

(Epi-) genetic profiling of colorectal cancer : prognostic and biological relevance, with emphasis on tumor-hypoxia

Citation for published version (APA):

Cleven, A. H. G. (2012). *(Epi-) genetic profiling of colorectal cancer : prognostic and biological relevance, with emphasis on tumor-hypoxia*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20120601ac>

Document status and date:

Published: 01/01/2012

DOI:

[10.26481/dis.20120601ac](https://doi.org/10.26481/dis.20120601ac)

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

Summary

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancer types worldwide and approximately 50% of patients with CRC die due to the disease. The histology based Tumor Node Metastasis (TNM) system is currently the best tool to provide information on prognosis and to determine treatment protocols in CRC. Although this anatomical based staging system predicts the survival accurately, variation in the course of the disease and response to treatment among individuals within the same stage exists. Therefore the identification of new prognostic and predictive markers for CRC to determine prognosis and to identify patients that need adjuvant therapy respectively is urgently needed. Understanding the underlying biology of CRC will provide novel molecular markers to accurately predict prognosis and improve treatment options besides the traditional histological staging system.

The **aim** of this thesis was to study genetic and epigenetic alterations in relation to morphological features and hypoxia in CRC, providing insight in the underlying biology of CRC and possibly yielding relevant novel prognostic information.

In chapter 1 we introduce the (epi)-genetic alterations that underlie the process of cancer development and discuss the molecular phenotypes of CRC: chromosomal instability (CIN), microsatellite instability (MSI) and the CpG island methylator phenotype (CIMP). Furthermore, the importance of hypoxia within solid tumors like CRCs is pinpointed, by explaining the cellular responses during hypoxia, with special emphasis on the tumor associated stroma.

In chapter 2, we review the current knowledge on the epidemiology, diagnosis, treatment and the prognostic and predictive value of (epi)genetic markers in CRC.

In the first experimental study (Chapter 3) we classified CRCs by computer assisted unsupervised hierarchical clustering, based upon well described markers in the genesis of CRC including: CIMP, MSI, *APC*-, *KRAS*-, *TP53*-, and *BRAF* mutation status, in a series of 160 CRCs. Subsequently, we investigated in which way this classification was related to patient data, including clinicopathological parameters, morphological features (differentiation grade, mucinous differentiation, dirty necrosis, circumscribed tumor growth, tumor budding and lymphocyte infiltration) and biological behavior in terms of patient prognosis.

These analyses revealed that for molecular clustering of colorectal adenocarcinomas, CIMP status was the principal classifier, and that both

CIMP+ and CIMP- tumors were further classified on the basis of *TP53* mutational status. Hierarchical clustering was only modestly related to morphology and outcome, which appeared to be dependent on additional factors such as microsatellite stability and localization in the intestine. Although molecular clustering provided insight in the underlying biology of CRC, it did not improve traditional staging with respect to prognostic value.

Data on the prognostic significance of promoter CpG island methylation in CRC are conflicting, possibly due to associations between methylation and other factors affecting survival such as genetic alterations and use of adjuvant therapy. Therefore in chapter 4 we examined the prognostic impact of promoter methylation of 19 tumor suppressor- and DNA repair genes and CIMP, as defined by Weisenberger *et al.*, in CRC patients treated with surgery alone in the context of MSI, *BRAF*- and *KRAS* mutations. Our study failed to demonstrate a consistent prognostic effect of CIMP, however we identified promoter CpG island methylation of *CHFR* as a prognostic biomarker in stage II, MSS, *BRAF* wild-type CRCs in two independent populations of CRCs.

Chapter 5 reviews the evidence for *CHFR* as a prognostic and predictive biomarker in a diversity of solid malignancies including CRC.

In CRC, the importance of hypoxia has been demonstrated by clinical studies in which hypoxia predicts for worse outcome and resistance to chemotherapy and radiotherapy. Therefore, in chapter 6 we studied the role of protein expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α , HIF-2 α , carbonic anhydrase 9 (CA9) and glucose transporter 1 (GLUT1) in patients with colorectal adenocarcinomas. Expression of these hypoxia markers was detected in the epithelial compartment of the tumor cells as well as in tumor associated stromal cells. Although epithelial tumor cells frequently showed expression of one or more of the investigated hypoxia markers, no correlation among these markers or with clinical response was found. In contrast to this, within the tumor stroma, expression of HIF-2 α and CA9 were both associated with a significantly reduced overall survival. In the Cox proportional hazard model, stromal HIF-2 α expression was an independent prognostic factor for survival. Our study suggested that tumor hypoxia may influence tumor associated stromal cells in a way that ultimately contributes to patient prognosis.

