

(Epi)genetic profiling of cutaneous melanoma: diagnostic, prognostic, and biological relevance

Citation for published version (APA):

van den Hurk, K. (2015). *(Epi)genetic profiling of cutaneous melanoma: diagnostic, prognostic, and biological relevance*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20150702kh>

Document status and date:

Published: 01/01/2015

DOI:

[10.26481/dis.20150702kh](https://doi.org/10.26481/dis.20150702kh)

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.



Summary

Cutaneous melanoma is a highly aggressive cancer that originates from melanocytes which are the pigment producing cells in the skin. Melanoma is the leading cause of skin cancer related death and a major health burden due to its fast rising incidence rate. In case of localized disease, stage I and II, melanoma can be cured via surgical excision; ten-year survival rates are 90% (stage I) but can decrease to 40% (stage II) mainly depending on the tumor thickness (Breslow's depth). Patients with local metastatic disease, stage III, represent a heterogeneous group and ten-year survival rate is between 25%-70%. Melanoma that has spread to distant metastatic sites, stage IV, is almost always incurable, even in spite of recent advances in targeted and immunomodulatory therapies. Rapidly growing knowledge of the molecular mechanisms implicated in melanoma development and progression is becoming increasingly important in the clinical guidance of melanoma as described in **Chapter 1**.

The main purpose of this thesis was to profile (epi)genetic aberrations in melanoma to enhance our understanding of melanoma biology and to identify novel, clinically relevant biomarkers. In **Chapter 2** we provide an overview of the current knowledge of genetic and epigenetic alterations in melanoma. The genetic components underlying melanoma and the resulting deregulation of important signaling pathways, such as aberrant MAPK and PI3K signaling, are clearly emerging. A complete picture of the epigenetic contributions on DNA (DNA methylation), RNA (non-coding RNAs), and protein level (histone modifications, Polycomb group proteins, and chromatin remodeling) is however missing. Genetic and epigenetic interactions in the aberrant regulation of the *INK4b-ARF-INK4a* and *MITF* loci are accumulating and we point out that it is the interplay between genetic and epigenetic mechanisms that effectively lead to distorted gene expression patterns in melanoma.

To increase our knowledge of mutational events that underlie melanoma progression we adapted high-throughput genotyping to profile 159 known single nucleotide mutations in 33 cancer-related genes in 154 melanoma tissues across two European countries, i.e. Ireland and Belgium (**Chapter 3**). Unexpectedly, demographic differences in *BRAF* mutation rates, which represent one of the most important biomarkers for melanoma patients to date, were discovered. That is, melanoma patients from Ireland harbored a significantly lower *BRAF* mutation rate (~20%) compared with patients from Belgium or elsewhere (50%). The low incidence of *BRAF*^{V600E} among Irish melanoma patients was confirmed in five independent cohorts using different detection methods and in total, 165 of 689 (24%) Irish cases had the mutant *BRAF*^{V600E} genotype. The observation that melanoma-driving mutations vary by demographic area will have important implications for the clinical management of this disease.

Another challenge of precision medicine like treatment with mutant BRAF inhibitors is the development of drug resistance. Various mechanisms of drug resistance have been described, amongst them the existence of molecular heterogeneity within individual tumors (intratumor heterogeneity) and between

tumors within a single patient (intrapatient heterogeneity). In **Chapter 4** we used immunohistochemistry to determine the extent of intratumor and intrapatient heterogeneity of $BRAF^{V600E}$ and examined if morphological tumor heterogeneity correlates with $BRAF^{V600E}$ expression. In general, $BRAF^{V600E}$ intratumor and intrapatient heterogeneity was very rare. In most cases, a diffuse homogeneous immunostaining was seen indicating that this genetic aberration is a common clonal event in melanoma. Although $BRAF^{V600E}$ was found in all morphological subtypes, it was observed that the presence of the mutation is positively associated with the epithelioid cell type.

The role of DNA-methylation in the development and progression of melanoma was investigated in **Chapters 5-7** as this holds great promise to obtain novel insights in biology and for the identification of biomarkers.

