

# The interplay between genetics and epigenetics in colorectal cancer

## Citation for published version (APA):

Derks, S. (2009). The interplay between genetics and epigenetics in colorectal cancer. Maastricht: Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/2009

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# SUMMARY|

Colorectal cancer (CRC) is a complex and heterogeneous disease, characterized by the growth of precursor lesions of which a small percentage will eventually progress into carcinomas. Extensive research has led to the identification of numerous genetic and epigenetic abnormalities underlying colorectal carcinogenesis. Pioneering research of Vogelstein and coworkers has proposed a progression model in which genetic alterations as *APC*, *KRAS* and *TP53* mutations and allelic loss of 5q, 17q and 18q play an important role. Later genetic instability, microsatellite instability (MSI) and chromosomal instability (CIN) which occur in approximately 10-15% and 85% of CRCs respectively, have been added to the model. Seven chromosomal alterations, losses in 8p21-pter, 15q11-q21, 17p12-13 and 18q12-21 and gains in 8q23-qter, 13q14-31, and 20q13 are strongly associated with the progression of colorectal adenomas towards carcinomas and can therefore be considered as cancer associated events (CAE). Furthermore, it has become clear that initiation and progression of cancer also involves epigenetic alterations such as promoter CpG island methylation of pivotal tumor suppressor- and DNA repair genes. A subgroup of CRCs can be characterized by an extensive number of methylated genes, a phenotype also referred to as the CpG island methylation phenotype (CIMP).

The main aim of this thesis was to study the interplay between genetic and epigenetic abnormalities in CRC.

In chapter 1 we provide an historic overview of the identification of genetic and epigenetic alterations in colorectal carcinogenesis. CRC has long been considered to be a genetic disease, but in the last decade a revolution in epigenetic cancer research has marked the place for epigenetics in CRC.

In chapter 2, we review recent evidence regarding the complexity of epigenetic regulation of gene expression in CRC and discuss the clinical use of these new insights. Furthermore, we conclude that only by considering the complex interactions of CRC genetics and epigenetics we will be able to obtain insight in CRC carcinogenesis and translate these findings to clinical practice.

Chapter 3 provides an overview of critical parameters of the methylation specific PCR (MSP) technique as well as the available MSP variants and (clinical) applications.

The first experimental study (Chapter 4) describes the timing of genetic- and epigenetic abnormalities in CRC development. The frequently occurring genetic abnormalities CIN, *TP53*-, *APC*- and *KRAS* mutation and promoter CpG island methylation of *hMLH1*, *O<sup>6</sup>MGMT*, *APC*, *p14<sup>ARF</sup>*, *p16<sup>INK4A</sup>*, *RASSF1A*, *GATA4*, *GATA5* and *CHFR* were studied in a well characterized series of normal colon, adenoma and carcinoma tissues. These analyses showed that while P53 immunopositivity and chromosomal abnormalities occur predominantly in carcinomas, nonprogressed adenomas, progressed adenomas and carcinomas show similar frequencies of promoter methylation for the majority of the genes. Since promoter CpG island methylation mainly occurred in the transition of normal- to adenoma tissue, we conclude that promoter methyla-

tion can be regarded as an early event preceding *TP53* mutation and chromosomal abnormalities in colorectal cancer development.

In chapter 5 we investigated (epi)genetic interrelationships at the level of CRC phenotypes and at the level of individual (epi)genetic events. We classify CRCs based on the presence of CIN, MSI and a high number of CpG island promoter methylated genes and investigate whether genetic and epigenetic abnormalities collaborate or form different subgroups in colorectal carcinogenesis.

These integrative analyses showed that CIN (77.5% of CRCs) and MSI (16.4% of CRCs) occur in different CRCs. A subgroup of CRCs with extensive promoter methylation (EPM) (21.2% of CRCs) showed a great overlap with MSI and an inverse relationship CIN. However, from the perspective of EPM CRCs, 50% is MSI and 50% is CIN. Furthermore, while promoter CpG island methylation of *GATA4* and *p16<sup>INK4A</sup>* was inversely related to CAEs chromosomal loss at 15q11-21 and gain at 20q13, promoter CpG island methylation of *RASSF1A*, *GATA4*, *GATA5* and *CHFR* as well as a high methylation index was positively related to chromosomal gain at 8q23-qter in CIN CRCs. Thereby we showed that promoter CpG island methylation of pivotal tumor suppressor and DNA repair genes is associated with specific patterns of chromosomal changes in colorectal cancer, which is different from methylation patterns in MSI tumors.

