Maastricht University

Dietary folate, genetic variation and DNA methylation in sporadic colorectal cancer

Citation for published version (APA):

de Vogel, S. C. (2009). *Dietary folate, genetic variation and DNA methylation in sporadic colorectal cancer*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. https://doi.org/10.26481/dis.20090618sv

Document status and date:
Published: 01/01/2009

DOI:
10.26481/dis.20090618sv

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

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

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 18 Apr. 2024

Summary

Folate is a B-vitamin that occurs naturally in our diet, but may also exist as folic acid which is the synthetic form of folate used in dietary supplements and fortified foods. Folic acid supplementation has been observed to reduce neural tube defects during embryonic development. In addition, adequate folate intake may possibly contribute to preventing colorectal cancer. However, previous studies have been inconsistent in demonstrating a protective effect, and such inconsistencies may be partially explained by the hypothesis that folate has a dual role in colorectal carcinogenesis, i.e. that it may protect against neoplastic development in normal colorectal mucosa whereas folate supplementation might enhance growth of existing pre-malignant lesions.

During colorectal carcinogenesis, the colorectal epithelium transforms into aberrant crypt foci, through colorectal adenomas, colorectal carcinomas and finally metastasis. Several molecular aberrations are thought to contribute to this process, such as accumulation of gene mutations in the tumor suppressor- and oncogenes *APC*, *KRAS*, *P53* and *BRAF*. In addition, promoter hypermethylation of CpG islands is a predominant epigenetic alteration that results in inactivation of transcriptional activity. A distinct subset of colorectal cancers harbours widespread promoter hypermethylation and is referred to as the CpG island methylator phenotype (CIMP). Furthermore, colorectal tumors may harbour microsatellite instability (MSI) – genetic instability characterized by length alterations in repeat sequences – often caused by promoter CpG island hypermethylation of the mismatch repair (MMR) gene *MLH1*. In colorectal cancer, CIMP has been observed to be associated with *MLH1* hypermethylation, MSI and *BRAF* mutations.

Folate has two important biological functions that are relevant with respect to the process of carcinogenesis. First, since it is essential for the biosynthesis of nucleotide precursors, folate deficiency may result in DNA instability, and possibly the introduction of gene mutations thereby contributing to carcinogenesis. Furthermore, folate is a methyl group donor which may influence DNA methylation such as CpG island promoter hypermethylation or global DNA hypomethylation, both of which are often observed in colorectal cancer. Like folate, methionine is a methyl donor. In addition, vitamins B2, B6 and B12 are involved in folate metabolism as co-factors, and may therefore modulate the bioavailability of methyl groups. Adequate intakes of these nutrients ensure a sufficient supply of methyl groups, and may be hypothesized to prevent aberrant DNA methylation, and thus to protect against colorectal cancer.

In this thesis, we investigated the associations between dietary methyl group donors and of other B-vitamins involved in folate metabolism with colorectal cancer, with or without gene mutations or promoter CpG island hypermethylation. We also studied whether genetic variants of folate metabolizing enzymes and methyltransferases (i.e. enzymes that are involved in incorporation of methyl groups into DNA) modify these associations. In addition, we studied the occurrence and correlations of gene mutations and gene promoter hypermethylation in colorectal carcinomas.

The studies described in this thesis were conducted within the Netherlands Cohort Study on diet and cancer (NLCS), which includes 120,852 men and women who filled out a food frequency questionnaire at baseline in 1986. The cohort was followed-up for cancer incidence and a subcohort of 5,000 subjects was randomly selected after baseline exposure measurement to estimate accumulation of person-time in the cohort through biennial follow-up of vital status. Overall colorectal cancer could be

investigated among 2,349 cases from a follow-up period of 13.3 years after baseline. Tumor material was collected of colorectal cancer patients identified within the first 7.3 years of follow up after baseline. In total, 734 patients were identified of whom sufficient tumor DNA could be extracted needed for genotyping and other molecular analyses.

