



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Promoter CpG island hypermethylation in the development of cutaneous melanoma

Gao, L.

Citation

Gao, L. (2015, February 4). *Promoter CpG island hypermethylation in the development of cutaneous melanoma*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/31819>

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/1887/31819>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/31819> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Gao, Linda

Title: Promoter CpG island hypermethylation in the development of cutaneous melanoma

Issue Date: 2015-02-04

Appendices

Nederlandse samenvatting

Curriculum vitae

Nederlandse samenvatting

De studies in dit proefschrift zijn gericht op het in kaart brengen van promoter CpG eiland methylatie patronen in cutaan melanoom, ter identificatie van epigenetische veranderingen die van belang zijn bij de ontwikkeling van melanoom, en die kunnen dienen als diagnostische en prognostische biomarkers.

Cutaan melanoom is een agressieve vorm van huidkanker die uitgaat van de pigmentcellen (melanocyten) van de huid. Waar melanoom beperkt tot de huid genezen kan worden door chirurgische excisie, is melanoom met metastasen op afstand vaak fataal. Het ontstaan en de progressie van melanoom wordt veroorzaakt door veranderingen in het erfelijk materiaal (het DNA) van de melanocyten. Een gen is een regio in het DNA die de code bevat voor het maken van een eiwit. Eerst vindt transcriptie van een gen naar messenger RNA (mRNA) plaats, vervolgens wordt de code van dit mRNA afgelezen voor productie van het eiwit; op deze manier wordt een gen tot expressie gebracht door de cel. Het optreden van een verandering in het DNA kan tot gevolg hebben dat een gen foutief tot expressie komt. Het foutief tot expressie komen van genen leidt tot een verstoring in het normaal functioneren van de cel. Foutieve expressie van een toenemend aantal genen heeft geleidelijke ontsparing van normale cellen naar kankercellen tot gevolg. Niet alleen genetische veranderingen, maar ook epigenetische veranderingen leiden tot foutieve expressie van genen die de transformatie van normale cellen naar kankercellen induceren.

In elke cel is het DNA op een speciale manier verpakt in de celkern. Elk DNA molecuul is gewikkeld rondom speciale eiwitten (histon eiwitten) en verpakt in clusters in de celkern; bij elkaar wordt de organiserende DNA-eiwit structuur aangeduid als chromatine. Hoe dicht het chromatine verpakt is heeft effect op welke genen wanneer afgeschreven worden. Bij epigenetische veranderingen gaat het om een verandering in de chromatine structuur, en niet een feitelijke verandering in het DNA zelf, die veranderingen in de expressie van een gen teweeg brengt. Een bekend epigenetisch mechanisme is methylatie. Bij methylatie van het DNA in een menselijke cel wordt een methylgroep vastgemaakt aan een cytosine nucleotide die zich naast een guanine nucleotide in het DNA bevindt. Een cytosine en guanine nucleotide naast elkaar in het DNA wordt ook aangeduid als een CpG dinucleotide. In het menselijk DNA zijn er afzonderlijke regio's met een groot aantal CpG dinucleotiden, de zogenaamde CpG eilanden. Meer dan de helft van alle menselijke genen bevat CpG eilanden aan het begin van het gen, in het gebied waar ook de promotor van het gen zit. De promotor is een regio in het DNA die de transcriptie van DNA naar RNA reguleert. Methylatie van CpG eilanden in de genpromoter leidt tot een verandering van het chromatine naar een gesloten conformatie. Tevens induceert de methylatie van CpG eilanden binding van eiwitcomplexen die transcriptie van het DNA verhinderen. In normale menselijke cellen hebben CpG eilanden in de promotor regio

