

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19117> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Roon, Eddy Herman Jasper van

Title: High-throughput DNA methylation analysis in colorectal cancer and childhood leukemia

Date: 2012-06-20

Summary
Nederlandse samenvatting
Curriculum Vitae
List of publications

Chapter 7

SUMMARY

The aim of the research that is described in this thesis was to identify DNA methylation that is specific to colon cancer and infant B cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). To obtain these data, the differential methylation hybridization (DMH) technique was used. In addition, the association between DNA mutations and high levels of cancer-specific methylation was explored.

Chapter 1 provides a general introduction to epigenetics. The complex interplay between the various aspects of DNA methylation, histone modification, nuclear position and chromatin condensation is described. In cancer, aberrant hypomethylation of the genome is accompanied by regional hypermethylation of dense CpG dinucleotide clusters called CpG islands (CGIs). Hypermethylation of promoter CGIs can lead to transcriptional inactivation of the associated gene. This form of epigenetic down-regulation occurs for numerous tumor-suppressor genes in various types of cancer. In this study, the following two types of cancer that undergo cancer-specific DNA methylation changes were investigated: colorectal cancer (CRC) and infant acute lymphoblastic leukemia (ALL) with rearrangements involving the mixed-lineage leukemia (*MLL*) gene.

Chapter 1 also provides a brief overview of CRC tumorigenesis. CRC is the third-most common type of cancer in males and the second-most common in females. The lifetime risk for developing CRC for both men and women is 6%, representing approximately one in 17 individuals within the Netherlands. CRC is one of the leading causes of cancer-related deaths in both Europe and the United States. Approximately half of all CRC patients develop either a localized recurrence or a distant metastasis during the course of their illness, and this dramatically decreases their chance of survival. Therefore, the ability to detect and treat CRC before metastasis occurs is extremely important. A recent decrease in the numbers of new CRC cases and reported deaths has been observed in developed countries, and this is possibly due to improved screening and a consequent increase in early diagnosis. **Chapter 1** also describes the various paths of CRC tumorigenesis and discusses how DNA methylation might affect these pathways.

The second type of cancer that was studied with respect to DNA methylation is infant ALL. Infant patients (i.e., up to one year of age at diagnosis) with *MLL*-rearranged ALL only achieve a 5-year survival rate of approximately 50%. Approximately 80% of infants with ALL carry chromosomal translocations that involve the *MLL* gene, and these patients typically display an immature CD10-negative precursor B-lineage immunophenotype. The *MLL* gene is ubiquitously expressed both during development and in most adult tissues, and its expression is required for definitive hematopoiesis. **Chapter 1** provides both a brief general overview of infant ALL and the specific molecular implications of *MLL* rearrangements in ALL leukemogenesis.

In **Chapter 2**, the differential methylation hybridization (DMH) technique was used in combination with home-spotted arrays to measure DNA methylation in a set of 18 right-sided colon tumor samples. The DMH technique uses three rounds of restriction enzyme digestion of genomic DNA as follows: the first round shears the DNA into CpG-

rich fragments, followed by two methylation-sensitive digestions. These three digestion rounds generate fragments that -upon amplification- can be hybridized to a microarray that contains DNA probes of interest. The microarrays that were used in this chapter were home-spotted arrays that were based on a CpG island clone library that was originally generated at the Sanger Centre from affinity-purified *in vitro* methylated DNA fragments. In this initial setup, we identified colon cancer-specific methylation of a CpG island in the first intron of the *PTPRG* gene (*PTPRGint1*). This methylation pattern on *PTPRGint1* was confirmed by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) in a larger cohort consisting of the following samples: 18 sporadic adenomas, 67 sporadic carcinomas, 63 Lynch syndrome-associated carcinomas and 119 corresponding normal colon tissue samples. High sensitivity (methylated tumor/total tumors) and high specificity (unmethylated normal/total normal samples) for colorectal cancer was observed during the assessment of *PTPRGint1* methylation, which prompted us to propose the incorporation of this region into new and existing colon cancer screening panels.

Methylation of *PTPRGint1* did not influence the expression of the *PTPRG* gene. However, we found that the *PTPRGint1* region is located in a CTCF binding site. CTCF has been linked to many nuclear mechanisms, including transcriptional regulation, insulation, chromatin condensation and chromosomal loop formation. DNA methylation had a negative effect on the binding of CTCF to this region, which suggests that *PTPRGint1* methylation could alter chromatin density and/or conformation. Such changes in chromatin state could affect the expression of -thus far- unknown genes, thereby affecting colon tumorigenesis.