In chapter 2, we investigated associations between *MGMT* promoter methylation and G:C>A:T mutations in *KRAS* and *APC*, and between *MLH1* promoter methylation and *APC*, *KRAS* and *BRAF* mutations. We observed that concurrent hypermethylation of *MGMT* and *MLH1* was rare. *MGMT* hypermethylation occurred more frequently in tumors with G:C>A:T *KRAS* mutations compared to those without these mutations, whereas no such difference was observed for G:C>A:T mutations in *APC*. *MLH1* hypermethylation was less common in tumors with *APC* or *KRAS* mutations, but was positively associated with *BRAF* mutations. The findings of this study suggest that in colorectal carcinogenesis, *MGMT* hypermethylation may succeed *APC* mutations but precedes *KRAS* mutations, and that tumors with *MGMT* hypermethylation may develop distinctly from those showing *MLH1* hypermethylation.

The associations between dietary folate, methionine, vitamin B2 and vitamin B6 with overall colorectal cancer risk are presented in chapter 3. Although we did not observe an association between dietary folate and colorectal cancer, higher methionine and vitamin B2 intakes were associated with reduced proximal colon cancer risk among men and women, respectively. Conversely, vitamin B6 intake was associated with increased colorectal cancer risk, being most pronounced for rectal cancer among women.

Whether folate intake is associated with *APC* mutations in colorectal cancer was investigated in chapter 4. Men with relatively high folate intake were at reduced risk of developing tumors without *APC* mutations, but folate was positively associated with tumors harbouring *APC* mutations. In chapter 5, we investigated the associations between dietary folate, methionine, vitamins B2 and B6 with *MLH1* hypermethylation, MLH1 expression, MSI and *BRAF* mutations. Predominantly among men, folate was associated with increased risk of tumors harbouring *BRAF* mutations, whereas vitamin B6 was associated with *MLH1* hypermethylation. These observations suggest that folate may enhance the growth of lesions harbouring gene mutations, and that vitamin B6 may do so by increasing promoter hypermethylation. Intake of folate, methionine, vitamins B2 and B6 were not associated with CIMP (chapter 7).

Chapter 6 addresses the associations between genetic variants of folate metabolizing enzymes *MTHFR*, *MTR* and *MTRR*, the DNA methyltransferase 3b (*DNMT3b*) and histone methyltransferases *PRDM2*, *EHMT1* and *EHMT2* with overall colorectal cancer and with tumors with or without CIMP, *MLH1* hypermethylation or MSI. The *MTHFR* 677TT variant was inversely associated with colorectal cancer risk among men, whereas the rare T allele was associated with increased risk in women. The *MTR* 2756GG genotype was associated with increased colorectal cancer risk, and inverse associations were observed among women carrying rare variants of the *DNMT3b* C>T or *EHMT2* G>A polymorphisms. We also observed inverse associations between *MTR* A2756G and CIMP among men, and between *MTRR* A66G and *MLH1* hypermethylation among women, suggesting that the occurrence of rare variants of these *MTR* and *MTRR* polymorphisms may reduce the risk of colorectal tumors with a promoter hypermethylation phenotype.

Finally, in chapter 7 we investigated whether the association between methyl donor intake with overall colorectal cancer, or with CIMP, *MLH1* hypermethylation or MSI, may be modified by the genetic variants. An inverse association of methionine with colorectal cancer appeared to be more pronounced if no rare variants occurred in the polymorphic *DNMT3b* gene. Similarly, we observed that vitamin B2 was inversely associated with CRC among individuals with the *MTHFR* 677CC genotype, while a strong inverse association existed when ≤1 rare allele occurred in the combination of methyl metabolizing enzymes *MTHFR*, *MTR* and *MTRR*, respectively. We therefore concluded that dietary methyl donors may be more protective against colorectal carcinogenesis if methyl metabolizing enzymes and DNA methyltransferases are left unaffected by rare variants of their encoding polymorphic genes. In addition, combining genotypes may reveal diet associations with colorectal cancer and should be considered in association studies.

This is the first prospective cohort study investigating associations of genetic variability of DNA methyltransferases and histone methyltransferases with colorectal cancer risk, and these findings should be replicated in future studies. In addition, the complicated interplay between genetic variability and consequences for methyl group metabolism in colorectal cancer warrants future research which should include measurements of global DNA hypomethylation, gene promoter hypermethylation and enzymatic activity of folate metabolizing enzymes and epigenetic regulators. Moreover, there is a need for large studies in order to investigate the relationship between dietary methyl donors, DNA methylation and genetic variants. In addition, existing data and future studies should preferably be pooled to increase power. In view of the hypothesized potential dual role of folate in colorectal carcinogenesis, and given our observations that naturally occurring folates may enhance colorectal tumors with specific molecular characteristics, it should not be recommended to introduce nation-widefortification of foods with folic acid.