veelal geen methylgroep, ze zijn zeer beperkt gemethyleerd. In kankercellen echter, vindt abnormale methylatie (hypermethylatie) plaats op deze CpG eilanden. In kankercellen gaat deze promotor CpG eiland hypermethylatie vaak gepaard met verminderde of afwezige transcriptie van genen getroffen door deze epigenetische verandering. Op deze manier kan hypermethylatie leiden tot inactivatie van tumor suppressor genen. Een tumor suppressor gen codeert voor eiwitten die de groei van een cel onderdrukken. Deze tumor suppressors spelen vaak een cruciale rol in de controle van celdeling, want in tegenstelling tot normale cellen, zijn verscheidene tumor suppressor eiwitten afwezig of defect in kankercellen. Zo is ook promotor hypermethylatie van genen die bekende tumor suppressor eiwitten coderen, zoals *CDKN2A*, *CDH1* en *PTEN*, gevonden in melanoom. Onderzoek naar methylatie veranderingen in cutaan melanoom heeft zich tot nog toe beperkt tot analyse van een klein aantal genen, waarbij het onderzochte materiaal beperkt bleef tot melanoom cellijnen of weefsel van metastatisch melanomen. In de studies opgenomen in dit proefschrift is gebruik gemaakt van bioptweefsel van normale naevi, dysplastische naevi, primaire melanomen en metastatische melanomen.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we het in kaart brengen van promotor CpG eiland methylatie patronen in primaire cutaan melanomen en normale naevi met behulp van Beadchip array. Deze array analyseert 27.578 CpG dinucleotiden verspreid over 14.495 van de naar schatting 30.000 humane genen, d.w.z. bijna alle genen met een CpG eiland in de promotor. Wij vonden 106 genen met een significante toename in promotor methylatie ten opzichte van normale naevi, onder deze genen bevonden zich *HOXA9*, *MAPK13*, *CDH11*, *PLEKHG6*, *PPP1R3C* and *CLDN11*. Het *MAPK13* gen was in 67% van de primair melanomen gemethyleerd. *MAPK13* codeert voor de isoform van een eiwit dat lid is van de p38 MAP kinase familie, p38 δ . *MAPK13* promotor methylatie was geassocieerd met verminderde p38 δ expressie. Daarnaast zagen we, wanneer we in melanoomcellen met *MAPK13* hypermethylatie die geen expressie van het gen meer hadden, de expressie van dit gen terugbrachten, dat deze melanoomcellen een afname in proliferatie vertoonden. Deze bevindingen zijn de eerste indicatie van een mogelijke tumor suppressieve rol voor *MAPK13* in melanoom. Daarnaast suggereren deze bevindingen, samen met de aanwezigheid van *MAPK13* promotor methylatie in een deel van de normale naevi, dat uitschakeling van *MAPK13* door methylatie een vroege gebeurtenis is in de ontwikkeling van melanoom.

Een belangrijk tumor suppressief mechanisme bij het ontstaan van melanoom is oncogen-geïnduceerde senescentie. Senescentie is het fenomeen waarbij een cel na een aantal celdelingen in een permanente groeistop raakt. Dit treedt op wanneer een normale cel wordt blootgesteld aan bepaalde vormen van stress. Een vorm van stress die senescentie kan induceren is activatie van een oncogen, zoals *BRAF*. In **hoofdstuk 3** wordt de zoektocht naar nieuwe genen die nodig zijn voor oncogen-geïnduceerde senescentie

beschreven. shRNA screening gericht op 15.000 genen gevolgd door validatie resulteerde in zeven genen, waaronder *RASEF*. Uit reanalyse van genoom-wijde methylatie data was *RASEF* één van de genen die onderhevig was aan frequente hypermethylering in *BRAF*-mutante melanomen. In een onafhankelijke groep primaire melanomen en normale naevi was de methylatie frequentie van *RASEF* 21%, hier bleek *RASEF* methylatie niet beperkt tot lesies met *BRAF* mutatie. Opvallend was dat depletie van *RASEF* resulteerde in het uitblijven van een *BRAF*^{V600E}-geïnduceerde senescentie respons, en suppressie van senescentie biomarkers zoals (SA)- β -galactosidase activiteit, IL-6 en tumor suppressor p15^{INK4B}. Daarnaast leidde het terugbrengen van *RASEF* expressie in melanoomcellen waar expressie van dit gen door promotor methylatie was uitgeschakeld, tot een vertraging in celgroei. Samen suggereren deze bevindingen dat *RASEF* een potentieel nieuw tumor suppressor gen is in melanoom, dat werkt door het voorkomen van verder ontsproten van beginnende melanoomcellen door activatie van oncogen-geïnduceerde senescentie en het afremmen van celgroei.