Since epigenetic silencing might play a role in the cellular responses to hypoxia, in chapter 7 we investigated whether hypoxia in CRC is associated with promoter CpG island methylation of genes involved in important tumor biological processes such as: *MGMT*, *CHFR*, *HLTF*, *MLH1*, *RASSF1A* (genomic instability), *p14ARF*, *p16INK4A* (limitless replication potential),

ADAM23, *TFPI2* (tissue invasion and metastasis), *APC* (insensitivity to anti-growth signals), *SOCS1* (self-sufficiency in growth signals), *THBS1* (sustained angiogenesis), and *BNIP3*, *NEURL*, *RUNX3*, *RAB32* (evasion of apoptosis). This study showed that stromal expression of hypoxia regulated proteins HIF-2 α and CA9 was associated with promoter CpG island methylation of genes involved in important tumor biological processes. Tumors with hypoxic features did not show increased overall CpG island promoter methylation, but rather harboured specific methylated cancer biology related genes, which could contribute to the more aggressive behaviour of these tumors.

Finally in chapter 8 we studied whether tumor cell death, regulated by a hypoxic stromal microenvironment could be of importance in the observed poorer prognosis in CRC with stromal expression of HIF-2 α and CA9. Therefore, we correlated apoptosis, *TP53* mutational status and *BNIP3* promoter hypermethylation (both genes involved in regulation of apoptosis) of CRC cells with HIF-2 α and CA9 related poorer outcome. Our study showed that the effect of HIF-2 α as an indicator of a poorer prognosis was dependent on wild-type *TP53* and not methylation status of *BNIP3*. It appeared that wild-type *TP53* in CRC cells favors progression of tumors expressing markers for hypoxia in their stroma, rather than in the epithelial compartment. We also showed that preserved BNIP3 function in CRC cells lowers apoptosis, and may thus be involved in alternative cell death pathways, such as autophagic cell death. Our study suggested that the biology of CRC cells can be modified by alterations in the tumor microenvironment under conditions of tumor hypoxia.

In conclusion, this thesis demonstrated the importance of CIMP in subcategorizing CRC's, which could further be characterized by *TP53* mutations and microsatellite stability status. It turned out that methylation of individual genes may play a specific role in the process of tumorigenesis and tumor progression, as exemplified by the validated prognostic value of *CHFR*. Besides methylation of individual genes, hypoxia related protein expression of HIF-2 α and CA9 in the tumor associated stroma was associated with a poorer patient survival compared to expression of these markers in epithelial tumor cells. We have reasons to believe that promoter CpG island methylation and mutations of crucial cancer genes are involved in the observed more aggressive behaviour of these hypoxic tumors. Future studies are needed to unravel the pathways involved and establish the role of (epi-)genetic markers for treatment stratification of patients in addition to the traditional staging method.

Samenvatting

Samenvatting

Colorectaal carcinoom (CRC), ook wel kanker van de dikke darm en endeldarm genoemd, is een veelvoorkomende vorm van kanker en ongeveer de helft van patiënten met CRC sterft als gevolg van de ziekte. Op basis van het 'Tumor node Metastasis' systeem, een histologisch stadiërings systeem, worden de prognose en de behandelingskeuze van patiënten met CRC bepaald. Ondanks dat dit histologisch stadiërings systeem de overleving van groepen van patiënten accuraat voorspelt, bestaat er binnen eenzelfde stadium van CRC een variatie in het beloop van de ziekte en respons op adjuvante therapie. Dit illustreert dat er een dringende behoefte is aan nieuwe, additionele moleculaire merkers, die de respons op adjuvante therapie en de prognose van patiënten met CRC beter kunnen voorspellen. De verwachting is, dat met het verrichten van onderzoek naar de moleculaire 'pathways', die ten grondslag liggen aan deze ziekte, nieuwe moleculaire merkers ontdekt kunnen worden. Deze nieuwe, moleculaire merkers zouden, naast het huidige histologische stadiërings systeem, de prognose van patiënten beter moeten kunnen voorspellen en mogelijk nieuwe therapeutische opties voor patiënten kunnen identificeren. Het doel van dit proefschrift was het bestuderen van genetische en epigenetische afwijkingen in relatie met morfologische kenmerken en hypoxie in CRC, om met behulp hiervan, nieuwe inzichten in de biologie van CRC te verwerven en mogelijke nieuwe bruikbare prognostische merkers voor patiënten met CRC te ontdekken.