In chapter 6 we aimed to unravel the prognostic significance of promoter CpG island methylation in colorectal cancer (CRC). Such studies are complicated by factors affecting the course of the disease, such as genetic alterations and adjuvant therapy. Therefore, we evaluated the prognostic value of promoter CpG island methylation of 5 "CIMP" genes, as defined by Weisenberger *et al.*, and 19 additional tumor suppressor and DNA repair genes in CRC patients independent of MSI- and *BRAF* mutation status in a retrospective study of patients treated with surgery alone. We first observed that CIMP (>3/5 CIMP genes methylated) had no prognostic significance. Interestingly, also promoter CpG island methylation of an individual gene, *CHFR*, was associated with a poorer prognosis in stage II, MSS, *BRAF* wild-type CRCs. This finding could be confirmed in an independent population-based series of CRCs.

In chapter 7 we studied the (epi)genetic interrelation by focusing on the mechanistic interplay between genetics and epigenetics in tumor suppressor gene silencing. Therefore, we analyzed CpG island promoter methylation as well as histone-tail modifications of 5 genes, *MBD1*, *CXXC1*, *SMAD4*, *DCC* and *MBD2*, on a chromosomal region frequently lost in CRC, chromosome 18q21, and evaluated if these abnormalities occurred concomitantly or had a mutually exclusive relationship. In this chapter we showed that *DCC* had promoter CpG island methylation in CRC cell lines and carcinoma tissues, while *MBD1*, *CXXC1*, *SMAD4* and *MBD2* promoter CpG islands were unmethylated. *DCC* promoter CpG island methylation was associated with reduced *DCC* expression, which was independent of 18q21 loss analyzed by multiplex ligation-dependent probe amplification. Reduced gene expression of *CXXC1*, *SMAD4* and *MBD2* correlated with 18q21 loss in CRC cell lines. Treatment with the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza), but not with the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A (TSA) exclusively restored *DCC* expression in CRC cell lines. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) studies revealed

that the *DCC* promoter is marked with repressive histone-tail marks H3K9me3 and H3K27me3, whereas activity related H3K4me3 was absent. Only active epigenetic marks were detected for *MBD1*, *CXXC1*, *SMAD4* and *MBD2*. Thereby this study demonstrates that while chromosomal loss of 18q21 frequently involved the entire chromosomal region tested, H3K9me3-, H3K27me3- and promoter CpG island DNA methylation mediated epigenetic silencing specifically targets *DCC* without affecting neighboring genes on chromosomal region 18q21.

Finally, we investigated the relationship of amplification of the oncogene *c-MYC* and promoter methylation of c-Myc target genes in chapter 8. c-Myc induced promoter methylation has been hypothesized, but the contribution to colorectal carcinogenesis remained to be elucidated. In a previous *c-MYC* transfection study, genes repressed by c-Myc overexpression and re-expressed after treatment with demethylation agent Aza were identified among which *CXCL14*, *DNAJA4*, *DKK3*, *TGFβi* and *TRIM59*. Promoter CpG island methylation analysis showed that all 5 of these genes were methylated in CRC cell lines. Quantitative reverse transcription PCR showed an inverse relation to the presence of DNA promoter methylation. However, no relationship between promoter CpG island methylation and high c-Myc transcript levels was observed. Although ChIP studies showed the presence of c-Myc on the promoter region of *DNAJA4*, *TGFβi* and *TRIM59*, c-Myc enrichment was associated with gene transcription and enrichment of active chromatin mark H3K4me3. In conclusion, we were indeed able to find genes that were repressed by promoter CpG island methylation in conditions of c-Myc overexpression, however, the presence of c-Myc and CpG islands promoter methylation could not be observed concomitantly. This suggests that c-Myc might be important for the establishment, but not the maintenance of CpG island methylation.