Dysplastische naevi zijn een type moedervlek die er anders uit zien dan een normale moedervlek. Een dysplastische naevus kan groter zijn dan een normale moedervlek en verschillen in een aantal met het oog waarneembare kenmerken zoals kleur, symmetrie, oppervlakte en rand van de moedervlek. Onderscheid tussen een dysplastische naevus en een vroeg-stadium primair melanoom kan moeilijk zijn op grond van waargenomen veranderingen in de weefselarchitectuur en aspect van de melanocyten. Er bestaat behoefte aan moleculair-pathologische methoden om met zekerheid de diagnose melanoom te kunnen stellen. Voor de zoektocht naar potentiële diagnostische biomarkers zijn we uitgegaan van de 12 meest frequent in melanoom gehypermethyleerde genen. Dit betrof de genen *HOXA9*, *C1orf106*, *MAPK13*, *CDH11*, *EFCAB1*, *CNTN1*, *GNMT*, *PLEKHG6*, *PPP1R3C* en *CLDN11*. Het methylatiepatroon van deze 12 genen is in biopoten van dysplastische naevi onderzocht en vergeleken met het methylatiepatroon van normale naevi, primaire melanomen en metastatische melanomen. In **hoofdstuk 4** worden de resultaten van dit onderzoek beschreven. Promoter methylatie analyse liet een progressief toenemende methylatie frequentie zien van genen zoals *CDH11*, *PPP1R3C* en *PLEKHG6*, met minimale methylatie in normale naevus, een geleidelijke toename van methylatie in dysplastisch naevus, en een scherpe toename in methylatie frequentie in primair en metastatisch melanoom. Dysplastische naevi vertoonden tevens aanwezigheid van methylatie van genen die frequent gemethyleerd waren in melanoom maar niet in normale naevi, zoals het *C1orf106* en *GNMT* gen. *HOXA9*, *MAPK13* en *CNTN1* promotor methylatie was aanwezig in een subset normale en dysplastische naevi en in 40% - 80% van de onderzochte primaire melanomen. *CLDN11* was bijzonder specifiek voor melanoom met promotor methylatie in 50% van de primaire melanomen en 3% in dysplastische naevi. De diagnostische waarde van de

methylatie status van een panel bestaande uit vijf genen *CLDN11*, *CDH11*, *PPP1R3C*, *MAPK13* en *GNMT* werd getest op onafhankelijke series van melanomen en dysplastische naevi. Hieruit bleek dat de methylatie status van *CLDN11* in combinatie met dat van *CDH11*, *PPP1R3C*, *MAPK13* en *GNMT* kon helpen met een onderscheid maken tussen primair melanoom en dysplastische naevus. Een gecombineerde detectie van *CLDN11*, *CDH11* en *PPP1R3C* promotor methylatie resulteerde in een specificiteit van 89% en sensitiviteit van 67%. De melanoom-specifieke methylatie van deze genen wijst op mogelijk toekomstige toepasbaarheid als diagnostische biomarker.

Volgend op DNA methylatie patronen in dysplastische naevi, is **hoofdstuk 5** gericht op identificatie van verschillen in gen- en eiwitexpressie van melanocyten afkomstig van dysplastische naevus, en melanocyten afkomstig van aangrenzende normale huid. Melanocyten zijn onderhevig aan oxidatieve stress, waarbij in de cel meer reactieve zuurstofverbindingen aanwezig zijn dan normaal. In melanocyten afkomstig van dysplastische naevi is een verhoogde toestand van oxidatieve stress gevonden. Om inzicht te verkrijgen in moleculaire signaleringspaden die ten grondslag liggen aan de verhoogde oxidatieve stress levels in dysplastisch naevus melanocyten, zijn het gen- en eiwitexpressie patroon van melanocyten afkomstig van dysplastische naevus en van normale huid met elkaar vergeleken. Teneinde dit te onderzoeken zijn melanocyten uit dysplastische naevi en melanocyten uit aangrenzende normale huid geïsoleerd en opgekweekt. Uit de opgekweekte melanocyten is RNA en eiwit verkregen voor respectievelijk genexpressie analyse middels Affymetrix array en massaspectrometrie analyse. Tijdens de studie kon in de melanocyt celkweeken een verschil in morfologie en delingssnelheid worden waargenomen tussen melanocyten afkomstig uit dysplastische naevus en melanocyten afkomstig van normale huid. Hoewel de genexpressie profielen van beide melanocyt typen overeenkomstig waren, waren er ook verschillen in signaleringspaden betrokken bij de volgende cellulaire processen: metabolisme, detoxificatie en organisatie van het cytoskelet. Over het algemeen vertoonden melanocyten afkomstig van dysplastische naevi vergelijkbare gen- en eiwitexpressie patronen in vergelijking tot melanocyten afkomstig van aangrenzende normale huid.

