verbonden met andere genen in dezelfde signaleringsroute, zal ook de epigenetische regulatie van deze andere genen worden beïnvloed door mutaties of veranderingen in de epigenetische status van een individueel gen. Mutaties in epigenetische factoren zelf zullen uiteraard ook grote gevolgen hebben voor de epigenetische regulatie van individuele genen en daarmee signaleringsroutes, en beïnvloeden daarmee het proces van tumorvorming. Epigenetische mechanismen zijn dus onbetwistbaar betrokken bij het proces van tumorvorming en moeten worden beschouwd als een grote bron van informatie, niet alleen voor het identificeren van prognostische en predictieve biomarkers, maar ook voor de ontwikkeling van nieuwe, mogelijk tumor- en daardoor patiënt-specifieke, tumortherapieën.

Referenties

- (1) Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013; 49(6):1374-403.
- (2) Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010; 17(6):1471-4.
- (3) Sobin LH, Compton CC. TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 2010; 116(22):5336-9.
- (4) 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(6):575-82.
- (5) Lange MM, van de Velde CJ. Faecal and urinary incontinence after multimodality treatment of rectal cancer. *PLoS Med* 2008; 5(10):e202.
- (6) Lange MM, Marijnen CA, Maas CP et al. Risk factors for sexual dysfunction after rectal cancer treatment. *Eur J Cancer* 2009; 45(9):1578-88.
- (7) Labianca R, Beretta GD, Kildani B et al. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010; 74(2):106-33.
- (8) Fakhri MG, Padmanabhan A. CEA monitoring in colorectal cancer. What you should know. *Oncology (Williston Park)* 2006; 20(6):579-87.
- (9) Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008; 359(17):1757-65.
- (10) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
- (11) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646-74.
- (12) Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5):759-67.
- (13) Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8(12):686-700.
- (14) Roy DM, Walsh LA, Chan TA. Driver mutations of cancer epigenomes. *Protein Cell* 2014; 5(4):265-96.
- (15) Bloushtain-Qimron N, Yao J, Snyder EL et al. Cell type-specific DNA methylation patterns in the human breast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(37):14076-81.
- (16) Zhang B, Zhou Y, Lin N et al. Functional DNA methylation differences between tissues, cell types, and across individuals discovered using the M&M algorithm. *Genome Res* 2013; 23(9):1522-40.
- (17) Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2013; 14(3):204-20.
- (18) Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ et al. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 1978; 274(5673):775-80.
- (19) Kar S, Parbin S, Deb M et al. Epigenetic choreography of stem cells: the DNA demethylation episode of development. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(6):1017-32.
- (20) Seisenberger S, Peat JR, Reik W. Conceptual links between DNA methylation reprogramming in the early embryo and primordial germ cells. *Curr Opin Cell Biol* 2013; 25(3):281-8.
- (21) Bergman Y, Cedar H. DNA methylation dynamics in health and disease. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 20(3):274-81.
- (22) Hinrichsen I, Kemp M, Peveling-Oberhag J et al. Promoter methylation of MLH1, PMS2, MSH2 and p16 is a phenomenon of advanced-stage HCCs. *PLoS One* 2014; 9(1):e84453.
- (23) Silva TD, Vidigal VM, Felipe AV et al. DNA methylation as an epigenetic biomarker in colorectal cancer. *Oncol Lett* 2013; 6(6):1687-92.
- (24) Xu B, Nie Y, Liu X et al. Quantitative analysis of APC promoter methylation in hepatocellular carcinoma and its prognostic implications. *Oncol Lett* 2014; 7(5):1683-8.
- (25) Hancks DC, Kazazian HH, Jr. Active human retrotransposons: variation and disease. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22(3):191-203.
- (26) de Maat MF, van de Velde CJ, Benard A et al. Identification of a quantitative MINT locus methylation profile predicting local regional recurrence of rectal cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16(10):2811-8.

- (27) Esteller M, Herman JG. Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* 2004; 23(1):1-8.
- (28) Kawakami K, Brabender J, Lord RV et al. Hypermethylated APC DNA in plasma and prognosis of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(22):1805-11.
- (29) Tanaka M, Chang P, Li Y et al. Association of CHFR promoter methylation with disease recurrence in locally advanced colon cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17(13):4531-40.
- (30) Zhang X, Bernatavichute YV, Cokus S et al. Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol* 2009; 10(6):R62.
- (31) Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(6):1409-20.
- (32) Muntean AG, Hess JL. Epigenetic dysregulation in cancer. *Am J Pathol* 2009; 175(4):1353-61.
- (33) Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(7):457-69.
- (34) He C, Xu J, Zhang J et al. High expression of trimethylated histone H3 lysine 4 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2012; 43(9):1425-35.
- (35) Wang CG, Ye YJ, Yuan J et al. EZH2 and STAT6 expression profiles are correlated with colorectal cancer stage and prognosis. *World J Gastroenterol* 2010; 16(19):2421-7.
- (36) Weichert W, Roske A, Niesporek S et al. Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2008; 14(6):1669-77.
- (37) Boumber Y, Kantarjian H, Jorgensen J et al. A randomized study of decitabine versus conventional care for maintenance therapy in patients with acute myeloid leukemia in complete remission. *Leukemia* 2012; 26(11):2428-31.
- (38) Momparler RL, Cote S, Momparler LF. Epigenetic action of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) is more effective against acute myeloid leukemia than cytotoxic action of cytarabine (ARA-C). *Leuk Res* 2013; 37(8):980-4.
- (39) Garcia-Manero G. Can we improve outcomes in patients with acute myelogenous leukemia? Incorporating HDAC inhibitors into front-line therapy. *Best Pract Res Clin Haematol* 2012; 25(4):427-35.
- (40) Garcia-Manero G, Tambaro FP, Bekele NB et al. Phase II trial of vorinostat with idarubicin and cytarabine for patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 2012; 30(18):2204-10.