UPPSALA
UNIVERSITET

Neuroblastom och användning av hypermetylering som biomarkör för identifiering av tumörhämmande gener

Patrick Nylund

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2016
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag
Neuroblastom är en av de vanligaste cancerformerna som drabbar barn under 14 år. Överlevnadsgraden för högriskpatienter är endast ~59% . Cancerformens heterogenitet bidrar till en unik biologi och är således mycket svårbehandlad. Tidigare forskning har arbetat med att undersöka somatiska mutationer som behandlingsplattform. Problematiken är att denna utgångspunkt inte kunnat identifiera en generell cellulär föregångare till neuroblastom. Framsteg inom dess tumörbiologi har bidragit till att man fått utökad förståelse kring klassificering av nya fenotyper och därmed ytterligare ingångsvägar för behandling. Ökad insikt driver utvecklandet av nya behandlingsformer, baserade på epigenetiska markörer i DNA och histoner. Denna studie omfattar hypermetylering av DNA och histoner för att kartlägga hur dessa påverkar dess patogenes i olika stadier av metastasbildning. Förståelse av dess patogenes medverkar till ökade möjligheter för att diagnostisera viktiga fenotypiska markörer i neuroblastom. Hur denna metylering sker är oklart, dock har man konstaterat att sambandet mellan epigenetiska modifikationer och neuroblastoms genetiska ursprung är signifikant och inte kan ignoreras. Detta utgör en möjlighet för nya behandlingsformer med utgångspunkt i profilering av DNA- och histonmetylering för att reaktivera inhiberande cancerhämmande gener för att således stimulera regression av neuroblastom.

Inledning
Neuroblastom (NB) är en av de vanligaste icke-kraniala cancerformerna som drabbar barn under 14 år och utgör en stor del av de cancerincidenter som inträffar under livets första år i Sverige (Socialstyrelsen 2015). Varje år beräknas ett fall på ~7000 födslar (Brodeur 2003). Här bedöms det dock finnas ett större mörkertal eftersom NB passivt kan genomgå regression och därav aldrig uppmärksammas för behandling. Vidare bidrar detta till att den fenotypiska variationen av cancerceller skiljer sig kraftigt, från en regressiv till en aggressiv metastasfenotyp där konventionella behandlingsformer av cancer är ineffektiva (London *et al*. 2005). NBs ursprung utgår från embryoutvecklingsstadiet och utveckling av det perifera sympatiska nervsystemet. Med barn som får sin diagnos efter 1 år ökar sannolikheten för kraftig metastasbildning med fallande prognos (Brodeur 2003).

NB är en heterogen cancerform, vilket betyder att dess patogenes påverkas av flera faktorer. Heterogeniteten försvårar diagnostik då ett flertal genetiska variabler har identifierats. Dessa inkluderar kromosom ploidi-status, onkogen amplifikation (t.ex. *MYCN* amplifikation) och förlust av allelheterogenitet (Brodeur 2003). Med utgångspunkt i dessa variabler har ett tumörklassificeringssystem upprättats (Tabell 1) (Cohn *et al*. 2009). Patienter i stadie L1/L2 bedöms som låg/mellan risk men har med gällande passiv behandling, goda möjligheter till full återhämtning och bedöms att få en händelsefri överlevnad (HFÖ), utan återfall. Barn i stadie M/MS bedöms som högriskpatienter och motsvarar ~50% (Ikeda *et al*. 2002) av alla fall av NB varje år. En mer aggressiv behandlingsterapi är nödvändig och innebär låg/hög dos av cytostatika terapi, tumöroperation, strålning, benmärgstransplantation och krävande efterbehandling. Trots detta är överlevnadsgraden hos dessa patienter över en fyraårsperiod, endast ~59% (Louis & Shohet 2015). Mot bakgrund av detta är det av vital betydelse att kartlägga mekanismerna bakom NB:s maligna transformation i cellen och fokusera på att analysera cellulära processer som gör cellen mottaglig mot dessa förändringar. Next generation screening (NGS) av NB tumörer har påvisat en förhållandevis låg frekvens av mutationer i förhållande till andra cancerformer (t.ex. malign melanom) (Cheung & Dyer 2013). Vilket tyder på att tidigare forskning som fokuserat på att identifiera och behandla somatiska mutationer med målspecifik funktion inte är lika applicerbara på NB. Detta medför

att generella behandlingsmodeller och cancerterapier inte är lika effektiva vid behandling av NB (Cheung & Dyer 2013, Charlet *et al*. 2012).

Tabell 1. Klassificering av neuroblastomtumörer med avseende på det internationella riskstadiesystemet.[a]

Stadier av NB baserat på INRG	
Stadie	Klassificering
L1	Lokalt placerade tumörer som inte integrerats med vitala strukturer baserat på en lista över bilddefinierade risk faktorer (BDRF) och begränsat till ett kroppsligt utrymme
L2	Lokalt placerad tumör i närvaro av en eller fler BDRF.
M	Metastasbildning från det ursprungliga lokala tumörområdet till övriga kroppen. (Med undantag från stadium MS)
MS	Metastasbildning hos unga barn under 18 månaders ålder med metastaser begränsade till hud, lever och/eller benmärg.

[a] Baserad på Cohn *et al*. (2009).

Mot bakgrund av den begränsade HFÖ hos patienter i stadie M/MS, spelar epigenetiska studier en allt viktigare roll. Genetisk forskning kan inte enbart användas för att kartlägga alla fenotyper av NB och endast enklare generaliseringar av ursprunget till NB har kunnat påvisas. Det finns därför andra mekanismer som torde inverka på NB:s evolution. Att identifiera dessa mekanismer är därför av central betydelse för att hitta möjliga behandlingsformer som är målinriktade på fler fenotyper av NB (Bilke *et al*. 2005, De Preter *et al*. 2010, Westermann *et al*. 2008). Man har till följd av detta gjort epigenetiska undersökningar för att identifiera cellulära kommunikationsprocesser som reglerar både progressionen och utveckling av cancer (Olsson *et al*. 2016). En av de mer viktiga och studerade aspekterna är hur man med hjälp av epigenetisk hypermetylering av DNA kan identifiera nya fenotyper av NB (Cheung & Dyer 2013). De exakta mekanismerna för DNA metylering är inte fullt kända, dock har man konstaterat transkriptionella regulatoriska mekanismer som påverkar genuttryck hos NB. Undersökningar av metyleringsmönster i NB tumörer har visat att de förekommer hypermetylerade CpG öar (CGÖ) både i genpromotorregioner och i regioner mellan gener, så kallade icke-kodande DNA. Dessa modifikationer gör gener transkriptionellt inaktiva, vilket är problematiskt om de inträffar i tumörsupressorgener. (Olsson *et al*. 2016).

Följande studie har därför till syfte att klargöra hur epigenetisk hypermetylering av DNA kan användas till att identifiera fenotyper av NB samt hur dessa modifikationer kan användas för att utveckla nya metoder för diagnostisering och behandling. För att kunna närma sig denna problematik har följande frågeställning formulerats: Hur kan analyser av DNA:s hypermetyleringsmönster användas för att identifiera och diagnostisera NB samt hur detta kan medverka till nya behandlingsmetoder för patienter i stadie M och MS av NB?

