



**Työterveyslaitos** | Arbetshälsoinstitutet  
Finnish Institute of Occupational Health

# Epigeneettiset muutokset kuituallistumiseen liittyvän keuhkosyövän syöpä-mekanismina

TUTKIMUSRAPORTTI

Kirsti Husgafvel-Pursiainen  
Eeva Kettunen

Tietoa työstä



Työterveyslaitos

# Epigeneettiset muutokset kuitualtistumiseen liittyvän keuhkosyövän syöpämekanismina

TUTKIMUSRAPORTTI

Kirsti Husgafvel-Pursiainen, Eeva Kettunen

Työterveyslaitos

Helsinki 2015

Työterveyslaitos

Systeemitoksikologia

Topeliuksenkatu 41 a A

00250 Helsinki

[www.ttl.fi](http://www.ttl.fi)

Kansi: Mainostoimisto Albert Hall Finland Oy Ltd

© 2015 Työterveyslaitos ja kirjoittajat

Julkaisu on toteutettu Työsuojelurahaston tuella (hanke nro 111100).

Tämän teoksen osittainenkin kopiointi on tekijänoikeuslain (404/61, siihen myöhemmin tehtyine muutoksineen) mukaisesti kielletty ilman asianmukaista lupaa.

ISBN 978-952-261-570-1 (nid.)

ISBN 978-952-261-571-8 (PDF)

Juvenes Print, Tampere, 2015

## ESIPUHE JA KIITOKSET

Tässä raportoitu tutkimus on tehty pääosin Työterveyslaitoksella Helsingissä, ja se on toteutettu Työsuojelurahaston taloudellisella tuella (hankenumero 111100). Tutkimuksen on suorittanut Työterveyslaitoksen tutkimusryhmä yhteistyössä Lyonissa Ranskassa sijaitsevan WHO:n alaisen Kansainvälisen syöväntutkimuskeskuksen IARC:n tutkimusryhmän kanssa.

Tutkimuksen suorittaneeseen työryhmään ovat kuuluneet Työterveyslaitoksen Systemitoksikologian tiimistä FT Eeva Kettunen, Dos. Henrik Wolff ja tutkimusprof. Kirsti Husgafvel-Pursiainen, joka on tutkimuksen vastuullinen johtaja, sekä lisäksi Dos. Sisko Anttila (HUSLAB ja Työterveyslaitos). Ryhmään on myös kuulunut Dos. Kaisa Salmenkivi HUSLAB:ista. Systemitoksikologian tiimistä laboratorioanalyseja ovat tehneet bioanalytikko Sauli Savukoski sekä erikoislaboratoriomestarit Tuula Suijala ja Päivi Tuominen.

IARC:stä tutkimusryhmään ovat kuuluneet Dr Hector Hernandez-Vargas ja Dr Zdenko Herceg Section of Mechanisms of Carcinogenesis -yksikön Epigenetics Group -ryhmästä (yksikön ja ryhmän johtajana Dr Herceg). Lisäksi IARC:ssä tehtyihin laboratorioanalyysiin ovat osallistuneet samasta yksiköstä oleva Ms Marie-Pierre Cros sekä IARC:n Section of Genetics -yksikön Genetic Cancer Susceptibility Group -ryhmästä Mr Geoffroy Durand ja Dr Florence Le Calvez-Kelm.