Methylation of the *MLH1* promoter leads to microsatellite instable (MSI-H) colon cancer which is generally associated with a high age of onset. In **Chapter 3**, a cohort of relatively young colon cancer patients (under 50 years of age at diagnosis) with sporadic *MLH1* methylation was studied. The mutational status of *GADD45A*, *BRAF* and *KRAS*, as well as the presence of the *MLH1* -93G>A polymorphism and germline *MLH1* methylation, were investigated in an attempt to identify initiating factors for the observed DNA methylation. Two individuals exhibited germline *MLH1* methylation; however, locus-specific somatic *MLH1* hypermethylation explained the majority of the sporadic early-onset MSI-H colon cancer cases in our cohort. In this study, we were unable to identify an intrinsic tendency towards CpG island hypermethylation other than aberrant accumulation of CpG island methylation via a somatic mutation of *BRAF*. The site-specific *MLH1* promoter methylation observed in the early-onset MSI-H tumors hints towards an unknown targeted methylation mechanism other than that which is associated with *BRAF* mutations. This hypothesis is discussed further in **Chapter 6**.

The relationship between *BRAF* mutations and DNA methylation was explored further in **Chapter 4**, which describes an improved study of DNA methylation in *BRAF* mutation-associated colon cancer. The DMH technique that was introduced in **Chapter 2** was applied to an oligonucleotide microarray platform that provided broader coverage of genomic CpG islands. To focus on genes that are silenced in a tumor-specific rather than a lineage-specific manner, we excluded regions that exhibit both colon cancer-specific promoter methylation and the so-called histone pre-marking in ES cells. We describe

BRAF mutation-specific promoter methylation of the FOX transcription factor genes *FOXB1*, *FOXB2* and *FOXD3* and speculate that this methylation might help these tumors escape *BRAF*-induced senescence.

Chapter 5 describes a study in which the DMH technique was combined with oligonucleotide microarrays that contained high CpG island coverage to determine the methylation patterns of infant B-ALL patients. The majority of *MLL*-rearranged infant ALL cases (i.e., those who are characterized by a t(4;11) or t(11;19) translocation) represent hypermethylated leukemias. In contrast, infant ALL patients with a t(9;11) translocation and those without any *MLL* translocation (wild-type *MLL*) displayed DNA methylation patterns that closely resembled the pattern seen in normal bone marrow. In addition, distinct leukemia-specific DNA methylation patterns were identified in *MLL*-rearranged infant ALL subtypes that were defined by the type of *MLL* translocation or by an absence of such translocations. The majority (90-95%) of the most significantly hypermethylated genes in the t(4;11)- and t(11;19)-positive infant ALL patients were found to be down-regulated as measured at the mRNA level. The high levels of methylation -and its correlation with expression- suggest an epigenetic block of B cell differentiation in infant ALL patients with a t(4;11) or t(11;19) translocation. In addition, the t(4;11)-positive B-ALL cell lines were significantly more sensitive than other leukemia cell lines to the demethylating agent zebularine. This study indicates that patients with a t(4;11) or t(11;19) translocation who have high levels of DNA methylation might be promising candidates for therapies that inhibit DNA methylation.

Chapter 6 presents concluding remarks and provides implications for the future. The collective data that are presented in this thesis suggest that a non-invasive DNA methylation-based screening method using a combination of existing and novel DNA methylation markers (such as *PTPRGint1*) might be feasible for most types of colon cancers. In addition, the translocation-specific DNA methylation that is described in this thesis creates new possibilities for the screening and treatment of aberrant DNA methylation in infant ALL patients with an *MLL* translocation. In **Chapter 6**, we discuss the possible downstream effects of losing CTCF binding after methylation of the *PTPRGint1* region. Known published examples of CTCF binding loss are discussed, and future experiments that aim to gain further insight into the full effects of *PTPRGint1* methylation are proposed.

A link between mutations other than those that occur in *BRAF* and aberrant DNA methylation in CRC was not found in this study. The associations between a constitutively active RAS-RAF pathway and the epigenetics that are described in the literature are discussed in **Chapter 6**. The interplay between *BRAF* mutations and the hypermethylation of the promoters of mediators of oncogene-induced senescence is proposed and discussed. However, the mechanism that underlies the accumulation of aberrant promoter methylation -as can occur in *BRAF*-mutated colon cancer- remains unknown and merits further investigation.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Dit proefschrift beschrijft het onderzoek naar veranderingen in de systemen die de werkzaamheid van ons DNA reguleren. Specifiek werd de rol van de zogenaamde epigenetische DNA veranderingen in dikkedarmkanker en acute lymfatische leukemie (ALL) onderzocht. Dit laatste bij kinderen jonger dan één jaar oud bij diagnose.