Neuroblastom patogenes och genetisk bakgrund

Det exakta ursprunget för NB är ännu inte fullt kartlagt men studier (Brodeur 2003, Cheung & Dyer 2013, Olsson *et al*. 2016, Yang *et al*. 2010) har visat att det finns en stark koppling mellan NB och utvecklingen av det perifera sympatiska nervsystemet. Under embryogenesen och formationen av neuraltuben som utgör begynnelsen till det centrala nervsystemet, genomgår neurallistcellerna en mognadsprocess och bildar senare det perifera sympatiska nervsystemet. Dessa innehar multipotenta egenskaper likt stamceller och kan genomgå multicelldifferentiering med bibehållen cellkopia av ursprungscellens fenotyp, vilket regleras

av bland annat epigenetiska faktorer (Louis & Shohet 2015, Baggiolini *et al*. 2015). Sekvensering av individuella celler har resulterat i att man upptäckt återkommande somatiska mutationer i många epigenetiskt reglerande element (Forbes *et al*. 2011).

Patogenes hos neuroblastom

Störningar i neurallistcellernas mognadsprocess kan leda till att oönskade celler uppkommer. Dessa fenotyper innehar multipotenta egenskaper och potential till fenotypbevarande celldelning, vilket leder till att defekta stamcellsliknande fenotyper med multipla möjligheter till celldifferentiering skulle kunna påverka samtliga vävnader i det perifera sympatiska nervsystemet (Rogers *et al*. 2013). Processen kan därför leda till aggressivt stadium M/MS och bilda nervstrukturer i neuronala ganglier i det perifera sympatiska nervsystemet med ursprung i neurallistcellerna (Betters *et al*. 2010). Effekten av denna inhiberade cellreglering driver tumörogenes kring binjuremärgen eller är associerad till paraspinala sympatiska ganglier i bröstet/magen (Brodeur 2003). Ytterligare försvårande omständigheter är att några av dessa aggressiva fenotyper innehar samma möjlighet att uttrycka bland annat en cellbevarande MYCN-faktor, vilket ger hög proliferation och resistans till apoptos/nekros (Rogers *et al*. 2013).

Histologisk klassificering av M/MS fenotyper utgår ifrån grad av celldifferentiering hos vävnaden samt mitos-karyorrhexi index (MKI). MKI beskriver antal celler som genomgår mitosen alternativt karyorrhexi dvs nekros eller apoptos (Teshiba *et al*. 2014). Dessa är väsentliga element som spelar en viktig roll för hur man histologiskt kan avgöra skillnader mellan olika fenotyper av NB (Shimada *et al*. 2001). Det finns dock stöd (Esteller 2008, Holliday 1987, Tonini *et al*. 1997, Yang *et al*. 2010) för att de epigenetiska egenskaper som finns i dessa fenotypoer av NB kan användas för att hitta nya alternativ till histologi, vilket skulle utöka klassificeringen av tumörer där enbart genetiska studier inte är tillräckliga (Cheung & Dyer 2013).

Genetik och tumörogenes i neuroblastom

Genetiska studier av NB har inte resulterat i att man funnit en enskild genetisk förändring som ligger till grund för dess patogenes. NGS av NB tumörer hos högriskpatienter har visat få återkommande somatiska mutationer i dessa fenotyper, vilket delvis återspeglar den stora variationen av NB som återfinns. Det saknas dessutom stöd för att mutationsfrekvens i studerade tumörer skulle vara högre med stigande ålder. Detta är en indikation att det kan förekomma epigenetiska modifikationer i cellerna redan innan tumörbildning sker (Pugh *et al*. 2013). Genomförändringar som har observerats bedöms som subgrupper av NB och inkluderar inhiberad funktion av kromosom 1p och 11p samt en avreglering och därmed aktivering av kromosom 17p samt *MYCN* amplifikation (Decock *et al*. 2011), vilket har stor betydelse för en patients diagnos och således dennes prognos. Dock bedöms dessa som ett resultat av andra faktorer och är inte generellt gällande förändringar, giltiga för samtliga former av NB. Detta betyder att trots det faktum att de olika fenotyperna är mycket lika varandra, kommer dess heterogenitet inverka på responsen för olika behandlingar. Detta har bidragit till att man fokuserat stor del av forskningen på att identifiera onkogena kommunikationsvägar i cellen som plattform för behandling. Av de subgrupper som delvis urskiljes, delar man in NB i en ärftlig- och en spontanform. De vanligaste onkogena generna som identifierats och bör därmed ses som goda biomarkörer för potentiell målinriktad behandling i NB är *MYCN*, *ALK* och *PHOX2B* (Cheung & Dyer 2013, De Preter *et al*. 2010, Mossé *et al*. 2008, Raabe *et al*. 2008).

Ärftlig neuroblastom
Ärftlig tumörogenes är ovanligt och står endast för ~ 2% (Maris *et al*. 2002) av det totala antalet fall av NB (Cheung & Dyer, 2013). En av de vanligaste förekommande onkogena genmutationerna i ärftlig neuroblastom sker i *ALK* (Mossé *et al*. 2008). *ALK* agerar i det sympatiska nervsystemet och stimulerar utveckling av sympatiska nerver och cell-proliferation hos differentierade neurallistceller (Reiff *et al*. 2011). Eftersom *ALK* påverkas av *MYCN*, är höga koncentrationer av *ALK:s* mRNA och dess proteiner en indikation på aggressiv *MYCN* amplifikation, vilket påvisar att det finns en korrelation mellan dem. Höga koncentrationer av *ALK* är således signifikativt med en svag prognos och driver därav tillsammans tumörogenes av NB (Wang *et al*. 2013). Mutationer i *PHOX2B*, identifierat i en subgrupp av ärftlig neuroblastom reglerar neurallistceller till att differentiera till sympatiska nervceller (Pei *et al*. 2013). Studier har visat att *PHOX2B* skulle kunna ha en hämmande effekt på *ALK*, vilket skulle medföra att *PHOX2B* är en föregångsonkogen till *ALK* och kan således ensamt driva tumörogenes i NB (Bachetti *et al*. 2010).

Spontan neuroblastom
Spontan tumörogenes av NB är vanligt förekommande och utifrån vad man känner till har de väldigt få genetiska likheter. Screening av spontana tumörer har visat att den onkogena *MYCN* är vanlig och har en inverkan på tumörogenes samt att den identifierats i de aggressiva stadierna M/MS med metastasbildning (Brodeur 2003). *MYCN* amplifikation förekommer enligt studier (Brodeur 2003, Hansford *et al*. 2004) i ~ 20% av det totala antalet fall av NB och används därför som en biomarkör för svag prognos (Hansford *et al*. 2004). *MYCN* tillhör genfamiljen *Myc* vars transkriptionsprodukter binder till och aktiverar mål-genen. *MYCN* amplifikation, dvs ett ökat utryck av dess mRNA och proteiner leder till en onkogen aktivitet i mål-genen och bidrar till cell-proliferation, inhibering av celldifferentiering, celltillväxt, metastasbildning och genomisk instabilitet (Westermann *et al*. 2008). Detta gör att *MYCN* och andra nedströms lokaliserade genuttryck, är goda kandidatgener för behandling. Problematiken är dock att endast en liten grupp av högrisk NB innehar denna genetiska förändring, vilket stärker misstanken om att det finns andra regulatoriska mekanismer som påverkar tumörogenesen helt oberoende av *MYCN* amplifikation (Bowen & Chung 2009). Mer ovanliga för spontan tumörogenes av neuroblastom, dock förekommande, är som tidigare nämnt *ALK* och *PHOX2B* mutationer som inträffar i ~ 6-10% respektive i ~ 4% av det totala antalet fall av NB (Mossé *et al*. 2008, Pugh *et al*. 2013, Raabe *et al*. 2008). Problematiken är att dessa inte beskriver den hela variationen av de fenotyper som finns av NB. Den kan inte enbart beskrivas med hjälp av genetiska sekvensstudier utan bör således också utgå från epigenetiska studier.