Tutkimus on kohdistunut asbestikuitualtistumiseen liittyvään keuhkosityöpään ja erityisesti on tutkittu asbestikeuhkosityövässä esiintyviä DNA-metylaation muutoksia yhtenä merkittävänä syövän kehittymiseen liittyvänä molekyyli-tason muutoksena. Tutkimuksessa käytettiin IARC:n kanssa tehtävän yhteistyön kautta saatavilla ollutta uutta perimänlaajuista teknologiaa, jolla voidaan saada edustava kokonaiskuva metylaatiomuutoksista koko genomissa (ns. DNA-metylomi). Perimänlaajuisen lähestymisen lisäksi tärkeä vahvuus tutkimuksessa oli se, että siinä työperäisen asbestialtistumisen varmentamisessa voitiin käyttää keuhkokudosnäytteestä tehtyjä elektronimikroskooppisia asbestikuitumäärytyksiä. Kolmas, erityisesti metylaatiotutkimukseen liittyvä vahvuus oli että tutkimuksen kohteena olevista tapauksista voitiin tutkia näytteet sekä keuhkosityöpäkudoksesta että normaalista keuhkokudoksesta. Näin voitiin osaltaan sulkea pois yksilökohtaista vaihtelua, joka voi olla varsin merkittävää DNA:n metyloitumisen muutoksissa. Samalla kuitenkin tämä valinta vaikutti siihen, että tutkittavien tapausten määrää piti rajoittaa kustannussyistä.

Tutkimus onnistui erinomaisesti sekä teknisesti että saatujen analyysitulosten osalta. Se tuotti erittäin suuren määrän uutta analyysitietoa työperäiseen asbestialtistumiseen liittyvistä metylaatiomuutoksista. Tässä raportissa kuvataan saatu valtava tietomäärä lähinnä yhteenvedonmaisesti. Tämä raportointitapa johtuu siitä, että tuloksia ei ole vielä julkaistu kansainvälisillä tieteellisillä foorumeilla lukuun ottamatta kahta kokousabstraktia, jotka ovat

raportin liitteenä. Käsikirjoitus on valmisteilla. Tutkimuksen rahoittajalle on myös toimitettu yksityiskohtainen englanninkielinen tulosraportti, joka ei ole julkinen.

Kiitämme Työsuojelurahastoa myönnetyistä hankerahoituksesta. Kiitämme myös hankkeen kansainvälistä yhteistyötä tukenutta Työterveyden Edistämisyhdistys ry:tä, jonka myöntämä apuraha Eeva Kettuselle (myöntöpvm. 19.4.2012) mahdollisti osaltaan tutkimusjaksot IARC:ssa.

Tekijät

## FOREWORD AND ACKNOWLEDGEMENTS

The research reported here has been mainly carried out at the Finnish Institute of Occupational Health (FIOH), Helsinki, with financial support received from the Finnish Work Environment Fund (FWEF), Helsinki (project no 111100). The study has been conducted in collaboration with the International Agency for Research on Cancer (IARC), WHO, Lyon, France.

The research group at the Systems Toxicology Team has included the FIOH scientists Dr Eeva Kettunen, PhD; Dr Henrik Wolff, MD PhD, Chief Medical Officer (Pathology), and Research Prof. Kirsti Husgafvel-Pursiainen, PhD, who functions as the head of the project, as well as Dr Sisko Anttila, MD PhD, Chief Pathologist, HUSLAB, Helsinki University Hospital, and FIOH. In addition, Dr. Kaisa Salmenkivi, Chief Pathologist, HUSLAB, Helsinki University Hospital has participated in the study. The laboratory analyses at FIOH have been carried out by Sauli Savukoski, biomedical laboratory scientist, as well as Tuula Suijala and Päivi Tuominen, both chief laboratory technicians.

The scientists involved in the current study at IARC have included Dr Hector Hernandez-Vargas, MD PhD, and Dr Zdenko Herceg, PhD, from the Epigenetics Group, Section of Mechanisms of Carcinogenesis, with Dr. Herceg as the Head of the Section. In addition, Ms Marie-Pierre Cros, Epigenetics Group, as well as Mr Geoffroy Durand, and Dr Florence Le Calvez-Kelm, Genetic Cancer Susceptibility Group, Section of Genetics, have been involved in the study as part of the IARC research group.