Epigenetica is een verzamelnaam voor de verschillende mechanismen die invloed kunnen hebben op het tot expressie komen van onze genen zonder een directe verandering van de DNA code. De best bestudeerde onderdelen van de epigenetica zijn “DNA methylatie” en “covalente modificaties van de histonen”.

De menselijke DNA code is samengesteld uit 4 basen: Cytosine, Guanine, Adenine en Thymin. Een cytosine die vooraan aan een guanine (een CpG-dinucleotide) kan een methylgroep binden aan het vijfde koolstofatoom waardoor er een 5-methyl-cytosine ontstaat. Deze CpG-dinucleotiden zijn vrij zeldzaam in het menselijke genoom en worden veelal in clusters gevonden. Deze clusters worden CpG eilanden genoemd en liggen vlak voor ongeveer 50% van onze genen. De methylatie status van deze CpG-dinucleotide clusters komen in veel gevallen overeen met de transcriptie activiteit van het geassocieerde gen waardoor deze CpG eilanden ervan worden verdacht een rol te spelen in de regulatie van de desbetreffende genen. Dit is het geval bij verscheidene genen die een associatie met kanker hebben. De twee soorten kanker die bestudeerd zijn in dit proefschrift laten veel DNA methylatie verschillen zien ten opzichte van het weefsel waaruit ze ontstaan.

In **Hoofdstuk 1** wordt er een overzicht gegeven over dikkedarmkanker. Dikkedarmkanker is de, op twee na, meest voorkomende soort kanker bij mannen en, op een na, bij vrouwen. De kans om deze kanker te ontwikkelen is ongeveer 6%, of 1 op 17, geldend voor beide seksen in Nederland. Het is een van de meest voorkomende oorzaken van kanker-gerelateerde morbiditeit in Europa en de Verenigde Staten. Bij ongeveer de helft van alle dikkedarmkanker patiënten treedt er een plaatselijke terugkeer van de tumor op een uitzaaiing elders op hetgeen de kans op overlijden doet toenemen. Vroege detectie en behandeling van dikkedarmkanker en haar voorstadia zal de overlevingskans sterk verbeteren. Invoering van presymptomatische screening zou hierin een belangrijke stap kunnen zijn. Ook het gebruik van individuele risicoprofielen kan hierin een belangrijke stap zijn. Te denken valt aan het herkennen van erfelijkheidsfactoren en risicovolle levensstijlen. De moleculaire pathogenese van dikkedarmkanker en hoe DNA methylatie hier een rol in speelt wordt in **Hoofdstuk 1** samengevat.

De tweede soort kanker besproken in dit proefschrift is acute lymfatische leukemie bij kinderen onder de één jaar oud. Deze patiëntengroep heeft, ten opzichte van oudere kinderen met deze ziekte, een opvallend slechte 5-jaar overlevingskans, namelijk 50%. Bij ongeveer 80% van deze kinderen wordt de ziekte veroorzaakt door een uitwisseling tussen chromosomen waarbij het *MLL* gen (gelegen op chromosoom 11), is aangedaan. Dit *MLL* gen is actief in elke cel van ons lichaam en is vooral noodzakelijk voor de ontwikkeling van de bloedcellen. In **Hoofdstuk 1** wordt een kort overzicht van ALL en de moleculaire implicaties van de *MLL* translocaties gegeven.

In **Hoofdstuk 2** wordt de differential methylation hybridization techniek (DMH) toegepast op dikkedarmkanker en normaal darmweefsel. Hiermee konden de DNA methylatie veranderingen in dikkedarmtumoren worden bestudeerd. Deze techniek is gebaseerd op fragmentatie van het DNA met behulp van enzymen die het DNA op specifieke sequenties doorknippen (endonucleases, of restrictie enzymen). Er zijn drie ronden van digestie nodig: één digestie ronde om het DNA in CG-rijke fragmenten te knippen, gevolgd door twee rondes van methylatie-gevoelige digestie. De methylatie-gevoelige restrictie enzymen knippen de ongemethyleerde fragmenten kapot waardoor fragmenten met variërende methylatie, na hybridisatie op een DNA microarray, kunnen worden geïdentificeerd.