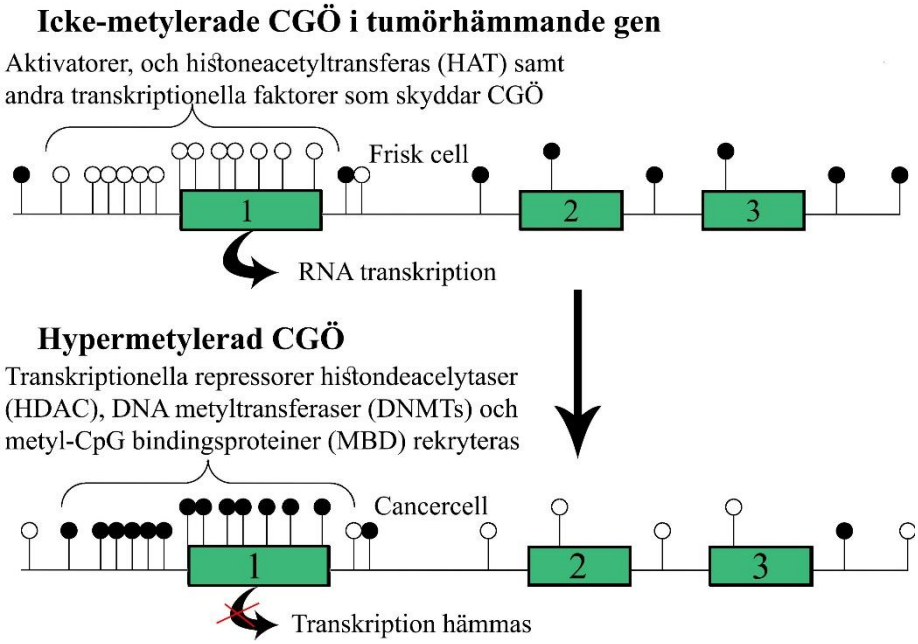
Epigenetiska onkogena drivkrafter bakom neuroblastom

Genetiska studier har inte kunnat identifiera någon enskild genetisk variation som kan härledas som förklaringsmodell till samtliga former av NB. Det väcker därför en frågeställning om att pre-neuroblastomceller har sitt ursprung i epigenetiska förändringar under mognaden av neurallistceller. Epigenetiska studier förklarar förändringar i genuttryck genom att det uppkommer av epigenetiska modifikationer på DNA-sekvensen, histonerna och genom ncRNA-reglering (Non-coding RNA) (Esteller 2008). Det eukaryota genomets genuttryck kontrolleras av framförallt DNA metylering, histonmodifikationer och ncRNA reglering. Stora delar av genomet består av särskild icke-kodande DNA, vilket innefattar introner, repetitiva element och transposomala element. För att motverka mutationer och transkription av oönskat mRNA, metyleras DNA:t kring dessa områden, vilket endast lämnar

initiation av transkription till CGÖ (Lay *et al*. 2015). Histonmodifikationer som metylering och acetylering vid lysin-specifika bindningsplatser reglerar kromatinstrukturer (Jones & Baylin 2007). Dessa faktorer samverkar till att reglera genens aktiveringspotential, dvs i vilken grad den kommer vara transkriptionellt aktiv (Esteller 2008, Jones 2012). Denna modell skulle potentiellt kunna förklara den stora fenotypiska variation som förekommer NB. Av dessa modifikationer kommer denna studie att beröra metylering av DNA och histonermodifikationer samt ncRNA reglering och dess inverkan på NB:s patogenes. Att fokus läggs specifikt på dessa områden är för att studier har visat att DNA epigenetiska mönster och ncRNA reglering kan härledas till ett onormalt genuttryck i andra maligna cancerformer och således också i NB (Dawson & Kouzarides 2012, Michalowski *et al*. 2008, Yáñez *et al*. 2015, Yang *et al*. 2007).

DNA metylering och neuroblastom

DNA metylering har en central roll i reglering av genuttryck och formandet av kärnstrukturer. Processen försiggår genom att en metylgrupp adderas till 5'-kol positionen i cytosin som finns placerat efter en guanin i DNA, kring särskilda CGÖ lokaliserade utanför promotorer, isolatorer och enhancers (Esteller 2008, Herman & Bayling 2003). DNA metylering förekommer på centromererna, telomererna samt för x-kromosominaktivering och inaktivering av transposomala element. Hypermetylering av genspecifika områden leder till att uttryck hämmas och transkription inhiberas (Jones & Baylin 2011). Hypermetylering av CGÖ lokaliserade kring en promotor i tumörhämmande gener är ett vitalt element vid initiering av cancerpatogenes. Fenomenet som transkriptionellt inhiberar genuttryck i tumörhämmande gener kan påverka cellreglerande processer som bland annat regulatoriska element i cellcykeln, DNA-reparation, cell-cell interaktioner och apoptosen (figur 1) (Byun *et al*. 2013, Herman & Baylin 2003).



Figur 1. Representation av en tumörinhiberande gen i en frisk cell respektive cancercell. Grad av metylering påverkas i mycket hög grad vid defekt reglering. Svart knopp: metylerad region, vitknopp: icke metylerad region. Omritad från Esteller (2002).

Den katalytiska mekanismen bakom metylering regleras av enzymer, definierade som DNA-metyltransferaser (DNMT). Tre typer av DNMT har identifierats i samband med metylering

av DNA och har fått benämningen DNMT1, DNMT3A och DNMT3B. DNMT3A respektive DNMT3B reglerar *de novo* metyleringsmönster hos DNA medan DNMT1 underhåller DNA på ett sådant sätt att samma mönster återfinns i nya celler efter replikation (Esteller 2008, Jones & Baylin 2011, Okano *et al*. 1999). Studier har dock indikerat på att samtliga DNMT kan inneha båda funktionerna, underhåll och *de novo,*metylering *in vivo* (McCabe *et al*. 2009). Metylering av CGÖ i promotorerna rekryterar metylerade CpG-bindningsdomänproteiner (MBD), transkriptionshämmande faktorer så som histondeacetylas (HDAC) och ommoduleringsfaktorer för kromatin. Detta genererar en ärftlig förändring i metyleringsmönstret hos cellen och kan därmed förändra interaktioner mellan DNA och kromatinstrukturer. Effekten av förändringen är ett minskat respektive ökat genuttryck (Deaton & Bird 2011, Jones & Takai 2001).

I NB är regleringen av detta slag särskilt allvarligt och ett flertal tumörhämmade gener så som *ASSF1A*, *CASP8*, *HIN-1*, och *DCR2* identifierats som hypermetylerade, vilket orsakar onkogen aktivitet i andra platser i genomet (Yang *et al*. 2010). Knockdown studier av DNMT3B indikerar en åverkan på tiden det tar för neurallistcellerna att mogna och differentiera (Martins-Taylor *et al*. 2012). Funktionen av DNMT3B regleras av metyleringsmönster vid embryogenesen. Förändringar i dessa skulle potentiellt kunna påverka patogenesen hos neuroblastom i form av att neurallistcellerna inte genomgår en korrekt mognadsprocesser och därmed initiera en formbildning av cancerstamceller (Louis & Shohet 2015).

