

Renal cell cancer : a molecular-epidemiological approach to unravel new pathways underlying disease etiology and prognosis

Citation for published version (APA):

Deckers, I. A. G. (2015). *Renal cell cancer : a molecular-epidemiological approach to unravel new pathways underlying disease etiology and prognosis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20150629id>

Document status and date:

Published: 01/01/2015

DOI:

[10.26481/dis.20150629id](https://doi.org/10.26481/dis.20150629id)

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



S

Several risk factors have been established to increase the risk of renal cell cancer (RCC). However, the effects that these factors have on RCC risk are rather modest and, in general, the etiology of RCC is still poorly understood. In order to advance in the field of RCC and gain insight into its etiology and prognosis, it is important to search beyond current perspectives and generate new hypothesis for future research. Therefore, the overall aim of this thesis is to unravel novel risk factors and disease pathways implicated in renal (patho)physiology in the etiology and prognosis of RCC.

In **part 1 (chapter 2)** of this thesis, we investigated the role of sodium intake, potassium intake and fluid intake in relation to RCC risk using a traditional epidemiological approach. We identified that sodium intake is a novel risk factor for RCC, particularly if fluid consumption is low. This interaction between sodium and fluid intake supports our hypothesis that, given the link between sodium and fluid homeostasis in renal physiology, the balance between sodium and fluid intake is important in RCC etiology. We found no indications for modifying or mediating effects of hypertension. This suggests that sodium intake may increase RCC risk independently of hypertension. In addition, we observed that fluid and potassium intake were not associated with RCC risk.

In **part two (chapters 3 and 4)** of this thesis, we investigated the role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in candidate genes and their potential interplay with the environment in RCC etiology using a molecular-epidemiological approach. **Chapter 3** focused on the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) as potential disease mechanism. We showed that two candidate SNPs in *AGTR1* were associated with RCC risk; the homozygote rare genotype of *AGTR1_rs1492078* decreased RCC risk, whereas the homozygote rare genotype of *AGTR1_rs5186* increased RCC risk. Hypertension modified the association between *AGT_rs3889728* and RCC risk. Interactions between dietary intakes (sodium, potassium and fluid) were not significant. However, sodium intake was differentially associated with RCC risk defined by genotypes of several SNPs in genes involved in the RAAS. These results indicate a biologic interaction instead of a statistical interaction. In **chapter 4** we investigated the role of gene-environment interactions in ion transport mechanisms (ITMs) as potential disease mechanism. We tested main effects of 13 candidate SNPs in ITM genes and gene-environment interactions between these SNPs and associated environmental factors, including dietary intakes of sodium, potassium and fluid, hypertension and diuretic medication. Only *ADD1_rs4961* was significantly associated with RCC risk in the main effects analyses. Additionally, three out of four significant gene-environment interactions clustered in *SLC9A3_rs4957061*, which indicates involvement of *SLC9A3_rs4957061* in RCC etiology. Nevertheless, the body of evidence is too weak to support the hypothesis that the mechanism of ion transport is a disease mechanism in RCC etiology.

In **part 3 (chapters 5-7)** of this thesis, we classified the clear-cell RCC tumor according to promoter CpG island hypermethylation of a subset of genes to study molecular subtype-specific etiology (**chapters 5 and 6**) and prognosis (**chapter 7**) using the approach of molecular pathological epidemiology (MPE). In **chapter 5** we classified the clear-cell RCC tumor according to a promoter methylation index of genes specifically selected for their involvement in the mechanism of ion transport. We investigated dietary intakes that are linked to ITMs, i.e. sodium, potassium and fluid intake, as potential risk factors for clear-cell RCC using these molecular subtypes. We found that the intake of potassium, but not sodium or fluid, was differentially associated with the molecular subtypes of clear-cell RCC. High *versus* low potassium intake was associated with a lower clear-cell RCC risk for unmethylated tumors and a higher clear-cell RCC risk for tumors with a high promoter methylation index. Thus, this study illustrates that risk factors may differ according to molecular subtypes of the tumor. In addition, we showed the first evidence for a potential role of ITMs in RCC etiology. In **chapter 6**, we determined promoter CpG island hypermethylation status for a larger, more general panel of genes and classified the clear-cell RCC tumor accordingly. We investigated dietary intakes that may be linked to the general mechanism of methylation, i.e. alcohol and folate intake, in relation to these molecular subtypes. We did not observe differential associations between alcohol and folate intake and molecular subgroups of the clear-cell RCC tumor defined by promoter CpG island hypermethylation. Therefore, this study does not support the hypothesis that promoter CpG island hypermethylation of this gene panel may be the disease mechanism linking alcohol and folate intake to clear-cell RCC risk. In **chapter 7**, we classified the clear-cell RCC tumor by the presence of promoter CpG island hypermethylation of the cysteine dioxygenase type 1 (*CDO1*) gene and evaluated these molecular subgroups in a prognostic setting. Results demonstrated that patients with promoter CpG island hypermethylation of *CDO1* have a significantly poorer clear-cell RCC-specific 10-year survival than those without. Differences in survival were independent of common prognostic makers, including age at diagnosis, sex, TNM stage, tumor size and Fuhrman grade. Thus, promoter CpG island hypermethylation of *CDO1* offers additional, relevant, prognostic information, but may not substitute common prognostic makers to predict clear-cell RCC-specific 10-year survival. Results were validated in clear-cell RCC cases from The Cancer Genome Atlas (TCGA).