In hoofdstuk 1 wordt een introductie gegeven over de bestaande (epi)-genetische afwijkingen die de ziekte CRC in drie verschillende moleculaire subgroepen verdelen: chromosomale instabiliteit (CIN), microsatelliet instabiliteit (MSI) en het CpG-eiland methylerings fenotype (CIMP). Tevens wordt er in dit hoofdstuk een overzicht gegeven van de rol van hypoxie in CRC; de cellulaire paden die hierbij betrokken zijn, en in het bijzonder de rol van het tumor geassocieerde stroma hierin.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de epidemiologie, diagnose, behandeling, prognostische en voorspellende waarde van (epi)-genetische merkers in CRC.

De eerste experimentele studie (hoofdstuk 3) beschrijft de resultaten die gevonden werden met het 'unsupervised' hiërarchisch clusteren van 160 CRCs op basis van genetische en (epi)-genetische afwijkingen waaronder: CIMP, MSI, *APC*-, *KRAS*-, *TP53*-, en *BRAF* mutaties. Vervolgens werd er onderzocht in hoeverre de verkregen moleculaire clusters, correleerden met klinisch relevante patiënten gegevens, morfologische tumorkenmerken (differentiatie graad, mucineuze differentiatie, necrose, circumscribede tumorgroei, tumor

budding en lymfocytair infiltratie) en overleving van patiënten. Uit deze analyse bleek dat CRCs in eerste instantie op basis van CIMP onderverdeeld werden in CIMP+ en CIMP- tumoren en vervolgens op basis van *TP53* mutaties verder onderverdeeld werden. Hiërarchisch clusteren was slechts in geringe mate gecorreleerd aan morfologische tumorkenmerken en patiënten overleving. Deze correlaties bleken afhankelijk te zijn van andere factoren zoals microsatelliet instabiliteit en de locatie van de tumor in de darm. Onze moleculaire cluster analyse geeft nieuwe inzichten in de onderliggende biologie van CRC, echter de clusters bezitten geen toegevoegde prognostische waarde in vergelijking met het traditionele, histologisch gebaseerde stadiëringssysteem.

Hoofdstuk 4 richt zich op het bestuderen van de prognostische waarde van CIMP, (gedefinieerd door Weisenberger *et al.*) en promotor CpG-eiland methylering van 19 andere tumor suppressor- en DNA reparatie genen in patiënten met CRC. Omdat dit soort studies vaak wordt verstoord door factoren die een invloed hebben op het ziektebeloop, zoals genetische afwijkingen en chemotherapie, werd in onze studie de prognostische waarde bestudeerd onafhankelijk van MSI, *BRAF*, *KRAS* mutaties en tumor stadium in een populatie van patiënten met CRC die uitsluitend behandeld werden middels chirurgie. Uit deze analyse kwam naar voren dat niet CIMP, maar promotor CpG-eiland methylering van een individueel gen, het *CHFR* gen, een prognostisch effect toonde in stadium II, microsatelliet stabiele, *BRAF* wildtype CRC; in twee onafhankelijke studie populaties van CRCs.

Hoofdstuk 5 geeft een literatuur overzicht over veranderingen die optreden in de expressie van het *CHFR*-gen in verschillende kanker soorten waaronder CRC en de mogelijke rol van *CHFR* als een biomerker.

Een belangrijke rol voor hypoxie in CRCs is gebleken uit studies die laten zien dat hypoxie gerelateerd is aan een slechtere overleving van patiënten met CRC en resistentie voor chemo- en radiotherapie. Vandaar dat we in hoofdstuk 6 de expressie bestuderen van de hypoxie gereguleerde eiwitten HIF-1 alpha, HIF-2 alpha, CA9 en GLUT1 in patiënten met CRC. Hieruit bleek dat in CRC de expressie van deze hypoxie gereguleerde eiwitten zowel in de epitheliale tumorcellen als in de tumor geassocieerde stromale cellen voorkwam. Echter, in tegenstelling tot expressie in epitheliale tumorcellen, was de expressie van hypoxie gerelateerde eiwitten HIF-2 alpha en CA9 in stromale cellen gerelateerd aan een slechtere overleving van patiënten met CRC. Dit onderzoek suggereert dat hypoxie in tumoren stromale cellen dusdanig beïnvloedt dat dit uiteindelijk resulteert in een slechtere prognose voor CRC patiënten.