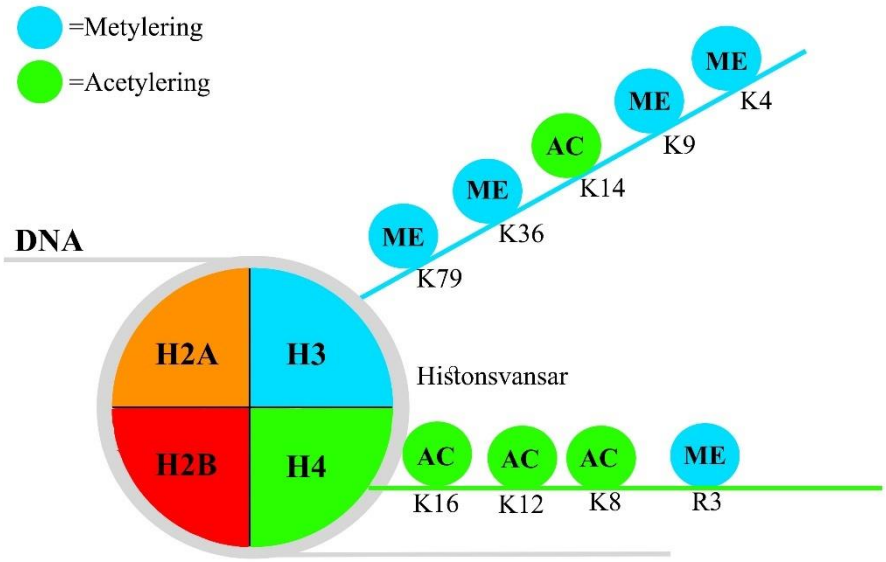
Det är av central betydelse att göra djupgående analyser av hypermetyleringsmönster hos cancerhämmande gener för att konkretisera vilka gener som kan kategoriseras med vilken prognos. Genom att söka efter hypermetyleringsmarkörer har man hittat ett antal centrala modifikationer i stadium M/MS dvs, de grupperna med risk för svag prognos (Grau *et al*. 2010). *HOXA9* har identifierats, vilket är en gen ansvarig för normal utveckling hos foster, vilket vid hypermetylering leder till för tidigt födda barn alternativt missfall. Dessutom har man visat att hypermetylering av *CCND2* inhiberar normal funktion av cellcykel samt *TMS1* som reglerar apoptosen. (Grau *et al*. 2010) Studier har visat att alla dessa markörer är kända som allvarliga modifikationer som sammanfaller med högriskpatienter med potentiell dödlig utgång och är därav starkt förenade med dålig prognos. Med detta som grund är det konstaterat att profilering av hypermetylering som markör för tumörhämmande gener är ett avgörande diagnosverktyg för både behandlingsform men även prognos (Alaminos *et al*. 2004). Vidare har man visat att profilering av hypermetyleringsmönster hos *CASP8* har en stark korrelation till ökad risk för återfall. Analyser av hypermetylering hos apoptosgener har visat att de kan likväl agera som en god biomarkör för prognos och tumörogenes (Grau *et al*. 2010).

Relationen mellan en felaktig genhämmande hypermetylering och cancer är idag mycket vanligt förekommande. Undersökningar har visat att nästan 50% av alla ärftliga cancerformer innehar någon form av genhämmande DNA hypermetylering som även kan härledas till hämmande av genuttryck i spontana former av NB (Jones & Baylin 2002). Detta tyder på att de kända markörerna i ärftlig NB i form av mutationer i *ALK* och *PHOX2B* med andra, sannolikt även finns representerade i spontan NB (Mossé *et al*. 2008, Pugh *et al*. 2013).

Histonermodifikation och ncRNA reglering i neuroblastom

Histoner är molekylära strukturer som reglerar genuttryck. Här lagras epigenetisk information som reglerar post-translationella modifikationer till DNA. Dessa modifikationer inkluderar

bland annat acetylering av lysin, metylering av arginin och lysin samt fosforylering av serin. Denna studie kommer beröra metylerings- och acetyleringsmodifikationer (Jones & Baylin 2011, Wu *et al*. 2007). Modifikationer i histonerna påverkar DNA:s interaktion med kromatin, vilket i förlängningen påverkar transkriptionsgrad (Djos *et al*. 2012). Effekten av histonmodifikationer varierar beroende på vilket histonsvans och var på denna som förändringen sker samt om det är lysin (K) eller arginin (R) som beröras. Metylering av histon 3 (H3) vid K4 (H3K4me) är vanligen associerat med en mer öppen kromatinstruktur och aktivering av transkription (Jones & Baylin 2011, Esteller 2008, Wu *et al*. 2007). Metylering av K9/K27 vid H3 är i hög grad associerat med transkriptionell inhibering medan acetylering av (K) förknippas med aktivering av transkription (Figur 2) (Bernstein *et al*. 2007, Deaton & Bird 2011).



Figur 2. Histoner består av H3:H4 tetramerkomplex och H2A:H2B dimerer, Histonsvansarna på alla fyra av dessa histonkärnor kan genomgå epigenetisk modifikation (post-translationell). Dessa innefattar metylering, acetylering, fosforylering och ubiquitinylering (I bild visas endast metylering och acetylering). Omritad från Bo *et al*. (2015).

Acetylering är förknippat med en mer öppen kromatinstruktur vilket gör DNA:t mer tillgänglig för transkription. Acetylreglering sker genom de två konkurrerande katalytiska enzymer, histon-lysinacetyltransferas (KAT) och HDAC. Dessa är starkt förknippade med DNA metylering eftersom metylering rekryterar HDAC som deacetylerar histonerna och förändrar interaktionerna mellan kromatin och DNA, vilket resulterar i ett stängt kromatinkomplex (Bo *et al*. 2015, Deaton & Bird 2011). I likhet med acetylering har addering av metylgrupper till histoner samma funktionallitet. Metylering vid H3K4, H3K36, och H3K79 är associerade med öppen kromatinstruktur, medan vid H3K9, H3K27 och H4K20 visar en mer stängd. Skillnaden är dock att lysin kan mono-, di alternativt trimetyleras. Metyl grupper är dessutom antingen symmetriskt eller asymmetriskt bundet till arginin. (Barski *et al*. 2007). De olika metyleringstillstånden kan härledas till olika platser i genomet.H3K4 me3/2 (tri-/di-) metylering är vanligen förekommande kring transkriptions start siter (TSS), medan H3K9me3 är associerade med inhibering av genuttryck (Barski *et al*. 2007). Förändringar i dessa processer kan leda till alternativa onkogena uttryck. Studier har visat att *EZH2*, som är regulator till ett komplex som driver metylering vid H3K27 kan både ha en onkogen effekt vid bröst- och prostatacancer och agerar som tumörhämmande beroende på dess epigenetiska modifikationer. Förändringar i *EZH2* kan gynna konvertering av

H3K27me1 till H3K27me2/3, vilket skapar interaktioner mellan DNA och kromatin att blir mer slutet och därmed inhiberas genuttrycket (Morin *et al*. 2010).

Kromatinimmunoprecipitation studier (ChIPseq) och RNA-sekvensering har visat att det man genom kartläggning av epigenetiska mönster kan särskilja fenotyper av NB från varandra. (Burney *et al*. 2013) Studier har visat mönster i sin uppsättning av histonmodifikationer som gör att man kan urskilja vilka enhancers som är inblandade i mognadsprocessen av neurallistceller (Rada-Iglesias *et al*. 2012). Vidare har man identifierat epigenetiska förändringar i komplex (SWI/SNF) ansvariga för re-modulering av kromatin, dessa har det visat sig också påverkar i vilken grad neurallistcellerna mognar, vilket skulle kunna tyda på att även denna cellulära process har påverkan på patogenes av NB (Eroglu *et al*. 2006).

ncRNA innehar viktiga regulatoriska funktioner för utveckling av neurallistceller och dess möjlighet att differentiera. Av ncRNA (mikroRNA, lncRNA och piRNA) har studier visat att microRNA är kraftigt avreglerat vid aggressiva former av NB. I motsats till att inhibera tumörogenes agerar avreglerade mikroRNa som hämmande av p53 aktivitet och stimulerar metastasis av NB (Stallings 2009).

