

The renal cell cancer methylome: tumor biology and clinical applications

Citation for published version (APA):

van Vlodrop, I. J. H. (2012). *The renal cell cancer methylome: tumor biology and clinical applications*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20120323iv>

Document status and date:

Published: 01/01/2012

DOI:

[10.26481/dis.20120323iv](https://doi.org/10.26481/dis.20120323iv)

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:

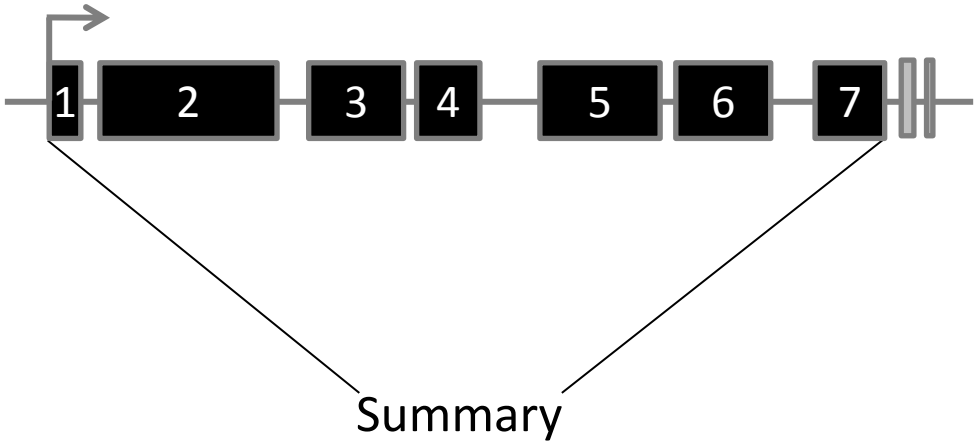
www.umlib.nl/taverne-license

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.



Renal cell cancer (RCC) represents the vast majority (80-85%) of all kidney tumors in adults. Although it is the most common and best studied type of kidney cancer, it still has an unpredictable course. In case of localized disease, RCC can be curable with surgery, but for those patients with distant metastases the prognosis is poor. Because of lack of clinical symptoms RCC may be difficult to detect in an early stage. Approximately 30% of all RCC patients have metastatic disease at time of diagnosis and in another 30% of patients recurrence develops after complete resection of the primary tumor. Current surgical and pharmaceutical interventions have limited success in treating patients with advanced RCC. Thanks to improved understanding of the molecular biology of metastatic RCC (mRCC), since 2005, drugs have been developed specifically targeting angiogenesis. Developing knowledge of genetic and epigenetic changes implicated in tumor development and behavior is becoming increasingly important for advancing the efficacy of disease management. **Chapter 1** enlightens the current situation in RCC management.

As the biology of RCC is incompletely understood and biomarkers for RCC are lacking, our main aim of this thesis was to address these issues. Defective VHL functioning appears to be the key event, in both hereditary and sporadic cases. However, the variable nature of the resulting neoplasm is most likely strongly determined by the complex interplay of additional downstream modifications, among which the role of epigenetic alteration of gene expression is becoming more and more acknowledged.

In **chapter 2** we provide an overview of RCC, which comprises a group of tumors of renal epithelial origin, each with a different histology, displaying a different clinical course and caused by different genetic alterations. The histologically classified clear cell subtype (ccRCC) is the most frequent form (60-80%) of RCC followed by papillary type I and type II (pRCC, 10-15%) and the chromophobe subtype (chrRCC, 5-10%). The background of RCC, as well as the genetics, epigenetics and the clinical applications are discussed.