In conclusion, this thesis provides new insight into how genetics and epigenetics interact in CRC development. We have demonstrated that CpG island promoter methylation is frequently associated with the initiation of colorectal carcinogenesis, while chromosomal abnormalities are indicators of disease progression. In CRC genetic and epigenetic alterations, at the level of single events and at the level of phenotypes, show specific interrelations. These associations can be mutually exclusive, complementary or causal indicating a programmed collaboration leading to different CRC subgroups which might differ in prognosis and response to therapy. Thereby, CRC provide an excellent model of the (epi)genetic interplay in carcinogenesis. Future studies will unravel the importance of (epi)genetics for individualized cancer treatment.

# SAMENVATTING |

Kanker van de dikke darm en endeldarm, ook wel colorectaal kanker genoemd, is een complexe ziekte, die via verschillende moleculair biologische routes kan ontstaan.

De ziekte begint vaak als een goedaardig gezwel, ook wel adenoom genoemd, waarvan een klein percentage zich zal ontwikkelen tot een maligne tumor, een carcinoom.

De afgelopen 20 jaar is er veel onderzoek gedaan naar genetische veranderingen (veranderingen in de basen volgorde van het DNA) die een rol spelen in het ontstaan van colorectaal kanker. De onderzoeksgroep van Vogelstein heeft baanbrekend werk verricht door het opstellen van een model over het ontstaan van colorectaal kanker waarin genetische veranderingen zoals *APC*, *KRAS* and *TP53* mutaties alsook chromosomale veranderingen 5q-, 17q- en 18q deletie een belangrijke rol spelen. Later is ook genetische instabiliteit, in de vorm van microsatteliet instabiliteit (MSI) of chromosomale instabiliteit (CIN), aan het model toegevoegd. Zeven chromosomale veranderingen, verlies van regio's 8p21-pter, 15q11-q21, 17p12-13 en 18q12-21 en amplificatie van regio's 8q23-qter, 13q14-31 en 20q13, zijn sterk geassocieerd met de progressie van adenomen naar carcinomen, en kunnen om die reden beschouwd worden als colorectaal kanker gerelateerde afwijkingen.

Verder is ontdekt dat ook epigenetische afwijkingen een belangrijke rol spelen bij het ontstaan en de progressie van colorectaal kanker. Epigenetische processen als promoter CpG eiland methylering en histon modificaties wijzigen niet de basenvolgorde van het DNA, maar zijn in staat via andere wegen de expressie van genen te beïnvloeden. Vooral promoter CpG eiland methylering is een uitvoerig bestudeerd mechanisme resulterend in de inactivatie van belangrijke tumor suppressor- en DNA reparatie genen. Een deel van alle colorectaal carcinomen wordt gekenmerkt door een uitzonderlijk hoog aantal gemethyleerde genen, ook wel het CpG eiland methylerings fenotype (CIMP) genoemd.

Het doel van dit proefschrift was het bestuderen van de interactie tussen genetische en epigenetische afwijkingen in colorectaal kanker.

In hoofdstuk 1 wordt een historisch overzicht gegeven van de ontdekking van genetische- en epigenetische veranderingen in het ontstaan van colorectaal kanker. Gedurende lange tijd werd colorectaal kanker gezien als een genetische ziekte. In het afgelopen decennium echter, heeft een revolutie in epigenetisch kankeronderzoek de betrokkenheid van epigenetica in de biologie van colorectaal kanker aangetoond.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de complexiteit van epigenetische regulatie van genexpressie in colorectaal kanker en bediscussieert de klinische toepasbaarheid van deze nieuwe inzichten. We concluderen dat het bestuderen van de complexe interactie tussen genetica en epigenetica inzicht zal geven in het ontstaan van colorectaal kanker, wat essentieel is om uiteindelijk een vertaalslag naar de kliniek te maken.

Hoofdstuk 3 betreft een overzicht van de kritische parameters van de methylerings-specifieke PCR techniek, samen met mogelijke varianten en de klinische toepasbaarheid.