Samenvatting

Folaat, of vitamine B11 komt voor in onder andere groene groenten, brood, aardappelen, vlees- en zuivelproducten. Naast deze natuurlijke vorm van folaat bestaat er een synthetische en chemisch stabielere variant die gebruikt wordt in supplementen en voor de verrijking van voedingsmiddelen. Hoewel de officiële benaming van deze synthetische variant foliumzuur is, wordt deze term in het Nederlands over het algemeen ook gebruikt voor folaat dat van nature in de voeding voorkomt. Om echter verdere verwarring te voorkomen zal in deze samenvatting de term folaat worden gebruikt voor folaten in de voeding, en foliumzuur voor de synthetische vorm.

Er zijn sterke aanwijzingen dat adequate folaatinname beschermt tegen neuraalbuisdefecten tijdens de embryonale ontwikkeling, waartoe Noord-Amerika en Canada in 1996 tot landelijke foliumzuurfortificatie van granen en graanproducten overgegaan zijn. Bovendien zou het tevens beschermen tegen dikkedarmkanker. Echter, de resultaten uit verschillende studies naar de relatie tussen folaat en dikkedarmkanker zijn inconsistent gebleken, mogelijk doordat folaat een tweeledige rol speelt bij het ontstaan van dikkedarmkanker. Zo word verondersteld dat het weliswaar beschermt tegen afwijkende weefselgroei in gezond darmepitheel, maar dat het de groei van bestaande neoplasma's juist zou kunnen bevorderen.

De carcinogenese van dikkedarmkanker is een langdurig proces waarbij gezond darmepitheel geleidelijk transformeert in een of meerdere carcinomen. Bepaalde moleculaire afwijkingen dragen waarschijnlijk in belangrijke mate bij aan dit proces, zoals somatische mutaties in de tumorsuppressorgenen en oncogenen *APC*, *KRAS*, *P53* en *BRAF*. Naast zulke genetische afwijkingen spelen epigenetische veranderingen – afwijkingen in het DNA die niet het gevolg zijn van een verandering in de DNA sequentie – een belangrijke rol. Zo kan genexpressie worden geblokkeerd door hypermethylering van CpG dinucleotiden in promotorregio's van genen. In ongeveer 25% van de dikkedarmtumoren komt dit type epigenetische verandering aanzienlijk meer voor, en tumoren met dit "methyleringsfenotype" worden daarom in de Engelse wetenschappelijke literatuur aangeduid met "CpG island methylator phenotype" of CIMP. Andere moleculaire afwijkingen die sterk correleren met dit fenotype zijn microsatelliet instabiliteit (MSI), een bepaalde vorm van DNA-instabiliteit die onder andere veroorzaakt wordt door hypermethylering van het DNA-reparatiegen *MLH1*, en mutaties in het oncogen *BRAF*.

Folaat heeft twee belangrijke functies in het lichaam die ook relevant zijn voor het proces van carcinogenese. Het is enerzijds essentieel voor de synthese van DNA. Folaatdeficiëntie kan DNA-instabiliteit tot gevolg hebben, wat genmutaties zou kunnen induceren. Daarnaast is folaat een donor van methylgroepen en is dus mogelijk van invloed op DNA methylering. Naast folaat is methionine een methyldonor in onze voeding, terwijl de vitaminen B2, B6 en B12 betrokken zijn bij verschillende omzettingen in het folaatmetabolisme. We nemen aan dat voldoende inname van deze nutriënten zorgt voor een adequate toelevering van methylgroepen, wat afwijkingen in DNA methylering en daarmee de carcinogenese van dikkedarmkanker kan voorkomen.