Elucidation of epigenetic modifications in RCC holds great promise for novel insights in biology and identification of biomarkers. DNA methylation is the best known epigenetic alteration with promising biomarker potential. Substantial proof of principle for the clinical value of hypermethylation markers in cancer has been reported, with some already having demonstrated their importance in (pre)clinical practice. We hypothesized that genome-wide studying the DNA methylation changes in the most common type of RCC, the so-called ccRCC methylome, will gain insight into ccRCC biology and identify methylation marks that are associated with prognosis of RCC patients and can be developed into clinically useful disease markers. Using state of the art technologies to analyze tumor specific DNA methylation in ccRCC, we identified promoter hypermethylation of candidate tumor suppressor genes as described **chapter 3 and 5**. The four identified genes, *Gremlin1* (*GREM1*), *Ladinin1* (*LAD1*), *neurofilament heavy polypeptide* (*NEFH*), and *Neuralized* (*NEURL*), of which promoter CpG island hypermethylation was strongly predictive for ccRCC survival in two independent series (n=150 and n=185) of ccRCC primary samples, also indicated an increased prognostic effect when methylated simultaneously. The four markers combined are strongly associated with risk for cancer-related death in the test series as well as, independently of other clinicopathological characteristics, in the validation series. This results in a promising methylation

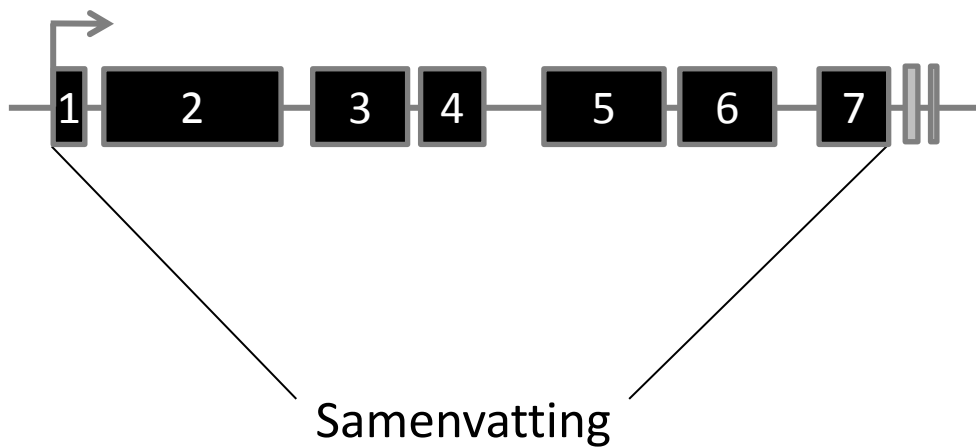
marker panel to predict prognosis of ccRCC patients after surgery. Identification of this group of high risk patients could direct adjuvant treatment trials to patients with sub-clinical metastatic disease to improve disease management and increase RCC survival. Besides the prognostic effects of these genes, we also investigated their functional role in ccRCC *in vitro* (**chapter 5**), as robust biomarkers should be specific and biologically relevant. Biological assessment of *GREM1* and *NEURL* in ccRCC cells suggested that these genes have complementary tumor suppressor activity in RCC. *NEURL* inhibited colony-formation and cell proliferation whereas *GREM1* inhibited migration and invasion. Biological assessment of *LAD1* and *NEFH* in RCC cells gave ambiguous results about the effect on proliferation, migration or invasion *in vitro*, providing only weak evidence for a tumor suppressor effect when compared to the data for *GREM1* and *NEURL*. Therefore we should be careful in drawing conclusions from these latter data.

Comprehensively studying the promoter methylation pattern of *GREM1* as described in **chapter 3** showed that only region-specific hypermethylation correlates with clinical parameters and prognosis. This suggested an important extra layer of complexity in DNA methylation research. In order to elucidate the general importance of this phenomenon, we evaluated the current literature on the effects of location-specific DNA methylation on gene expression and/or associations with clinicopathological characteristics in cancer. In **chapter 4** we clarify the misconception and oversimplification of hypermethylation and gene silencing in cancer, in an attempt to better understand the complexity and significance of location in DNA methylation. We expect that this approach will ultimately lead to accurate identification of biologically and clinically relevant location of DNA methylation and will enable translation of data into validated biomarker assays.