De eerste experimentele studie (hoofdstuk 4) beschrijft op welk moment in de ontwikkeling van colorectaal kanker genetische en epigenetische veranderingen optreden. Hiervoor werden frequent optredende genetische afwijkingen als CIN, *TP53*-, *APC*- en *KRAS* mutatie, en promoter CpG eiland methylering van *hMLH1*, *O<sup>6</sup>MGMT*, *APC*, *p14<sup>ARF</sup>*, *p16<sup>INK4A</sup>*, *RASSF1A*, *GATA4*, *GATA5* and *CHFR* geanalyseerd in een uitvoerig gekarakteriseerde serie van zowel normaal darmweefsel alsook adenoom en carcinoom weefsel. Dit onderzoek toonde aan dat *TP53* mutaties en chromosomale afwijkingen voornamelijk optreden in adenomen met tekenen van kankerprogressie en carcinomen. Promoter CpG eiland methylering werd, voor de meerderheid van de bestudeerde genen, in ieder stadium van colorectaal kanker ontwikkeling gezien, ook in adenomen zonder kenmerken van progressie. Omdat promoter CpG eiland methylering dus voornamelijk optreedt in de overgang van normaal colon naar adenomateus weefsel, concluderen we dat promoter methylering een vroege afwijking is in het ontstaan van colorectaal kanker, die eerder optreedt dan *TP53* mutatie en chromosomale afwijkingen.

In hoofdstuk 5 werd ingegaan op de relaties tussen genetische- en epigenetische afwijkingen in het vormen van verschillende colorectaal kanker subgroepen. We deelden carcinomen in op basis van de aanwezigheid van CIN, MSI en een uitzonderlijk hoog aantal gemethyleerde genen, en bestudeerden de relatie tussen deze 3 fenotypes. Daarmee toonden we aan dat CIN (aanwezig in 77.5% van de carcinomen) en MSI (aanwezig in 16.4% van de carcinomen) nauwelijks samen voorkomen. Een subgroep van carcinomen, gekenmerkt door extensieve promoter methylering (EPM), toonde een grote overlap met MSI maar een inverse relatie met CIN. Echter, vanuit het perspectief van EPM carcinomen was de helft MSI en de helft CIN. Terwijl promoter methylering van *GATA4* and *p16<sup>INK4A</sup>* een inverse relatie toonde met chromosomale verlies van regio 15q11-21 en amplificatie van regio 20q13, bleek amplitificatie van chromosomale regio 8q23-qter in CIN carcinomen juist gerelateerd te zijn aan promoter CpG eiland methylering van *RASSF1A*, *GATA4*, *GATA5* en *CHFR* en een hoog totaal aantal gemethyleerde genen. Hiermee hebben we aangetoond dat promoter CpG eiland methylering van belangrijke tumor suppressor- en DNA reparatie genen geassocieerd is met een specifiek patroon van chromosomale veranderingen, welke verschillend zijn in carcinomen met MSI.

Hoofdstuk 6 richt zich op het bestuderen van de prognostische waarde van promoter CpG eiland methylering in colorectaal kanker. Dit soort studies worden vaak verstoord door factoren als genetische afwijkingen en therapie, die ook hun invloed op het ziekte beloop hebben. Om deze reden hebben we ervoor gekozen de prognostische waarde van promoter CpG eiland methylering onafhankelijk van het tumor stadium, MSI, *BRAF*- en *KRAS* mutatie status te bestuderen, in een retrospectieve studie van patiënten met colorectaal kanker, die enkel behandeld werden middels chirurgie. Naast het bestuderen van de prognostische waarde van het CpG eiland methylerings genotype (CIMP), zoals dat gedefinieerd is door Weisenberger *et al.*, is ook de prognostische waarde van promoter methylering van 19 andere tumor suppressor- en DNA reparatie genen geanalyseerd. Uit deze analyse is gebleken dat hoewel CIMP geen relatie tot prognose vertoonde, promoter CpG eiland methylering van het *CHFR* gen dat wel deed in stadium II, microsatelliet stabiele,



*BRAF* wildtype carcinomen. Deze bevindingen werden bevestigd in een onafhankelijke colorectaal kanker populatie.