Profilering av metylering av DNA i neuroblastomfall – goda biomarkörer?

Studier har visat att man genom metyleringsprofilering av gener kan skapa analytiska plattformar för individuell cellulär klinisk diagnostik. I en studie av Yáñez *et al* (2015), visade det sig att man har kunnat identifera hela 70 kandidatgener som hade någon form av epigenetisk modifikation i högriskgrupper med negativ prognos. Av dessa gener validerades 16 där metyleringsprofilen skillde sig mellan friska gener och neuroblastomtumörer. Denna skillnad kunde senare appliceras på patientkohorter där man aktivt kunde skilja på patienter som hade blivit diagnostiserade innan 18 månader kontra efter 18 månader. Dessutom visar studien att profileringen av dessa gener kunde skilja på patienter som hade *MYCN* amplifikation och de som saknade mutationen samt om någon form av metastasbildning påbörjats. Vidare kunde man visa om tumören är lokalt placerad eller spridit sig. Av dessa 16 var det endast två gener (*RB1* och *TDGF1*) som hade en hög epigenetisk profilering med högre risk för återfall. Slusatsen av denna studie är att dessa epigenetiska markörer kan användas för att avgöra NB aggressivitet, återfallsrisk och prognos då de är förekommande i stadie M/MS (Yáñez *et al*. 2015). En studie av Yang *et al.* (2007) visar att hypermetylering av *DCR2*, *CASP8* och *HIN-1* har starka relationer till NB-fall med klart sämre prognos, vilket tyder på att om att någon av dessa gener är inhiberade pga metylering finns hög risk för aggressiv tumörbildning. Det står klart att hypermetylering av dessa gener oberoende av varandra kan leda till sämre prognos och en sjunkande överlevnadsgrad (Yang *et al*. 2007). En nyare och mer omfattande studie om metyleringsprofilering har visat ny data som indikerar att *TERT* uttryck är högre i NB celler än i friska. *TERT* reglerar telomerernas längd och är en viktig faktor i cellulärt åldrande. Vidare har *TERT* visat sig ha ett starkt samband med patienter med aggressiv hjärntumör och således svag prognos. *PIRT* visar också mycket hög grad av metylering. Detta är intressant då dess funktion är att reglera *TRPV1* som i sin tur justerar differentieringen av neurallistceller (Olsson *et al*. 2016).

Resonemanget att hypermetylering och profilering är signifikativt som biomarkör för prognos av NB görs ytterligare klart av Michalowski *et al.* (2008), där det framgår att av undersökta prover var hypermetylering bekräftad för *RASSF1A* i 93% av fallen och i 100% av de fall där återfall inträffat. En liknande undersökning har visat att hypermetylering även förekommer i 25% av studiens fall i promotorregioner i gen *GTL2* hos möss, som är en gen som om inte

kodar för ett funktionellt mRNA och har en mänsklig homolog form i *MEG3*. Denna biomarkör skulle kunna användas vid diagnostisering eftersom uttrycksnivåerna av *GTL2* avtar med hypermetylerade promotorregioner, samtidigt som den kan användas för tumörogenes för att klassificera NB tumörer (Astuti *et al*. 2005). Slusatsen av dessa studier är att det vore rimligt att koncentrera forskningen på gener som reglerar hypermetylering för att undersöka möjligheter att använda dess kommunikationsvägar som grund för att identifera en gemensam föregångare till neurallistceller innan de genomgår malign transformation, vilket skulle kunna ge grund för en ny potentiell behandlingsplattform (Michalowski *et al*. 2008).

Behandling av neuroblastom

Standardiserad behandlingsform för NB patienter innebär behandling med cytostatika i 5 cykler (beroende på ålder), följande benmärgsodling, operation av tumör och strålning. Därefter följer en intensiv cytostatikabehandling, för att man slutligen ska genomgå benmärgstransplantation samt behandling med a-vitaminsyra. Denna behandlingsform är ytterst påfrestande och är dessutom inte alltid framgångsrik (Matthay *et al*. 1999). Michalowski *et al.* (2008), Yang *et al.* (2007) Astuti *et al.* (2005) och Yáñez *et al.* (2015) och många med dem påvisar den centrala rollen av att hitta alternativ läkemedelsterapi för att både individualiserad behandling men också att de nya metoderna ska sätta mindre stress på patienten. Detta skulle leda till en kortare behandling med snabbare återhämtning och en klart minskad risk för återfall.

Nästa steg i forskningen om neuroblastom dess behandling

Behandling av hypermetylerade regioner i NB är fortfarande i många fall i dess pre-kliniska stadium men det finns idag forskning som visar god eller delvis god framgång. Decitabin är ett av de läkemedel som visar lovande resultat för behandling av DNA-metyleringprocesser. Decitabin inhiberar DNA metyltransferas och kan således användas för att reglera DNA metylering och i förlängningen återaktivera tumörhämmande gener (Decock *et al*. 2011, Krishnadas *et al*. 2015). Hypotesen är att decitabin tillsammans med preparat som stimulerar celldifferentiering leder till ökat genuttryck av hämmade gener bekräftas ytterligare i studier av Asada *et al.* (2013). Resultatet visade att behandling med myteltransferasinhibitor leder till ökad känslighet för celldifferentiering och därav en möjlighet för celldöd gör att myteltransferasinhibitor anses vara ett möjligt preparat för behandling av stadie M/MS. (Asada *et al*. 2013)

Ytterligare terapier undersöks och inverkar på den avacyleteringsprocess som sker vid metylering av histoner. Cellbehandling av histon deacetylasinhibitor (HDACI) ger effekten att metyl-grupper inte kan rekryteras till histonerna och i förlängningen inte integrerar med kromatinstrukturer som orsakar en konformationsändring från en öppen kromatinstruktur till en stängd. Istället bibehåller kromatinet sin öppna struktur och hypermetylering regleras. Introduktion av HDACI har indikerat på en celldifferentiering och apoptos av cancerceller i möss. Behandlingen har demonstrerat en statistisk signifikativ reduktion av antalet cancerceller i NB, vidare har konstaterats att man även inhiberat celltillväxt av transformerade celler i tumörer (Coffey *et al*. 2001). Här finns dock en problematik att höga nivåer av HDACI som påverkar andra kommunikationsvägar hos celler. Detta gör att andra cellulära processer kan rubbas eller helt störas ut. Därav är framtagning av alternativa inhiberingsprocesser för HDAC centralt för fortsatt forskning. En studie av Glick *et al.* (1999) visade att man med behandling av M-karboxsinnamiksyra bihydroamid (CBHA) kan inducera apoptos i NB tumörceller och på så sätt reglera cellens förmåga att initiera celldöd.

Kommunikationsvägen kan dessutom störas ut av cyklohexamid vilket gör att man aktivt kan styra inom vilka nivåer CBHA skall agera. Resultatet blir att celldöd initieras i tumörceller men för att motverka att CBHA stör ut andra cellulärprocesser kan man reglera effekten med cyklohexamid (Glick *et al*. 1999).