In the final experimental study of this thesis (**chapter 6**) we initiated to unravel the question whether the ccRCC methylome is distinctive from the methylomes of other epithelial cancers, as the genetic profile of (cc)RCC appears to be rather unique. Using the novel technologies as described in chapter 5 we compared the renal cell, colorectal and breast cancer methylomes. The ccRCC methylome does not appear to be different in terms of size or affected processes, as analyzed thus far. We identified conserved targeting of critical pathways through unique DNA hypermethylated events in the three analyzed cancer types. Additional analyses will shed more extensive light on these issues, however these initial analyses appeared powerful and permits the identification of genes and pathways that may not be easily detected by other approaches.

Chapter 7 summarizes the major findings of the presented studies and future directions are discussed. In conclusion, this thesis provides an overview of the current knowledge on RCC genetics and epigenetics with its implications for disease management. Despite great improvements, renal cancer management urgently needs to be brought to the next level. The work herein described provides novel insights in DNA methylation analyses, in the biology of ccRCC and identified promising biomarkers that predict prognosis of ccRCC. Future *in vitro*-, *in vivo* and marker validation studies are required to confirm the tumor suppressor function of the identified candidates, the biological role of these markers and their potential as biomarkers in ccRCC. The ulti-

mate challenge will be to truly personalize RCC treatment using markers to predict not only prognosis but also response as well as toxicity to therapy.



Niercelkanker is bij volwassenen de meest voorkomende (80-85%) tumorsoort van de nier. Hoewel deze vorm van nierkanker het meest bestudeerd is, blijft het verloop onvoorspelbaar. Wanneer de ziekte beperkt blijft tot de nier zelf kan het genezen worden door chirurgie. Echter, patiënten met gemetastaseerde ziekte hebben een slechte prognose. Doordat klinische symptomen vaak afwezig zijn is het moeilijk om niercelkanker in een vroeg stadium te ontdekken. Ongeveer 30% van alle niercelkankerpatiënten hebben al metastases op het moment van diagnose en daarnaast zal nog eens 30% van de patiënten recidiveren nadat de gehele primaire tumor chirurgisch verwijderd is. De huidige chirurgische en farmaceutische behandelingen zijn niet erg succesvol bij de behandeling van niercelkanker in een (ver)gevoerd stadium. Echter, dankzij recentelijk nieuwe inzichten in de moleculaire biologie van niercelkanker zijn sinds 2005 nieuwe therapieën ontwikkeld, die specifiek de vorming van nieuwe bloedvaten in de tumor remmen en daarmee de groei van de tumor belemmeren. Nieuwe ontwikkelingen op het gebied van de kennis over genetische en epigenetische veranderingen die van belang zijn bij het ontstaan en het gedrag van kanker worden steeds belangrijker voor het verbeteren van de behandeling van tumoren. Een uiteenzetting van de huidige situatie met betrekking tot de behandeling van niercelkanker is beschreven in **hoofdstuk 1** van dit proefschrift.

De biologie van niercelkanker is nog niet volledig bekend en momenteel zijn er nog geen biomarkers beschikbaar om het beloop van de ziekte te voorspellen. De belangrijkste doelstelling van dit proefschrift was dan ook om dit te onderzoeken. Een verminderde of defecte functie van het VHL eiwit blijkt een sleutelrol te spelen in het ontstaan van zowel de erfelijke als de niet-erfelijke vorm van niercelkanker. Echter, het wisselend verloop van de ziekte bij patiënten die allen tumoren hebben die zijn ontstaan nadat VHL is uitgeschakeld, geeft aan dat een complex samenspel van bijkomende veranderingen gaande is. Meer en meer wordt hierbij een rol van de epigenetica erkend.