In hoofdstuk 7 werd de relatie tussen genetische en epigenetische afwijkingen bij het inactiveren van tumor suppressor genen bestudeerd. In dit hoofdstuk wordt gekeken naar CpG eiland methylering en histon modificaties in de promotor regio van 5 genen, *MBD1*, *CXXC1*, *SMAD4*, *DCC* and *MBD2*, die gelegen zijn op een chromosomale regio die frequent verloren gaat in colorectaal kanker, te weten chromosoom 18q21. Uit deze studie bleek dat enkel de promoter van *DCC* gemethyleerd was en dat *MBD1*, *CXXC1*, *SMAD4* en *MBD2* promotor CpG eilanden ongemethyleerd waren in colorectaal kanker cellijnen en carcinomen. *DCC* promotor CpG eiland methylering was gerelateerd aan gereduceerde *DCC* genexpressie, onafhankelijk van de afwezigheid van chromosoom 18q21. Gereduceerde genexpressie van *CXXC1*, *SMAD4* en *MBD2* was wel geassocieerd met verlies van chromosoom 18q21 in colorectaal kanker cellijnen. Behandeling met demethylerende agentia 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) leidde tot herstel van *DCC* expressie in colorectaal kanker cellijnen. Behandeling met histon deacetylering remmer Trichostatin A (TSA) in cellijnen had echter geen effect. Chromatine immunoprecipitatie (ChIP) studies toonden aan dat de *DCC* promotor verrijkt is met de aan gen inactiviteit gerelateerde histon modificaties H3K9me3 and H3K27me3, terwijl de aan gen activiteit gerelateerde histon modificatie H3K4me3 afwezig was. H3K4me3 kon wel waargenomen worden in de promotor regio's van *MBD1*, *CXXC1*, *SMAD4* en *MBD2*. Daarbij laat deze studie zien dat terwijl chromosomaal verlies van regio 18q21 meestal de gehele regio betreft, H3K9me3-, H3K27me3- en promotor CpG eiland methylerings- gemedieerde epigenetische repressie specifiek *DCC* treft.

Tenslotte hebben we de relatie tussen amplificatie van het oncogen *c-MYC* en promotor CpG eiland methylering van *c-Myc* doelgenen bestudeerd in hoofdstuk 8. Hoewel *c-Myc* geïnduceerde promotor methylering als mechanisme al eerder is beschreven, is de rol hiervan in de ontwikkeling van het colorectaal carcinoom onbekend. Een eerdere *C-MYC* transfectie studie heeft aangetoond dat na *c-Myc* overexpressie een aantal genen transcriptioneel onderdrukt raken, waaronder de genen *CXCL14*, *DNAJA4*, *DKK3*, *TGFβ1* en *TRIM59*. Na behandeling met de demethylerende agens Aza kwamen deze genen weer tot expressie, wat duidt op een transcriptie remmend proces met betrokkenheid van *c-Myc* en DNA methylering. Promotor CpG eiland methylering analyses toonde aan dat deze vijf genen inderdaad gemethyleerd zijn in colorectaal kanker cellijnen. De aanwezigheid van promotor methylering bleek echter niet specifiek voor te komen in cellijnen of carcinomen met een hoge *c-Myc* expressie. ChIP experimenten toonden de aanwezigheid van *c-Myc* in de promotor regio's van *DNAJA4*, *TGFβ1* and *TRIM59* aan. Dit bleek echter geassocieerd te zijn met transcriptionele activatie en de aanwezigheid van histon H3K4me3. Door middel van deze studie hebben we nieuwe gemethyleerde genen in colorectaal kanker ontdekt, alhoewel de bijdrage van *c-Myc* in het methyleringsproces nog niet geheel duidelijk is. DNA methylering en *c-Myc* werden niet tegelijkertijd in promotor regio's aangetoond wat er op zou kunnen wijzen dat *c-Myc* betrokken is bij het ontstaan van promotor methylering, maar niet het onderhoud hiervan.

Concluderend levert dit onderzoek nieuwe inzichten op in het (epi)genetisch samenspel in het ontstaan van colorectaal kanker. We hebben aangetoond dat promoter CpG eiland methylering geassocieerd is met de initiatie van colorectaal kanker, terwijl chromosomale afwijkingen betrokken zijn bij de progressie van colorectaal kanker. Genetische en epigenetische afwijkingen vertonen specifieke interrelaties; ze kunnen elkaar uitsluiten, complementeren en elkaar induceren. Dit alles duidt op een geprogrammeerde samenwerking, leidend tot de vorming van verschillende colorectaal kanker subgroepen die verschillen in gedrag en respons op therapie. Toekomstige studies zullen de bijdrage van (epi)genetica aan geïndividualiseerde behandeling van colorectaal kanker ophelderen.