Diskussion

Flertalet av de studier som har berörts beskriver ett komplext förhållande mellan NB och DNA metylering (Brodeur *et al*. 1993, Esteller 2008, Holliday 1987, Yang *et al*. 2010). Konsensus är dock att snabb identifiering och klassificering har en avgörande betydelse för en patients prognos. (Ikeda *et al*. 2002). Metylprofilering av kandidatgener har visat nya potentiella vägar för behandling (Olsson *et al*. 2016). Undersökningar av bland annat Yang *et al.* (2010) visar att det epigenetisk hypermetylering av kända tumörhämmande gener innehar högre metyleringsprofil i dess promotorer jämfört med cancerfria celler. Detta medför att man skulle kunna använda sig av detta som en biomarkör för NB vid diagnostik (Yang *et al*. 2010).

Hypermetylering som biomarkör i neuroblastom

Genom att analysera tumörhämmande gener har man kommit fram till att metyleringsprofiler varierar mellan cancerfria celler och celler med NB (Yang *et al*. 2010). Denna variation kan således appliceras för att kartlägga samband mellan grad av hypermetylering av DNA och fenotyper associerade med aggressiva former av NB. Detta blir tydligt i bland annat en studie av Grau *et al.* (2010), där analyser av gener som är för centrala cellulära processer, har visat att det finns ett samband mellan hypermetylerade gener i högriskgrupper och låg grad av metylering i lågrisk grupper för bland annat *TMS1*, *CASP8* och *THBS1*. Variationen kan således användas för att identifiera patienter med sämre förutsättningar och således inleda en mer aggressiv behandling. Dessutom kan man med hjälp av detta avgöra vilka gener som är de styrande faktorerna i tumörogenes. Man har således visat att hypermetylering av *TMS1* är en god markör för NB i stadie M med mindre positiv prognos (Grau *et al*. 2010). Vidare klargörs detta tydligare i ytterligare undersökningar (Yang *et al*. 2010) varvid man hittat samband mellan kraftigt reglerande genuttryck i *HIN-1* och metyleringsgrad, vilket har föranlett till att man identifierat promotorregionen som inhiberade och därmed saknar transkription. Histonanalyser av dessa regioner har visat histonmarkörer (H3K9Me3, H3K27Me3 och H3K4Me3) som vanligen sammankopplas med en mer reglerad kromatinstruktur. Medan man i cancerfria celler påträffat histonmodifikationer som vanligen identiferas med en mer öppen kromatinstruktur och således högre transkriptionsgrad. Detta betyder att gener kan direkt vara reglerade av histonmodifikationer och bör således också anses vara ett potentiellt utgångsläge för behandling (Djos *et al*. 2012, Yang *et al*. 2010). Det är således möjligt att med hjälp av DNA metylering och/eller histonmodifikationer att indentifera biomarkörer som man kan använda för att hitta samband mellan olika fenotyper och såldes i förlängningen snabbare förmå att diagnostisera och behandla NB (Grau *et al*. 2010). Det finns dock en stor osäkerhet i denna metod som kuliminerar i det faktum att man inte kan utesluta att de biomarkörer som berörts och identifierats skulle kunna vara ett resultat av NB snarare än dess orsak. Ytterligare studier skulle kunna påvisa att man uterslutande kan konstatera att en specifik kombination av DNA metylering/histonmodifikationer är i relation till en eller flera av de olika stadierna av NB.

Behandling och framtida forskning – Orsak och verkan
Med utgångspunkt i det faktum att man kan konstatera att det finns ett samband mellan histonmodifikationer, DNA-metylering och ncRNA reglering, bör således detta öppna nya vägar för vidare studier om potentiella behandlingsplattformar (Michalowski *et al*. 2008) (Yáñez *et al*. 2015). Genom att man har lyckats identifiera några ncRNA, gener och histonprofiler som biomarkörer och att de inverkar på prognos och klassificering av fenotyp, har detta bidragit till att man tagit fram alternativa behandlingsformer. Behandling (Decock *et al*. 2011) av hypermetylerade DNA regioner i NB celler sker som ett resultat av att cancercellerna inhiberas att initiera apoptos. Utan reglering av celltermination kommer tumörutvecklande celler att stimulera proliferation. Reglering av denna signalkaskad är därför en mycket intressant aspekt i behandlingen av NB (Asada *et al*. 2013). Behandling med metyltransferasinhibitor är inte utan problem. Problematiken är att DNA metyltransferas även inhiberar cancerframkallande gener från att ge uttryck. Det är därför vitalt att man kombinerar dessa inhiberande faktorer med andra reglerande element (Coffey *et al*. 2001). Den stora utmaningen är patienter som får återfall. Återfall innebär oftast stora metastasbildning, att cellerna som genom det selektiva trycket från cytostatika och strålning muterat samt är resistenta. Detta medför att nya tumörer sannolikt har en helt annan biologi än de som ursprungligen diagnostiserats. Framtida forskning borde alltså fokusera på att hitta alternativa behandlingsformer som minskar det selektiva trycket för att minimera risken för återfall. Detta har resulterat i pre-kliniska försök att med utgångspunkt genetiska/epigenetiska modifikationer/profilering utveckla molekylära mål för behandling (Louis & Shohet 2015).

Sammanfattningsvis kan det konstateras att denna studie har visat övergripande exempel på forskning som visar att det finns ett starkt samband mellan grad av hypermetylering av tumörhämmande gener och de olika stadierna hos NB. Studien har visat att det finns en god korrelation mellan metylprofilering hos DNA/histoner och en patients prognos för stadie M/MS av NB. Dessutom har konstaterats att med utgångspunkt i de epigenetiska faktorer som berörs i denna studie, har man kommit närmare potentiella epigenetiska modeller som kan vara molekylärt modifierbart och därmed en alternativ ingång till mer lyckad behandling.

Tack

Tack till Alexander Sokyazian för god återkoppling men även till Lage Cerenius för mycket bra handledning och slutligen till Camilla Strandberg för sitt stöd och engagemang i min skrivprocess.

Litteratrförteckning

Alaminos M, Davalos V, Cheung N-KV, Gerald WL, Esteller M. 2004. Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. Journal of the National Cancer Institute **96**: 1208-1219.

Asada K, Abe M, Ushijima T. 2013. Clinical application of the CpG island methylator phenotype to prognostic diagnosis in neuroblastomas. Journal of Human Genetics **58**: 428–433.

Astuti D, Latif F, Wagner K, Gentle D, Cooper WN, Catchpoole D, Grundy R, Ferguson-Smith AC, Maher ER. 2005. Epigenetic alteration at the *DLK1-GTL2* imprinted domain in human neoplasia: analysis of neuroblastoma, phaeochromocytoma and Wilms' tumour. British Journal of Cancer **92**: 1574 – 1580.

Bachetti T *et al*. 2010. *PHOX2B*-Mediated regulation of *ALK* expression: *in vitro* identification of a functional relationship between two genes involved in neuroblastoma. PLoS One, doi 10.1371/journal.pone.0013108.

Baggiolini A, Varum S, Mateos JM, Bettosini D, John N, Ziegler U, Dimou L, Clevers H, Furrer R, Sommer L. 2015. Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent *in vivo*. Cell Stem Cell **16**: 314–322.

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell **129**: 823–837.

Bayling SB, Jones PA. 2011. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. Nature Reviews Cancer **11**: 726-734.

Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. 2007. The mammalian epigenome. Cell **128**: 669–681.

Betters E, Kjaeldgaard A, Sundström E, García-Castro MI. 2010. Analysis of early human neural crest development. Developmental Biology **344**: 578–592.