In **hoofdstuk 2** wordt een overzicht gegeven van niercelkanker, dat uit een groep van tumoren bestaat die allen afkomstig zijn van het nierepithel. Elke afzonderlijke groep heeft een andere histologie, heeft een ander beloop van de ziekte en wordt door verschillende genetische afwijkingen veroorzaakt. Het histologisch geclassificeerde heldercellig niercelcarcinoom is het meest voorkomende type niercelkanker, gevolgd door het papillaire type I en type II en het chromofobe type van niercelkanker. De achtergrond van niercelkanker, de genetica en de epigenetica wordt beschreven en de klinische toepasbaarheid hiervan wordt bediscussieerd.

Veelbelovende nieuwe inzichten in de epigenetische afwijkingen van niercelkanker kan de biologische achtergrond verduidelijken en kan leiden tot de identificatie van biomarkers. Afwijkingen in DNA methylering is de meest bekende en onderzochte epigenetische verandering in kanker en heeft veelbelovende mogelijkheden om als biomarker te dienen. Methylering van de promotor van een gen kan leiden tot uitschakeling van dit specifieke gen. Bevestiging van de theorie dat deze kenmerken in kanker van klinisch belang kunnen zijn is al uitgebreid beschreven in de literatuur en een aantal worden zelfs al in de kliniek gebruikt. Wij veronderstellen dat het bestuderen van alle veranderingen aan het DNA door methylering in het heldercellig niercelcarcinoom, het zogenaamde methyloom, zal zorgen voor een beter inzicht in de tumorbiologie en voor

het ontdekken van kenmerken die geassocieerd zijn met prognose van niercelkankerpatiënten. Gebruikmakend van de nieuwste technologieën om tumorspecifieke DNA methylering in niercelkanker te analyseren hebben we genen ontdekt die specifieke methylering vertonen in de promotoren van deze genen, die mogelijk ook een tumoronderdrukkende functie bezitten. De identificatie van deze genen is beschreven in **hoofdstuk 3 en 5**. Van de vier genen die op deze manier ontdekt zijn, *Gremlin1* (*GREM1*), *Ladinin1* (*LAD1*), *neurofilament heavy polypeptide* (*NEFH*), and *Neuralized* (*NEURL*), heeft promoter methylering een sterk voorspellende waarde voor de overleving van nierkankerpatiënten. Dit is bewezen in twee grote onafhankelijke groepen (n=150 en n=185) van primair nierkankerweefsel. Wanneer de promotoren van deze vier genen tegelijkertijd gemethyleerd zijn hebben patiënten een sterk verhoogd risico om aan de ziekte te overlijden. Dit is zowel in de eerste groep als ook, onafhankelijk van andere klinische en pathologische tumorkenmerken, in de tweede groep gevonden. Het resultaat is een veelbelovend methylerings-marker panel dat de prognose van niercelkankerpatiënten voorspelt nadat deze chirurgie hebben ondergaan. Het herkennen van deze groep patiënten met een hoog risico op overlijden kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe onderzoeken met patiënten die na de chirurgische ingreep adjuvant behandeld worden om de overlevingskansen te vergroten.

Aangezien we aannemen dat goede biomarkers ook biologisch relevant zijn, hebben we de functionele rol bestudeerd van deze genen in het heldercellig niercelcarcinoom (**hoofdstuk 5**). Deze data suggereren een complementaire tumoronderdrukkende rol van *NEURL* en *GREM1*. *NEURL* zorgt voor het remmen van de tumorgroei en *GREM1* zorgt ervoor dat de tumorcellen minder goed zullen migreren en invaderen. Het uitschakelen van deze genen in de tumor door bijvoorbeeld promoter methylering zorgt er dus voor dat de tumor kan groeien en zich kan verspreiden. Het bestuderen van de biologische functie van *LAD1* en *NEFH* in cellen van het heldercellig niercelcarcinoom gaf geen eenduidig resultaat betreffende hun rol in tumorgroei en/of verspreiding. Hierdoor kunnen momenteel geen duidelijke conclusies getrokken worden met betrekking tot hun functie in het heldercellig niercelcarcinoom.