Previously published Infinium HumanMethylation27K data were utilized to study the deregulation of DNA methylation in different stages of melanocytic neoplasia (**Chapter 5**). Promoter CpG island methylation analyses on a selected panel of 12 genes revealed progressive methylation trends during melanoma progression; methylation of dysplastic nevi was intermediate between common nevi and melanoma. The potential diagnostic value of methylation markers in distinguishing dysplastic nevus from primary melanoma was subsequently investigated in two patient series. A diagnostic 5-marker panel comprising of *CDH11*, *CLDN11*, *GNMT*, *MAPK13*, and *PPP1R3C* methylation was generated of which *CLDN11* methylation was the best single biomarker to discriminate between dysplastic nevus and melanoma. The addition of these methylation markers together with traditional histopathology might add in the accurate diagnosis of difficult lesions.

As it remains challenging for clinicians to identify patients who are at high-risk to develop metastatic disease we continued to compare methylation profiles of primary melanoma from patients with different outcome (**Chapter 6**). Re-analysis of the Infinium HumanMethylation27K data that were also used in **Chapter 5** yielded six hypermethylated genes in melanoma with metastatic behavior: *MCHR1*, *SYNPO2*, *C1orf106*, *HIST1H3G*, *ZNF35*, and *GNMT*. Further validation studies recognized prognostic significance of promoter CpG-island hypermethylation (n=113) and diminished gene expression (n=202) of *SYNPO2* in melanoma. Moreover, the prognostic value of *SYNPO2* was independent of Breslow thickness, i.e. the most important prognostic clinical parameter.

In **Chapter 7** we combined novel methyl-binding domain (MBD-)sequencing and RNA-sequencing on melanoma cell lines with publicly available Infinium HumanMethylation450K data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) to efficiently identify prognostic methylation markers for melanoma that are accurate and reproducible. Stringent analysis with the use of the molecular profiles of *CDH11* and *GNMT* as 'guide genes' identified a total of 85 robustly methylated gene promoters that represent putative melanoma biomarkers. Aberrant methylation of *LY75* was

identified as a strong predictor of poor melanoma prognosis in an independent validation series (n=114) and identified patients with aggressive disease at diagnosis independent of current prognosticators.

The major findings of the presented studies are summarized and discussed in **Chapter 8**. This thesis advanced the biological knowledge of melanoma and identified methylation markers that can be translated to the clinic to improve the diagnosis and prognosis of melanoma. Future studies are required to confirm the biomarker potential of these genes and to unravel their tumor suppressor function.

In addition to the scientific relevance of the data, the valorization paragraph highlights the societal and economical value that can be generated. Patenting of *LY75* methylation is expected to progress the validation and translational process of the biomarker and increase the success of clinical application. This will ultimately lead to improved personalized patient care and a reduction in medical costs.



Samenvatting

Het cutane melanoom is een agressieve vorm van kanker die ontstaat uit de pigmentcellen, melanocyten, in de huid. Het melanoom is de voornaamste oorzaak van huidkanker gerelateerde sterfte en vanwege het snel toenemende aantal een steeds groter wordend gezondheidsprobleem. In het geval van gelokaliseerde ziekte, stadium I en II, kan het melanoom worden genezen via operatieve verwijdering. De 10-jaars overleving varieert van 90% (stadium I), maar kan dalen tot 40% (stadium II), voornamelijk afhankelijk van de dikte van het melanoom (Breslow's dikte). Patiënten met lokale gemetastaseerde ziekte, stadium III, vertegenwoordigen een heterogene groep met een 10-jaars overleving van 25% - 70%. Wanneer het melanoom zich op afstand heeft verspreid, stadium IV, dan is de ziekte bijna altijd ongeneesbaar. De snel groeiende kennis over de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de ontwikkeling en de progressie van het melanoom wordt in toenemende mate belangrijk in de klinische behandeling van deze ziekte. Een overzicht van de nieuwe behandelingen van het melanoom wordt gegeven in **hoofdstuk 1**.

Vanwege de snelle ontwikkeling van 'gepersonaliseerde geneeskunde' waarbij het moleculaire profiel van de patiënt (of zijn/haar tumor) als uitgangspunt dient bij het bepalen van de behandeling, is de pathologische evaluatie van het melanoom steeds vaker gebaseerd op een combinatie van traditionele histopathologie met moleculaire analyse. De belangrijkste doelstelling van dit proefschrift was het in kaart brengen van (epi)genetische afwijkingen in het melanoom om ons begrip van melanoombiologie te verbeteren, en om nieuwe klinisch relevante biomarkers te identificeren. Deze nieuwe markers kunnen bijdragen aan het bepalen van de meest optimale behandeling van de patiënt en is belangrijk voor het bespoedigen van de medische zorg naar gepersonaliseerde geneeskunde.