Bilke S, Chen QR, Westerman F, Schwab M, Catchpoole D, Khan J. 2005. Inferring a tumor progression model for neuroblastoma from genomic data. Journal of Clinical Oncology **23**: 7322-7331.

Bo N, Wenyuan L, Wei Z, Rongfu W. 2015. Targeting epigenetic regulations in cancer. Acta Biochimica et Biophysica Sinica **48**: 97-109.

Bowen KA, Chung DH. 2009. Recent advances in neuroblastoma. Current Opinion in Pediatrics **21**: 350–356.

Brodeur GM. 2003. Neuroblastoma: biological insight into a clinical enigma. Cancer **3**: 203-216.

Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. 1984. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. Science **224**:1121-1124.

Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F. 1993. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. Journal of Clinical Oncology 11: 1466–1477.

Burney MJ, Johnston C, Wong KY, Teng SW, Beglopoulos V, Stanton LW, Williams BP, Bithell A, Buckley NJ. 2013. An epigenetic signature of developmental potential in neural stem cells and early neurons. Stem Cells **31**: 1868-1880.

Byun H-M, Eshaghian S, Douer D, Trent J, Garcia-Manero G, Bhatia R, Siegmund K, Yang AS. 2013. DNA methylation pro ling of chronic myelogenous leukemia in relationship to genomic translocation. Epigenetics in Cancer **10**: 1-9.

Charlet J, Schnekenburger M, Brown KW, Diederich M. 2012. DNA demethylation increases sensitivity of neuroblastoma cells to chemotherapeutic drugs. Biochemical Pharmacology **83**: 858-865.

Cheung N-KV, Dyer MA. 2013. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. Cancer **13**: 397-411.

Coffey DC, Kutko MC, Glick RD, Butler LM, Heller G, Rifkind RA, Marks PA, Rochon VM, La Quaglia MP. 2001. The histone deacetylase inhibitor, CBHA, inhibits growth of human neuroblastoma xenografts *in vivo*, alone and synergistically with all-trans retinoic acid. Cancer Research **61**: 3591–3594.

Cohn SL *et al*. 2009. The international neuroblastoma risk group (INRG) classification system: an INRG task force report. Journal of Clinical Oncology **10**: 289-297.

Dawson MA, Kouzarides T. 2012. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. Cell **150**: 12-27.

De Preter K *et al*. 2010. Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent data sets using a multigene signature. Clinical Cancer Research doi 10.1158/1078-0432.CCR-09-2607.

Deaton AM, Bird A. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. Genes & Development **25**: 1010-1022.

Decock A, Ongenaert M, Vandesompele J, Speleman F. 2011. Neuroblastoma epigenetics from candidate gene approaches to genome-wide screenings. Epigenetics **6**: 962-70

Djos A, Martinsson T, Kogner P, Carén H. 2012. The *RASSF* gene family members *RASSF5*, *RASSF6* and *RASSF7* show frequent DNA methylation in neuroblastoma. Molecular Cancer doi 10.1186/1476-4598-11-40.

Eroglu B, Wang G, Tu N, Mivechi NF. 2006. Critical role of Brg1 member of the SWI/SNF chromatin remodeling complex during neurogenesis and neural crest induction in zebrafish. Dev Dyn **235**: 71-82.

Esteller M. 2002. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter futur. Oncogene **21**: 5427–5440.

Esteller M. 2008. Epigenetics in Cancer. The new england journal of medicine **358**: 1148-1159.

Forbes SS *et al*. 2011. COSMIC: mining complete cancer genomes in the catalogue of somatic mutations in cancer. Nucleic Acids Research **39**: D945–D950.

Glick RD, Swendeman SL, Coffey DC, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM, La Quaglia. 1999. Hybrid polar histone deacetylase inhibitor induces apoptosis and CD95/CD95 ligand expression in human neuroblastoma. Cancer Research **59**: 4392– 4399.

Grau E, Martinez F, Orellana C, Canete A, Yañez Y, Noguera R, Hernandez M, Bermúdez JD, Castel V. 2010. Hypermethylation of apoptotic genes as independent prognostic factor in neuroblastoma disease. Molecular Carcinogenesis **50**: 153–162.

Hansford LM *et al*. 2004. Mechanisms of embryonal tumor initiation: Distinct roles for MycN expression and MYCN amplification. Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 12664–12669.

Herman JG, Baylin SB. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. New England Journal of Medicine **349**: 2042-2054.

Holliday R. 1987. The Inheritance of Epigenetic Defects. Science **238**: 163-170.

Ikeda H *et al*. 2002. Experience with international neuroblastoma staging system and pathology classification. British Journal of Cancer **86**: 1110–1116.

Jones PA. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. Nature Reviews Genetics **13**: 484-492.

Jones PA, Baylin SB. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Genetics **3**: 415-428.

Jones PA, Baylin SB. 2007. The Epigenomics of cancer. Cell **128**: 597-610.

Jones PA, Baylin SB. 2011. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. Nature Reviews Cancer **11**: 726-734.

Jones PA, Takai D. 2001. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. Science **293**: 1068-1070.

Krishnadas DK, Shusterman S, Bai F, Diller L, Sullivan JE, Cheerva AC, George RE, Lucas KG. 2015. A phase I trial combining decitabine/dendritic cell vaccine targeting *MAGE-A1*, *MAGE-A3* and *NY-ESO-1* for children with relapsed or therapy-refractory neuroblastoma and sarcoma. Cancer Immunol Immunother **64**: 1251–1260.

Lay FD, Liu Y, Kelly TK, Witt H, Farnham PJ, Jones PA, Berman BP. 2015. The role of DNA methylation in directing the functional organization of the cancer epigenome. Genome research **25**: 467–477.

London WB *et al*. 2005. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the children's oncology group. Journal of Clinical Oncology **23**: 6459-6465.

Louis CU, Shohet JM. 2015. Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy. annual review of medicine **66**: 49-63.

Maris JM *et al*. 2002. Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12–13. Cancer Research **62**: 6651– 6658.

Martins-Taylor K, Schroeder DI, LaSalle JM, Lalande M, Xu RH. 2012. Role of DNMT3B in the regulation of early neural and neural crest specifiers. Epigenetics **7**: 71-82.

Matthay KK *et al*. 1999. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous none marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. The New England Journal of Medicine **341**: 1165-1173.

McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. 2009. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. Clinical Cancer Research **12**: 3927–3937.

Michalowski MB, de Fraipont F, Plantaz D, Michelland S, Combaret V, Favrot MC. 2008. Methylation of Tumor-Suppressor Genes in Neuroblastoma:The *RASSF1A* gene is almost always methylated in primary tumors. Pediatr Blood Cancer **50**: 29–32.

Morin DR *et al*. 2011. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. Nature **476**: 298-303.

Morin RD *et al*. 2010. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. Nature Genetics **42**: 181–185.

Mossé YP *et al*. 2008. Identification of *ALK* as a major familial neuroblastoma predisposition gene. Nature **455**: 930-935.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. 1999. DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. Cell **99**: 247–257.

Olsson M, Becks S, Kogner P, Martinsson T, Carén H. 2016. Genome-wide metylation profiling identifies novel metylated genes in neuroblastoma tumors. Epigenetics **11**: 74-84.

Pei D, Luther W, Wang W, Paw BH, Stewart RA, George RE. 2013. Distinct Neuroblastoma-associated alterations of *PHOX2B* impair sympathetic neuronal differentiation in zebrafish models. PLOS Genetics doi 10.1371/journal.pgen.1003533.

Pugh TJ *et al*. 2013. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. Nature Genetics **45**: 279–284.