Het uitgebreid bestuderen van de promoter methylering van het gen *GREM1*, zoals beschreven in **hoofdstuk 3**, laat zien dat regiospecifieke methylering van belang is bij de associatie met klinische parameters en prognose. Deze belangrijke observatie suggereert dat onderzoek doen naar methylering complexer blijkt dan voorheen gedacht. Om het belang van deze bevinding beter te bestuderen, hebben we de bestaande literatuur doorzocht op soortgelijke effecten van locatiespecifieke DNA methylering met betrekking tot genexpressie en/of associaties met klinische en pathologische kenmerken van kanker. In **hoofdstuk 4** verklaren we de misvatting en het versimpelen van de link tussen methylering en het onderdrukken van de genexpressie, zoals die in de huidige literatuur vaak aanwezig is. Hierdoor willen we het begrip van de complexiteit verbeteren en het belang van locatie in onderzoek naar methylering toelichten en benadrukken. Uiteindelijk zal dit leiden tot zeer accurate identificatie van biologisch en klinisch relevante locaties van DNA methylering, wat deze data geschikt maakt voor gebruik in de kliniek.

In het laatste experimentele onderzoek, beschreven in **hoofdstuk 6**, willen we analyseren of het methyloom van het heldercellig niercelcarcinoom verschilt van het methyloom van andere epitheliale kankersoorten, daar het genetische profiel van het heldercellig niercelcarcinoom uniek blijkt te zijn ten opzichte van andere tumoren. Gebruikmakend van dezelfde technologieën als beschreven in hoofdstuk 5, vergelijken we het methyloom van het heldercellig niercelcarcinoom met dat van dikke darm- en endeldarmkanker en borstkanker. Zover we op dit moment kunnen concluderen, blijkt dat deze methylomen niet van elkaar verschillen wat betreft grootte of de processen waar ze bij betrokken zijn. We hebben belangrijke biologische cascades gevonden die in alle drie de kankersoorten aangedaan worden, echter door unieke veranderingen. Bijkomende analyses zullen nog gedaan moeten worden om dit te verduidelijken, maar uit deze eerste analyses zijn al diverse ziekte-gerelateerde genen geïdentificeerd.

Hoofdstuk 7 vat de belangrijkste bevindingen uit de gepresenteerde studies samen en bespreekt hoe deze data in de toekomst gebruikt kunnen worden in de klinische praktijk. Concluderend geeft dit proefschrift een overzicht van de huidige kennis betreffende de genetica en de epigenetica van het niercelcarcinoom en daarbij de toepassingen zoals die momenteel in de kliniek beschikbaar zijn. Ondanks de wetenschappelijke vooruitgang de afgelopen jaren blijft de behandeling van niercelkankerpatiënten verre van volmaakt en is er veel ruimte voor verbetering. Het werk beschreven in dit proefschrift biedt nieuwe inzichten in de manier van het verrichten van DNA methylering-onderzoek, in de biologie van het heldercellig niercelcarcinoom en heeft geleid tot de identificatie van veelbelovende biomarkers die de prognose van patiënten met een heldercellig niercelcarcinoom kunnen voorspellen. In de toekomst zullen deze markers *in vitro* en *in vivo* gevalideerd dienen te worden teneinde hun mogelijke tumoronderdrukkende rol alsook hun waarde voor de kliniek te bevestigen. Het blijft een uitdaging om een volledig individueel behandelingstraject compleet afgestemd op het (epi)genoom van de patiënt te realiseren om niet alleen de prognose te kunnen voorspellen, maar ook de effectiviteit van de behandeling evenals de te verwachte ernst van de bijwerkingen.