Het is bekend dat promoter CpG-eiland methylering betrokken is bij de cellulaire respons van tumoren tijdens hypoxie. Vandaar dat er in hoofdstuk 7 onderzocht is of de expressie van hypoxie eiwitten in CRC geassocieerd is met promoter CpG-eiland methylering van genen die een rol spelen in belangrijke kanker gerelateerde processen waaronder: *MGMT*, *CHFR*, *HLTF*, *MLH1*, *RASSF1A* (genoom instabiliteit), *p14ARF*, *p16INK4A* (ongelimiteerde celdeling), *ADAM23*, *TFPI2* (invasieve groei en metastasering), *APC* (ongevoeligheid voor groeiremmende signalen), *SOCS1* (zelfvoorzienend in groeifactoren), *THBS1* (onbeperkte angiogenese), en *BNIP3*, *NEURL*, *RUNX3*, *RAB32* (voorkomen van apoptose). Onze resultaten toonden aan dat niet de expressie van hypoxie eiwitten in de epitheliale tumorcellen, maar juist in de stromale cellen geassocieerd was met promoter CpG-eiland methylering van diverse genen die een belangrijke rol spelen in kanker gerelateerde processen. Dit onderzoek suggereert dat genmethylering in hypoxische tumoren niet een willekeurig proces betreft, maar juist gekenmerkt wordt door methylering van specifieke kanker gerelateerde genen, waardoor deze hypoxische tumoren in staat zijn zich agressiever te gedragen.

Ten slotte is in hoofdstuk 8 onderzocht of tumorcel dood en hieraan gerelateerde (epi-)genetische afwijkingen in de epitheliale tumorcellen, geassocieerd zijn met de geobserveerde slechtere overleving van CRC patiënten met expressie van hypoxie eiwitten in stromale cellen. Hiervoor werd er in epitheliale tumorcellen gekeken naar afwijkingen in apoptose regulerende genen zoals *TP53* en *BNIP3*, en onderzocht of deze gen afwijkingen gecorreleerd waren met de slechtere overleving van CRC patiënten met stromale expressie van hypoxie eiwitten HIF-2 α en CA9. Uit dit onderzoek bleek dat de geobserveerde slechtere prognose van CRC patiënten met expressie van HIF-2 α in stromale cellen, gecorreleerd was met wild-type *TP53* en onafhankelijk van de methylerings status van *BNIP3*. Kennelijk draagt ongemuteerd *TP53* ertoe bij, dat tumoren met stromale expressie van hypoxie eiwitten progressie laten zien, in tegenstelling tot tumoren met expressie van hypoxie eiwitten in de epitheliale tumorcellen. Verder bleek dat een behouden functie van het *BNIP3* gen resulteerde in minder apoptose, en dus mogelijk betrokken is bij een alternatief tumorcel dood mechanisme, zoals 'autofagie' gereguleerde tumorcel dood. Onze studie laat zien dat de biologie van CRC cellen gemodificeerd wordt door hypoxie in het tumor geassocieerde micro-milieu.

Concluderend leveren de resultaten van dit proefschrift nieuwe inzichten in de ontstaanswijze van colorectale tumoren. Men kan op basis van (epi-)genetische afwijkingen zoals CIMP, *TP53* mutaties en microsatelliet

instabiliteit, CRCs onderverdelen in aparte subgroepen, waarbij individuele epigenetische merkers zoals *CHFR* methylering, een onafhankelijke en gevalideerde prognostische merker bleken te zijn. Naast DNA promotor methylering van individuele genen, was de expressie van hypoxie eiwitten HIF-2 α en CA9 in stromale cellen gerelateerd aan een slechtere overleving van CRC patiënten en aan methylering van specifieke kanker gerelateerde genen. Toekomstige studies zullen de betrokken celbiologische processen moeten ophelderen en het potentiële belang van epigenetische merkers voor het bepalen van de therapie in CRC patiënten moeten aantonen.