In de studies beschreven in dit proefschrift zijn de associaties onderzocht tussen methylgroepdonoren en andere B-vitaminen uit de voeding en dikkedarmkanker, waarbij specifiek naar de relatie gekeken is met tumoren met of zonder genmutaties of CIMP. Er is tevens onderzocht wat de mogelijk modificerende werking is van een aantal folaat metaboliserende enzymen en methyltransferases (enzymen die zorgen voor het incorporeren van methylgroepen in het DNA). Daarnaast

onderzochten we het vóórkomen en correlaties tussen promotor hypermethylering en genmutaties in dikkedarmtumoren.

De studies zijn uitgevoerd binnen de Nederlandse Cohort Studie naar voeding en kanker (NLCS). Dit cohort bestaat uit 120.852 mannen en vrouwen die bij aanvang van de studie in 1986 een voedselfrequentievragenlijst ingevuld hebben. Voor het schatten van de opgebouwde persoonstijd is bij aanvang een subcohort geselecteerd van 5.000 willekeurige personen, terwijl het gehele cohort gevolgd wordt voor het optreden van kanker. In de eerste 7,3 jaar na aanvang van de studie waren er 734 patiënten met dikkedarmkanker geregistreerd, van wie tumormateriaal uit pathologielaboratoria was opgevraagd dat tevens voldoende DNA bleek te bevatten voor moleculaire analyses. Gedurende de eerste 13,3 jaar na aanvang van de studie waren er in totaal 2.349 patiënten met dikkedarmkanker geregistreerd die de voedselfrequentievragenlijst volledig ingevuld hadden.

In hoofdstuk 2 onderzochten we de correlatie tussen hypermethylering van DNA-reparatiegenen en mutaties in tumorsuppressorgenen en oncogenen in dikkedarmtumoren. Het *O^6-methylguanine DNA methyltransferase* (*MGMT*)-gen codeert voor een enzym dat alkyl adducten van de O6-positie van guanine verwijdert, waarmee G:C>A:T mutaties kunnen worden voorkomen. We onderzochten de correlatie tussen *MGMT* hypermethylering en zulke mutaties in *APC* en *KRAS*, en tussen *MLH1* hypermethylering en mutaties (ongeacht het type mutatie) in *APC*, *KRAS* en *BRAF*. Het bleek dat gelijktijdige hypermethylering van *MGMT* en *MLH1* in slechts 10% van de tumoren voorkwam. *MGMT* hypermethylering kwam vaker voor in tumoren met G:C>A:T *KRAS* mutaties dan in tumoren zonder deze mutaties, terwijl een dergelijk verschil niet bleek te bestaan voor G:C>A:T mutaties in het *APC* gen. *MLH1* hypermethylering was geassocieerd met *BRAF* mutaties, maar kwam juist minder vaak voor in tumoren met *APC* – of *KRAS* mutaties. Deze resultaten zouden erop kunnen wijzen dat *MGMT* hypermethylering ontstaat na de introductie van *APC* mutaties, maar voorafgaat aan het ontstaan van *KRAS* mutaties tijdens de carcinogenese van dikkedarmkanker. Tumoren met *MGMT* hypermethylering zouden zich via een ander moleculair mechanisme kunnen ontwikkelen dan tumoren met *MLH1* hypermethylering.

De associaties tussen innamen van folaat, methionine, vitamines B2 en B6, en dikkedarmkanker staan beschreven in hoofdstuk 3. Folaatinname was niet geassocieerd met dikkedarmkanker. Echter, methionine en vitamine B2 waren geassocieerd met een lager risico op het krijgen van een tumor in het proximale colon onder respectievelijk mannen en vrouwen. Vitamine B6-inname was echter geassocieerd met een hoger risico, van met name rectumtumoren bij vrouwen.

Of folaatinname geassocieerd was met *APC* mutaties in dikkedarmkanker is onderzocht in hoofdstuk 4. Mannen met een relatief hoge folaatinname hadden een lager risico op het krijgen van een tumor zonder *APC* mutatie, maar een hoger risico op tumoren met *APC* mutatie. In hoofdstuk 5 zijn de associaties onderzocht tussen innamen van folaat, methionine, vitaminen B2 en B6, en de gerelateerde moleculaire afwijkingen *MLH1* hypermethylering, MLH1 expressie, MSI en *BRAF* mutaties. Met name onder mannen was folaatinname geassocieerd met verhoogd risico op tumoren met *BRAF* mutaties, terwijl vitamine B6 met geassocieerd was met *MLH1* hypermethylering. Het zou zo kunnen zijn dat folaat de groei van beginnende tumoren met genmutaties als in *APC* en *BRAF* stimuleert, en dat vitamine B6 dat kan doen door het bevorderen van promotor hypermethylering. Folaat, methionine, vitaminen B2 en B6, waren niet geassocieerd met CIMP (hoofdstuk 7).