Hoofdstuk 2 omvat een overzicht van de huidige kennis van genetische en epigenetische veranderingen in het melanoom. Er is al veel kennis over de genetische componenten die ten grondslag liggen aan het melanoom en resulteren in deregulatie van belangrijke signaleringspaden, zoals verstoorde MAPK en PI3K signalering. Een compleet beeld van epigenetische bijdragen die kunnen plaatsvinden op het niveau van DNA (DNA methylatie), RNA (non-coding RNAs), en eiwit (histon modificaties, Polycomb groep eiwitten en chromatine remodeling) is nog niet beschikbaar. Zoals aangetoond voor regulatie van twee belangrijke melanoom loci, *INK4bB-ARF-INK4a* en *MITF*, wordt het steeds duidelijker dat genetische en epigenetische gen afwijkingen opstapelen. We wijzen erop dat het samenspel tussen beide effectief leidt tot verstoorde gen expressie patronen in melanomen.

Door middel van high-throughput genotyping onderzochten we in **hoofdstuk 3** een totaal van 159 mutaties in 33 kanker-gerelateerde genen in 154 melanomen afkomstig van Ierland en België. Onverwacht ontdekten we demografische verschillen in het aantal *BRAF* mutaties, momenteel één van de belangrijkste melanoom biomarkers. Melanoom patiënten uit Ierland bleken een significant lagere *BRAF* mutatie frequentie te bevatten van ongeveer 20%, vergeleken met patienten uit België

of andere landen (50%). De lage incidentie van de meest voorkomende $BRAF^{V600E}$ mutatie onder Ierse melanoom patiënten werd met behulp van verschillende detectiemethoden bevestigd in vijf onafhankelijke cohorten. In totaal hadden 165 van de 689 (24%) Ierse patiënten een melanoom met het mutante $BRAF^{V600E}$ genotype. De constatering dat melanoom drijvende mutaties variëren per populatie zal implicaties hebben voor de klinische behandeling van deze ziekte.

Een andere uitdaging van opkomende gepersonaliseerde geneeskunde is de ontwikkeling van resistentie tegen deze nieuwe medicijnen. Dit is ook een veelvoorkomend probleem bij patiënten die behandeld worden met specifieke mutante BRAF remmers; medicijnen die het defect in de tumor, een mutatie in het *BRAF* gen, gericht aanpakken. Verschillende mechanismen van resistentie zijn beschreven in de literatuur, waaronder het bestaan van moleculaire heterogeniteit in één tumor (intratumor heterogeniteit) en tussen verschillende tumoren binnen één enkele patiënt (intrapatiënt heterogeniteit). In **hoofdstuk 4** gebruikten we immunohistochemie om de mate van intratumor en intrapatiënt heterogeniteit van mutante $BRAF^{V600E}$ expressie te bepalen. Ook bestudeerden we of verschillen in de vorm van tumor cellen, ook wel morfologische tumor heterogeniteit genoemd, correleert met $BRAF^{V600E}$ expressie. Over het algemeen was de intratumor en intrapatiënt heterogeniteit van $BRAF^{V600E}$ erg laag. In de meeste gevallen werd een diffuse homogene immunokleuring geobserveerd, wat betekent dat deze genetische afwijking een klonale gebeurtenis is in het melanoom. Hoewel $BRAF^{V600E}$ werd gevonden in alle morfologische subtypen, werd er geobserveerd dat de mutatie positief geassocieerd is met het epitheloïde celtype.

In **hoofdstukken 5-7** werd de rol van DNA-methylering bestudeerd in de ontwikkeling en progressie van het melanoom om nieuwe inzichten te verkrijgen in melanoom biologie en voor de identificatie van nieuwe biomarkers. Afwijkende DNA-methylering is de best bestudeerde epigenetische verandering in kanker en methylering van de promotor-regio van een gen is sterk geassocieerd met de uitschakeling van genen die in een normale situatie tumorgroei zouden onderdrukken. De stabiliteit en hoge frequentie van DNA-methylering in kanker, de mogelijkheid van het bepalen van methylering in klinische paraffine-ingebed, formaline-gefixeerde weefsels, alsmede de makkelijke en goedkope testen (zoals methylatie-specifieke PCR) die beschikbaar zijn voor het meten van DNA-methylatie, zorgen voor veelbelovende mogelijkheden van deze epigenetische afwijking als biomarker.