Met behulp van deze DMH techniek toonden we dikkedarmkanker-specifieke methylatie aan van een gebied in het eerste intron van het *PTPRG* gen (*PTPRGint1*). Deze specifieke methylatie werd ook gevonden met een tweede techniek (methylation-specific ligation-dependent probe amplification) in een groter cohort van 18 sporadische adenomas, 67 sporadische carcinomas, 63 Lynch syndroom geassocieerde carcinomas en 119 normaal darm weefsel samples.

Methylatie van *PTPRGint1* had geen invloed op de expressie van het *PTPRG* gen. Echter, *PTPRGint1* bleek een zogenaamd methylatiegevoelig CTCF bindingsgebied te zijn, als onderdeel van een mechanisme dat de spatiële organisatie van het DNA reguleert. Verstoring van CTCF binding kan grote implicaties hebben op het expressie patroon door middel van veranderingen in de DNA lusvorming of DNA chromatine status. De methylatie van *PTPRGint1* kan dus, tot nog toe, onbekende gevolgen hebben op de tumorigenese van dikkedarmkanker.

Een subtype van dikkedarmkanker toont zogenaamde microsatelliet instabiliteit (MSI). Hierbij worden repetitieve stukken DNA sequentie (microsatellieten) korter of langer (instabiliteit) door defecten in het DNA mismatch repair systeem. Dit fenotype van dikkedarmkanker wordt gevonden in een erfelijke context (het Lynch syndroom) en in 15 % van niet erfelijke of sporadische darmkanker. Het laatste wordt veroorzaakt door promotor hypermethylatie van het *MLH1* gen en komt vooral voor bij oudere patiënten. In **Hoofdstuk 3** wordt een cohort bestaande uit relatief jonge patiënten met sporadisch MSI dikkedarmkanker beschreven. Verscheidene genetische aberraties (*GADD45A*, *BRAF* en *KRAS* mutaties alsmede het *MLH1* -93G>A polymorfisme) en kiembaan methylatie van *MLH1* werden bestudeerd bij deze patiënten in een poging de initiërende factoren van de *MLH1* hypermethylatie te identificeren. Kiembaan methylering werd gevonden bij twee patiënten. Veelal was er een relatie met het voorkomen van de activerende *BRAF* mutatie met ook hypermethylatie van andere target DNA gebieden. In andere gevallen was er sprake van een nog onverklaarde locus-specifieke hypermethylatie van *MLH1*.

De mogelijke relatie tussen *BRAF* mutaties en verhoogde DNA methylatie in kanker wordt verder behandeld in **Hoofdstuk 4**. In dit hoofdstuk wordt de DNA methylatie in *BRAF* gemuteerde dikkedarm tumoren beschreven. De DMH techniek, die ook in **Hoofdstuk 2** wordt beschreven, werd toegepast op een DNA oligonucleotide microarray platform met een hogere genomische CpG eiland dekking. Om ons te concentreren op DNA methylatie met een functionele impact op dikkedarm-tumorigenese hebben we microarray probes met zogenaamde "histon pre-marking" in embryonale stam cellen geëxcludeerd. Kanker-specifieke methylatie van promotoren met deze histon pre-marking lijkt geen tot weinig

effect te hebben op de expressie van een geassocieerd gen. Promotor hypermethylering zonder histon pre-marking werd aangetoond bij de FOX transcriptie factoren *FOXB1*, *FOXB2* en *FOXD3*. Deze transcriptie factoren zouden een rol kunnen spelen in het blokkeren van BRAF gedreven oncogenese. De epigenetische uitschakeling van deze factoren zou een manier van de woekerende cel kunnen zijn om deze blokkade te omzeilen.

Hoofdstuk 5 beschrijft het gebruik van de DMH techniek in combinatie met het DNA oligonucleotide microarray platform uit **Hoofdstuk 4** om de methyleringspatronen van kinderen jonger dan een jaar oud met ALL in kaart te brengen. Een meerderheid van de patiënten met een *MLL*-translocatie, vooral met t(4;11) en t(11;19), liet een sterke verhoging van CpG eiland methylering zien. Een minderheid, vooral met t(9;11), liet echter CpG eiland methylering niveaus zien die vergelijkbaar zijn met die van normaal beenmerg. Een verdere stratificatie van de patiënten op basis van hun *MLL*-translocatie leidde tot de identificatie van methylering patronen specifiek voor deze verschillende translocaties. Een merendeel (90-95%) van de gehypermethyleerde genen bij patiënten met een t(4;11) en t(11;19) translocatie kwamen lager tot expressie. De hoge niveaus van methylering en correlatie met expressie suggereerden een epigenetische blokkade van B-cel differentiatie bij patiënten met een t(4;11) en t(11;19) translocatie. Cellijnen met t(4;11) lieten ten opzichte van leukemie cellijnen zonder deze translocatie, een verhoogde mate van gevoeligheid zien voor het demethylerende middel zebularine. Deze studie toonde aan dat jonge kinderen met ALL en een t(4;11) en t(11;19) translocatie mogelijke kandidaten zijn voor behandeling met DNA methylering inhiberende therapieën.