Een deel van de melanomen zaait uit (metastaseert) en het is moeilijk om te voorspellen welk melanoom dat zal doen. De voornaamste klinische factor die wordt gebruikt om een voorspelling over mogelijk metastaseren van een melanoom te doen, is de dikte van de tumor. Het vinden van prognostische biomarkers waarmee een goede voorspelling over metastasering kan worden gedaan is noodzakelijk voor een optimale behandeling van de patiënt. Ter identificatie van methylatie patronen met potentiële prognostische waarde en die mogelijk ter grondslag liggen aan het verkrijgen van invasieve en metastatische capaciteit, is in **hoofdstuk 6** gezocht naar aanwezigheid van differentiële methylatie tussen primaire melanomen die wel of niet zijn gemetastaseerd.

Een analyse van genoom-wijde methylatie data werd uitgevoerd, met daaropvolgend validatie in een set biopten bestaande uit primaire melanomen met en zonder metastatisch gedrag. Hieruit kwamen *MCHR1* en *SYNPO2* naar voren als meer frequent gemethyleerd in melanomen met metastatisch gedrag. Vervolgonderzoek liet zien dat metastatische lesies met *MCHR1* methylatie een significant slechtere overleving hadden dan metastatische melanomen zonder *MCHR1* methylatie. Interessant aan deze bevinding is dat *MCHR1* methylatie naast een significante associatie met metastatisch gedrag van de primaire lesie, ook correleert met de overlevingskans van patiënten met reeds gemetastaseerd melanoom. Dit kan erop duiden dat methylatie van *MCHR1* een algemene indicator is voor agressief gedrag van melanoom.

Het onderzoek naar promoter methylatie in melanoom heeft laten zien dat tijdens de ontwikkeling van melanoom er abnormale methylatie plaatsvindt van vele tientallen genen. Waar normale naevi geringe promoter methylatie laten zien, vindt een duidelijke toename in de frequentie van promoter methylatie plaats in melanomen. Geïdentificeerde genen met frequente hypermethyatie in melanoom kunnen potentiële tumor suppressieve functies hebben. Wat de oorzaak is van de uitgebreide toename in promoter methylatie tijdens de ontwikkeling van melanoom is nog onduidelijk. De invloed van genetische mechanismen en de wisselwerking tussen epigenetische en genetische mechanismen in de totstandkoming van de veelvuldig aberrant gemethyleerde genen in melanoom ten opzichte van een melanocytair benigne laesie hebben meer onderzoek nodig. Het ontrafelen hiervan zou mogelijk nieuwe aanknopingspunten voor de behandeling van cutaan melanoom kunnen bieden. Verder hebben we tijdens ons onderzoek gevonden dat de methylatiestatus van *CLDN11* in combinatie met vier anderen genen, *PPP1R3C*, *CDH11*, *MAPK13* en *GNMT* kan bijdragen aan het onderscheid tussen dysplastische naevus en een vroeg-stadium melanoom. Hoewel melanoom niet in alle gevallen door analyse van de methylatie van een enkel gen met zekerheid kan worden gediagnosticeerd, kan de detectie van een combinatie van differentieel gemethyleerde genen toegepast worden als diagnostische biomarkers in de toekomst.