Voorheen gepubliceerde Infinium HumanMethylation27K data werd gebruikt om de deregulatie van DNA-methylatie in verschillende stadia van melanocytische neoplasmen te bestuderen (**hoofdstuk 5**). Promoter CpG eiland methylatie analyses op een geselecteerd panel van 12 genen onthulden progressief toenemende methyleringspatronen tijdens de verschillende stadia van tumor progressie. De frequentie van methylatie in normale nevi was minimaal, een toename in methylatie levels werd gezien in dysplastische nevi, en een scherpe toename in methylatie

frequentie was zichtbaar in primaire en uitgezaaide (metastatische) melanomen. De potentiële diagnostische waarde van methylatiemarkers voor het onderscheiden van dysplastische nevi en primaire melanomen werd vervolgens bestudeerd in twee patiënten series. Een diagnostisch 5-marker panel bestaande uit *CDH11*, *CLDN11*, *GNMT*, *MAPK13* en *PPP1R3C* methylatie werd samengesteld waarvan *CLDN11* methylatie de beste biomarker bleek te zijn om onderscheid te maken tussen goedaardige dysplastische nevi en maligne melanomen. De toevoeging van deze methylatiemarkers aan traditionele histopathologie kan mogelijk bijdragen aan de accurate diagnose van moeilijke letsels.

Voor artsen blijft het daarnaast lastig om patiënten te identificeren die een hoog risico hebben op de ontwikkeling van metastatische ziekte. Deze patiënten hebben een slechtere prognose en zouden daardoor profijt kunnen hebben van meer radicale behandeling. In **hoofdstuk 6** vergeleken we methylerings profielen van primaire melanomen van patiënten die geen metastatische ziekte ontwikkelden versus patiënten die dit wel deden. Re-analyse van de Infinium HumanMethylation27K data, ook gebruikt in **hoofdstuk 5**, leverde zes gehypermethyleerde genen op in melanomen met een metastatisch gedrag: *MCHR1*, *SYNPO2*, *C1orf106*, *HIST1H3G*, *ZNF35* en *GNMT*. Verdere validatie studies toonden prognostische waarde aan van promotor CpG-eiland hypermethylering (n=113) en verminderde gen expressie (n=202) van het *SYNPO2* gen in melanomen. Daarbij was deze prognostische waarde onafhankelijk van de dikte van het melanoom, de belangrijkste prognostische klinische parameter.

De nieuwste technologieën werden in **hoofdstuk 7** aangewend om op een efficiënte manier accurate en reproduceerbare prognostische methylatie markers voor melanomen te identificeren. Dat wil zeggen, MBD-sequencing, voor het bestuderen van genomwijde DNA-methylatiepatronen, en RNA-sequencing, voor het bepalen van gen expressie, werd uitgevoerd op melanoom cellijnen en gecombineerd met publiek beschikbare Infinium HumanMethylation450K data van “The Cancer Genome Atlas” (TCGA). Stringente statistische analyse, gebruik makend van de moleculaire profielen van *CDH11* en *GNMT* als ‘leidraad genen’, identificeerden een totaal van 85 robuust gemethyleerde gen promoters die vermoedelijke melanoom biomarkers representeren. Afwijkende methylatie van *LY75* werd geïdentificeerd als een sterke voorspeller van slechte melanoom prognose in een onafhankelijke validatie serie (n=114) en identificeerde patiënten met een agressief ziektebeeld tijdens de eerste diagnose onafhankelijk van huidige prognostische voorspellers.

De belangrijkste bevindingen van de gepresenteerde studies zijn samengevat en bediscussieerd in **hoofdstuk 8**. Dit proefschrift heeft de biologische kennis van het melanoom vergroot en DNA-methylatie markers geïdentificeerd die kunnen worden vertaald naar de kliniek om de melanoom diagnose en prognose te verbeteren. Verdere studies zijn nodig om het biomarker potentieel van deze genen te bevestigen en om hun tumor onderdrukkende functie te ontrafelen.

Naast de wetenschappelijke relevantie van de data wordt in de valorisatie paragraaf de maatschappelijke en economische waarde die kan worden gegenereerd uit deze thesis uiteen gezet. Het patenteren van *LY75* methylering zal naar verwachting de validatie en het translationele proces van de biomarker bespoedigen en de kans op het succes van een klinische toepassing vergroten. Uiteindelijk zal dat leiden tot verbeterde gepersonaliseerde patiëntenzorg en een reductie van medische kosten.