Raabe EH, Laudenslager M, Winter C, Wasserman N, Cole K, La Quaglia M, Maris DJ, Mosse YP, Maris JM. 2008. Prevalence and functional consequence of *PHOX2B* mutations in neuroblastoma. Oncogene **27**: 469–476.

Rada-Iglesias A, Bajpai R, Prescott S, Brugmann SA, Swigut T, Wysocka J. 2012. Epigenomic annotation of enhancers predicts transcriptional regulators of human neural crest. Cell Stem Cell **11**: 633-648.

Reiff T, Huber L, Kramer M, Delattre O, Janoueix-Lerosey I, Rohrer H. 2011. Midkine and Alk signaling in sympathetic neuron proliferation and neuroblastoma predisposition. Development **138**: 4699-4708.

Rogers CD, Saxena A, Bronner ME. 2013. Sip1 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during cranial neural crest EMT. The Journal of Cell Biology **203**: 835-84.

Shimada H, Umehara S, Monobe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK. 2001. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors. Cancer **92**: 2451-2461.

Socialstyrelsen, 2015. Cancerincidens i Sverige 2014 Nya diagnosticerade cancerfall år 2014, Stockholm: Sveriges Officiella Statistik.

Stallings RL. 2009. MicroRNA involvement in the pathogenesis of neuroblastoma: potential for microRNA mediated therapeutics. Current Pharmaceutical Design **15**: 456-462.

Teshiba R *et al*. 2014. Age-dependent prognostic effect by Mitosis-Karyorrhexis Index in neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. Pediatr Dev Pathol **6**: 441-449.

Tonini G *et al*. 1997. *MYCN* oncogene amplification in neuroblastoma is associated with worse prognosis, except in stage 4s: the Italian experience with 295 children. Journal of Clinical Oncology **15**: 85-93.

Wang M, Zhou C, Sun Q, Cai R, Li Y, Wang D, Gong L. 2013. *ALK* amplification and protein expression predict inferior prognosis in neuroblastomas. Experimental and molecular pathology **95**: 124-130.

Westermann F *et al*. 2008. Distinct transcriptional *MYCN*/c-MYC activities are associated with spontaneous regression or malignant progression in neuroblastomas. Genome Biology doi 10.1186/gb-2008-9-10-r150.

Wu J, Wang SH, Potter D, Liu JC, Smith LT, Wu Y-Z, Huang T, Plass C. 2007. Diverse histone modifications on histone 3 lysine 9 and their relation to DNA methylation in specifying gene silencing. BMC Genomics doi 10.1186/1471-2164-8-131.

Yáñez Y *et al*. 2015. Two independent epigenetic biomarkers predict survival in neuroblastoma. Clinical Epigenetics doi 10.1186/s13148-015-0054-8

Yang Q, Kiernan CM, Tian Y, Salwen HR, Chlenski A, Brumback BA, London WB, Cohn SL. 2007. Methylation of *CASP8*, *DCR2*, and *HIN-1* in neuroblastoma is associated with poor outcome. Clinical Cancer Research **13**: 3191-3197.

Yang Q, Tian Y, Ostler KR, Chlenski A, Guerrero LJ, Salwen HR, Godley LA, Cohn SL. 2010. Epigenetic alterations differ in phenotypically distinct human neuroblastoma cell lines. BMC Cancer doi 10.1186/1471-2407-10-286.

Neuroblastom och användning av hypermetylering som biomarkör för identifiering av tumörhämmande gener: Etisk bilaga

Patrick Nylund
Självständigt arbete biologi 2016

Epigenetik och dess etiska problematik

Epigenetiska studier har blivit alltmer populära och de nya resultaten är mycket fascinerande. Man har konstaterat att epigenetiska förändringar sker snabbare än mutationer i DNA sekvenser. Det har visat sig att dessa förändringar är känsliga och kan påverkas av miljöförändringar, kost men framförallt har konstaterats att epigenetisk metylering kan vara ärftlig (Rothstein *et al*. 2009a).

Epigenetik och miljö

En ärftlig metyleringsgrad som kan påverka framtida generationer är en central etisk fråga eftersom epigenetiska förändringar kan induceras genom kontakt med miljögifter så som föroreningar, giftiga kemikalier eller bekämpningsmedel. Det är således en utmaning då man ur ett globalt perspektiv kan konstatera att i områden där miljögifter ofta finns i större omfattning är i regioner där redan man redan är förhållandevis mer utsatt i form av bred fattigdom och begränsad åtkomst till sjukvård. Därav anser jag att det är en samhällmoralisk fråga att se till att minimera risken för exponering. Detta är således en fråga om rättvisa, därav är den viktigt att forskningen tar sitt ansvar i form av att bedöma vilka de stora riskgrupperna är och hur man kan begränsa dess utsatthet. Det krävs vid riskbedömning av placering av miljögifter att man analyserar påverkar individuella biologiska faktorer snarare än den geografiska profilen. Dessutom krävs mer ingående analyser av potentiella epigenetiska problem med både dagens använda miljögifter och kemikalier men också vid utfärdandet av nya utsläppstillstånd i Sverige. I och med att epigenetiska förändringar så som metylering, kan leda till påverkan på framtida generationer är det av central betydelse för framtida analyser (Rothstein *et al*. 2009a,b).

Epigenetik och integritet

En annan aspekt av epigenetiska studier är att den skapar en stor mängd data om en individs sannolikhet för att utveckla ett allvarligt tillstånd. Detta öppnar upp för en debatt om integritet och vilken information som skall kunna göras tillgänglig för myndigheter eller privata aktörer. Om man har genomgått en epigenetisk undersökning som visar att man kan vara mer mottaglig för en allvarlig sjukdom kan detta leda till att man inte vill dela den information med arbetsgivare eller försäkringsbolag, vilket skulle kunna leda till stora konsekvenser längre fram i form av felaktig eller ingen ersättning från försäkringsbolag. Det skapar debatt om man är skyldig att informera tex familjemedlemmar som finns i riskgruppen för att själva utveckla tillståendet eller ej (Rothstein, et al., 2009a,b). Dessa potentiella problem skulle kunna avvärjas med tex offentliga högriskförsäkringsbolag som tar hand om särskilt utsatta patienter. Därtill skulle det krävas en förmyndarverksamhet som reglerar tillsynen av hur denna information får användas.

Framtidsfrågor
Med nya epigenetiska forskningsresultat kommer också mer information som behöver behandlas av samhällets alla organ. Det som jag upplever kommer finnas i en framtida debatt om epigenetik är om man ska potentiellt tillåta individer som man vet har epigenetiska defekter att inseminera sig alternativt genomgå konstgjord befruktning.

Forskningsetik:
Jag har i min studie begränsat mig till etablerade vetenskapliga artiklar och statliga rapporter. Valet av artiklar har jag baserats på tidigare forskning, om tidskriften har gott anseende, hög grad av citeringar samt om de använt sig av relevanta referenser.

Jag har i min studie försökt använda mig av en sån bred bild som möjligt för att kunna konkretisera den breda mängd av information som finns tillgängligt. Detta har gjort att det finns stora delar med etablerad forskning men också en del information som är nytänkande och central för framtida forskning.

Litteraturförteckning

Rothstein MA, Cai Y, Marchant GE. 2009a. Ethical implications of epigenetics research. Nature Reviews Genetics doi 10.1038/nrg2562

Rothstein MA, Cai Y, Marchant GE. 2009b. The ghost in our genes: legal and ethical implications of epigenetics. Health matrix **19:** 1-62.