Finally, this thesis concludes with a summary and interpretation of main findings, a general discussion and implications for future RCC research (**Chapter 8**). After extensive considerations of the most important methodological issues, we concluded that this thesis provides the first evidence that dietary sodium intake and renal (patho)physiological mechanisms (i.e. the RAAS and ITMs) were implicated in RCC etiology. Thus, this thesis shows that (molecular) epidemiological research in RCC may benefit from a more renal (patho)physiologic perspective. Moreover, we illustrated

that molecular (pathological) epidemiology is a promising new field of research which can be used to provide insight into underlying biologic pathways of disease.

Samenvatting



S

Jaarlijks wordt er in Nederland bij ongeveer 10 per 100,000 mensen nierkanker gediagnostiseerd. Daarmee staat nierkanker op de 7^e plaats van meest voorkomende vormen van kanker. Nierkanker komt vaker voor bij mannen dan bij vrouwen en naar mate men ouder wordt. Het is bekend dat ook andere factoren naast geslacht en leeftijd het risico op nierkanker kunnen verhogen; zoals overgewicht, roken, hoge bloeddruk en familiale aanleg. Tegelijkertijd zouden een gematigde inname van alcohol en het eten van voldoende groentes en fruit het risico op nierkanker juist verlagen. Toch is het tot op heden niet precies bekend hoe nierkanker ontstaat.

In dit proefschrift maken we gebruik van een nieuwe invalshoek om het ontstaan van nierkanker te onderzoeken om op deze manier tot nieuwe inzichten te komen ten aanzien van de ontwikkeling van deze kanker. Het doel van dit proefschrift is het ontdekken van nieuwe risicofactoren en biologische mechanismen, welke enerzijds gerelateerd zijn aan de nierfysiologie en anderzijds het ontstaan van nierkanker of de overleving van patiënten met nierkanker kunnen beïnvloeden.

We hebben deze vraagstelling onderzocht in een groot, prospectief, cohort onderzoek onder gezonde mensen uit de algemene Nederlandse bevolking, namelijk in de Nederlandse Cohort Studie naar voeding en kanker (NLCS). In 1986 retourneerden 120,852 deelnemers een vragenlijst over hun voedingsinname en verschillende andere leefstijlfactoren. Ook verzamelden we teennagels die we later hebben kunnen gebruiken voor het bepalen van de genetische variatie tussen de deelnemers. We volgden deze deelnemers tot 2006, dus meer dan 20 jaar. In totaal kregen 608 van de deelnemers tijdens deze 20 jaar een vorm van nierkanker. In de analyses hebben we de deelnemers met nierkanker vergeleken met een willekeurige subgroep van 5.000 deelnemers uit het totale cohort.

In het eerste deel van dit proefschrift (hoofdstuk 2) stond de relatie tussen de inname van zout, kalium en vocht, en het risico op nierkanker centraal. Met een traditioneel epidemiologische benadering konden we aantonen dat er een verband is tussen een hoge inname van zout en nierkanker. Dit verband leek sterker wanneer er tegelijkertijd ook sprake was van een lage inname van vocht. Deze bevinding suggereert dat de balans tussen zout- en vochtinname mogelijk belangrijk is bij het ontstaan van nierkanker. We konden in dit hoofdstuk geen verband aantonen tussen een hoge inname van kalium en het risico op nierkanker. Het is bekend dat zout het risico op hoge bloeddruk vergroot, terwijl hoge bloeddruk weer een risicofactor is van nierkanker. Echter, het verband dat wij vonden voor hoge zoutinname en nierkanker werd niet verklaard door hoge bloeddruk.