Hoofdstuk 6 beschrijft de associaties tussen genetische varianten van de folaat metaboliserende enzymen *MTHFR*, *MTR* en *MTRR*, het DNA methyltransferase 3b (*DNMT3b*), en de histonmethyltransferases *PRDM2*, *EHMT1* en *EHMT2* enerzijds; en dikkedarmkanker ongeacht moleculaire afwijkingen, of het risico op tumoren met of zonder CIMP, *MLH1* hypermethylering of MSI anderzijds. De *MTHFR* 677TT variant was geassocieerd met lager dikkedarmkankerrisico onder mannen, terwijl het zeldzamere T-allel juist geassocieerd was met verhoogd risico bij vrouwen. Het *MTR* 2756GG genotype was geassocieerd met een hoger risico, terwijl inverse associaties bestonden onder vrouwen met zeldzame varianten van de *DNMT3b* C>T en *EHMT2* G>A polymorfismen. Verder vonden we inverse associaties tussen *MTR* A2756G en CIMP onder mannen en tussen *MTRR* A66G en *MLH1* hypermethylering onder vrouwen, wat erop wijst dat het voorkomen van zeldzame varianten van deze *MTR* en *MTRR* polymorfismen het risico op dikkedarmtumoren met een "methyleringsfenotype" verlaagt.

Tenslotte is in hoofdstuk 7 onderzocht of de associatie tussen methyldonorinname en dikkedarmkanker met of zonder CIMP, *MLH1* hypermethylering of MSI, gemodificeerd wordt door het vóórkomen van de onderzochte genetische varianten. Het bleek dat de mogelijk beschermende werking van methionine tegen dikkedarmkanker sterker was indien er geen zeldzame varianten voorkwamen in het polymorfe *DNMT3b* gen. Analoog daaraan bestond de inverse associatie tussen vitamine B2 en dikkedarmkanker alleen onder individuen met het *MTHFR* 677CC genotype, terwijl een sterk invers verband bestond voor diegenen met minder dan 1 zeldzaam allel in de combinatie van de folaat metaboliserende enzymen *MTHFR*, *MTR* en *MTRR*. We concluderen daarom dat een inverse associatie tussen methyldonorinname en dikkedarmkanker sterker zou kunnen zijn in mensen bij wie folaat metaboliserende enzymen en methyltransferases niet zijn aangetast door zeldzame varianten van hun coderende polymorfe genen. Bovendien is blijkbaar het combineren van verschillende genotypen van belang om associaties tussen nutriënten en kankerrisico te kunnen ontdekken.

Dit is de eerste keer dat de associaties tussen genetische varianten van DNA methyltransferases en histonmethyltransferases en dikkedarmkanker zijn onderzocht in een prospectieve cohortstudie. Daarom moeten deze bevindingen in de toekomst worden herhaald, bij voorkeur in grote studies of door het samenvoegen van studies. Daarnaast zijn de exacte consequenties van polymorfismen in folaat metaboliserende enzymen en methyltransferases voor enzymactiviteit lang niet altijd bekend, en is het bovendien de vraag wat de gevolgen zijn voor veranderingen in DNA methylering. In toekomstig onderzoek zou daarom de verandering van enzymactiviteit gemeten moeten worden voor genetische varianten van enzymen in het folaatmetabolisme en methyltransferases, en eventuele veranderingen in DNA methylering. Gegeven de hypothese dat folaat een mogelijk tweeledige rol speelt in de carcinogenese van dikkedarmkanker, en gezien onze observaties dat natuurlijk voorkomend folaat het risico van tumoren met specifieke moleculaire afwijkingen kan verhogen, zou een fortificatieprogramma met foliumzuur op landelijk niveau moeten worden afgeraden.