Hoofdstuk 6 bevat de conclusies van dit proefschrift en beschrijft mogelijke implicaties voor de toekomst. In **dit hoofdstuk** worden verder de mogelijke gevolgen van *PTPRGint1* methylering besproken, vooral het verlies van CTCF binding in dit gebied. Bekende gevallen van verlies van CTCF binding uit de literatuur alsmede de benodigde experimenten om een beter inzicht te krijgen in de functie van *PTPRGint1* worden besproken. De in de literatuur beschreven associatie tussen de constante activatie van de RAS-RAF signaalcascade door *BRAF* mutaties en epigenetica wordt verder uitgediept.

CURRICULUM VITAE

Eddy Herman Jasper van Roon werd geboren op 15 februari 1979 te Alphen aan den Rijn. In 1996 behaalde hij het HAVO diploma op het Ashram College in Alphen aan den Rijn en in 1998 behaalde hij het VWO diploma op het Gouwe College in Gouda. Hierna begon hij aan de studie medische biologie aan de Vrije Universiteit (VU) te Amsterdam. Voor deze studie doorliep hij tweemaal een onderzoeksstage. De eerste stage was bij de afdeling Antropogenetica (nu Klinische Genetica) van het "VU Medisch Centrum" in Amsterdam waar hij onder leiding van Dr. H.J. van de Vrugt en Dr. F. Arwert onderzoek deed naar Fanconi anemie. Tijdens zijn tweede stage zocht hij naar kandidaatgenen op chromosoom 16q, die betrokken konden zijn bij borstkanker tumorvorming. Deze stage werd gelopen bij de afdeling Pathologie van het "Leids Universitair Medisch Centrum" (LUMC) in Leiden. In november 2003 werd zijn studie afgerond.

Na zijn afstuderen werkte hij van maart tot oktober 2004 als Onderzoeksassistent bij de afdelingen Pathologie en Humane Genetica van het LUMC. Dit omvatte het onderzoek naar genetische factoren die betrokken zijn bij het ontstaan van tumoren aan de bijschildklier onder leiding van Dr. C.J. Haven en Prof. Dr. H. Morreau.

Van oktober 2004 tot maart 2009 was hij werkzaam als AIO/promovendus bij de afdelingen Pathologie en Humane Genetica van het LUMC onder leiding van Dr. J.M. Boer en Prof. Dr. H. Morreau. De resultaten van dit onderzoek staan beschreven in dit proefschrift. Vanaf april 2009 tot en met maart 2010 was hij tijdelijk werkzaam als postdoctoraal onderzoeker bij de afdeling Pathologie van het LUMC waar hij de CTCF bindingsgebieden in normaal dikkedarmslijmvlies onderzocht. Per april 2010 werkt hij als postdoctoraal onderzoeker bij de afdeling Kindergeneeskunde van het Erasmus Medisch Centrum in Rotterdam.

LIST OF PUBLICATIONS

van Wezel T, Lombaerts M, van Roon EH, Philippo K, Baelde HJ, Szuhai K, Cornelisse CJ, Cleton-Jansen AM.

Expression analysis of candidate breast tumour suppressor genes on chromosome 16q.
Breast Cancer Res. 2005;7(6):R998-1004

Stumpel DJ, van Roon EH, Schneider P, Boer JM, de Lorenzo P, Valsecchi MG, de Menezes RX, Pieters R, Stam RW.

Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options.

Blood. 2009 Dec 24;114(27):5490-8

van Roon EH, van Puijenbroek M, Middeldorp A, van Eijk R, de Meijer EJ, Erasmus D, Wouters KA, van Engeland M, Oosting J, Hes FJ, Tops CM, van Wezel T, Boer JM, Morreau H.

Early onset MSI-H colon cancer with MLH1 promoter methylation, is there a genetic predisposition?

BMC cancer 2010, 5;10:180

van Roon EH, de Miranda NF, van Nieuwenhuizen MP, de Meijer EJ, van Puijenbroek M, Yan PS, Huang TH, van Wezel T, Morreau H, Boer JM.

Tumour-specific methylation of *PTPRG* intron 1 locus in sporadic and Lynch syndrome colorectal cancer.

Eur J Hum Genet. 2011 Mar;19(3):307-12