In het tweede deel van dit proefschrift (hoofdstuk 3 en 4) hebben we genetische variatie onderzocht in twee fysiologische systemen die in de nier een belangrijke rol spelen bij het reguleren van de bloeddruk en de zout- en vochtbalans van ons lichaam,

namelijk het renine-angiotensine-aldosteron systeem (RAAS) en ion-transport mechanismen (ITM). Genetische variaties in deze fysiologische systemen zouden een potentiële verklaring kunnen zijn voor het verband tussen een hoge zoutinname en het risico op nierkanker dat we eerder al hadden gevonden. Om hiervoor aanwijzingen te vinden hebben we zogenaamde gen-omgeving interacties in het risico op nierkanker onderzocht tussen 26 verschillende genetische varianten aan de ene kant en het dieet (bijvoorbeeld zoutinname) aan de andere kant. Hiervoor gebruikten we een moleculair-epidemiologische benadering. Door middel van deze zogenaamde gen-omgeving interacties konden we bewijzen dat RAAS wellicht een rol speelt bij het ontstaan van nierkanker. We vonden namelijk voor meerdere genetische varianten dat het risico op nierkanker bij een hoge zoutinname voor deelnemers met de genetische variant anders was dan voor deelnemers zonder de genetische variant. Daarnaast vonden we dat een bepaalde genetische variant het risico op nierkanker bij aanwezigheid van een hoge bloeddruk veranderde. In tegenstelling tot deze resultaten in het RAAS, konden we niet aantonen dat ook ITM een mogelijke rol spelen bij het ontstaan van nierkanker.

In het derde deel van dit proefschrift (hoofdstuk 5-7) onderzochten we tumorheterogeniteit zowel in relatie tot de ontwikkeling van nierkanker, als in relatie tot de overleving van patiënten met nierkanker. Het vermogen om genen aan- en uit te zetten, onderdeel van de epi-genetica, kan een kenmerk zijn van hoe een tumor is ontstaan, maar ook van hoe een tumor zich zou kunnen ontwikkelen. In twee studies hebben we onderzocht of we met behulp van een bepaalde vorm van deze epi-genetica, namelijk DNA methylering, groepen van niertumoren met verschillen in risicofactoren zouden kunnen onderscheiden. In de ene studie onderzochten we DNA methylering in genen die gerelateerd zijn aan ITM en in de andere studie gebruikten we een groep genen met verschillende functies. De eerste studie liet zien dat een hoge kaliuminname verband houdt met een verlaagd risico op nierkanker in de groep zonder DNA methylering in de ITM genen (wanneer deze genen dus 'aan' staan) en een verhoogd risico op nierkanker in de groep met veel DNA methylering in de ITM genen (wanneer deze genen dus 'uit' staan). Deze bevinding is niet in lijn met de bevindingen van hoofdstuk 2, waarin we juist geen verband konden aantonen tussen een kaliuminname en het risico op nierkanker. Hiermee bewijzen we dus dat risicofactoren kunnen verschillen op basis van de tumorheterogeniteit tussen niertumoren. Bovendien vonden we, in tegenstelling tot ons eerder onderzoek in hoofdstuk 4, dat ook ITM een mogelijke rol spelen bij het ontstaan van nierkanker. In de tweede studie over tumorheterogeniteit op basis van de groep genen met verschillende functies konden we geen groepen van niertumoren onderscheiden met verschillen in risicofactoren (alcohol- en folaatname). Tenslotte, hebben we in de laatste studie onderzocht of we met behulp van DNA methylering in een specifiek gen, het cysteine dioxygenase type 1 (*CDO1*) gen, nierkankerpatiënten met verschillen in overleving kunnen onderscheiden. In de literatuur staat al beschreven dat DNA

methylering van het *CDO1* gen borstkankerpatiënten met verschillen in overleving kan onderscheiden. Onze studie laat nu zien dat ook nierkankerpatiënten met DNA methylering van het *CDO1* gen na 10 jaar een lagere overlevingskans hebben dan nierkankerpatiënten zonder DNA methylering in het *CDO1* gen.

We kunnen dus concluderen dat we met dit proefschrift een hoge zoutinname, in het bijzonder in combinatie met een lage vochtinname, als nieuwe risicofactor voor het ontstaan van nierkanker hebben geïdentificeerd. Daarnaast hebben we aanwijzingen gevonden voor de rol van twee fysiologische systemen in de nier, namelijk RAAS en ITM, bij het ontstaan van nierkanker. Daarmee hebben we laten zien dat toekomstig onderzoek naar het ontstaan van nierkanker inderdaad zou kunnen profiteren van onze nieuwe fysiologische invalshoek. Bovendien hebben we aangetoond dat het noodzakelijk is de tumorheterogeniteit tussen niertumoren te includeren in onderzoek naar de risicofactoren en de overleving deze kanker.