The study was focused on lung cancer associated with occupational exposure to asbestos fibers. In particular, we investigated differential DNA methylation as one important molecular-level mechanism involved in development of asbestos-related lung cancer. The study applied up-to-date genome-wide technology, available for the study via collaboration with the IARC group, to examine DNA methylation throughout the whole genome, i.e. to investigate the so called DNA methylome. In addition to the genome-wide approach, a major strength of the study was that occupational asbestos exposure of the lung cancer cases could be confirmed by electron microscopic asbestos fiber counts in the lung tissue. A third strength, especially relevant for analysis of methylation patterns, was that pairwise samples of lung tumor tissue and normal lung from same cases were available. This enabled us to minimize individual variation known to exist for methylation levels. On the other hand, the design limited the number of samples that could be included in the study, to keep the costs on acceptable level.

The study was very successful both in terms of technical performance and overall results of the methylation analyses. The vast datasets received were successfully analyzed with appropriate filtering and data processing tools, and the study provided large numbers of new

discoveries concerning differential methylated genomic regions and genes in asbestos-related lung cancer. This report summarizes the main results and methylation patterns observed. We chose not to describe the study and results in more detail, as the work is currently unpublished and therefore confidential, apart from a two conference abstracts (attached). A manuscript is in preparation. In addition the present report, we have provided the Finnish Work Environment Fund with a detailed confidential research report.

We gratefully acknowledge the financial support received for the project from the Finnish Work Environment Fund. The international collaboration in the project was additionally supported by a grant from Työterveyden Edistämisyhdistys ry (Association for Promotion of Occupational Health) to Dr Eeva Kettunen (decision dated 19 April, 2012) for a research period in the IARC.

The authors

## TIIVISTELMÄ

**Tausta.** Asbesti on merkittävin keuhkosityöpää aiheuttava työperäinen altiste, ja tutkimusten mukaan se aiheuttaa noin 8-20 % kaikista keuhkosityöpäkuolemista riippuen mm. kuitutyypistä ja altistumisen määrästä. Huolimatta merkittävistä kuolleisuusluvuista ja pitävästi osoitetusta syy-yhteydestä asbestikuitualtistumiseen tunnetaan asbestisairauksien syntymekanismit huonosti. Asbestiin liittyvää keuhkosityöpää tämä koskee erityisesti: molekyyli-tason muutoksia ja syöpäkasvuun liittyviä signaalireittejä soluissa tunnetaan tuskin lainkaan. Tiedon kartuttaminen syntymekanismeista on erittäin tärkeää ja sitä tarvitaan riskinarvioinnissa sekä ehkäisevien toimien tueksi. Molekyyli-tason syntymekanismisselvittäminen auttaa tunnistamaan myös muihin kuitumaisiin altisteisiin, esimerkkinä teollisesti valmistetut kuitumaiset nanohiukkaset, mahdollisesti liittyvää syöpäsairastumisriskiä (ns. kuitukarsinogeneesia).

Tutkimus on viimeisten noin 10 vuoden aikana tuonut esiin, että perinnöllisten muutosten lisäksi ns. epigeneettisillä muutoksilla - muutoksilla, jotka vaimentavat normaalia geenitoimintaa muilla mekanismeilla kuin perimän pysyvillä muutoksilla - on merkittävä rooli syövän kehityksessä. On myös osoitettu, että epigeneettiset muutokset, erityisesti DNA-metylaation muutokset, ovat keskeisiä myös altistumiseen liittyvissä syövyissä. Tutkituin esimerkki tästä on DNA-metylaation muutokset tupakointiin liittyvässä keuhkosityövässä. Viimeaikoina on saatu viitteitä myös asbestialtistumisen ja metylaatiomuutosten välisestä yhteydestä.

**Tavoitteet.** Hankkeen tavoitteena oli tutkia DNA-metylaation muutoksia keuhkosityövässä käyttämällä uusia, koko perimänlaajuisia menetelmiä. Tavoitteena oli tunnistaa genomilaajuisesti sellaisia metylaatiomuutosten kohteena olevia geenejä tai genomialueita, jotka ovat keskeisiä erityisesti asbestialtistumiseen liittyvän keuhkosityövän kehityksessä. Viimekädessä tutkimus tavoittelee tällaisten metylaatiomuutosten tunnistamista ja karakterisointia niin, että ne olisivat käytettävissä ns. biomarkkereina asbestialtistumiseen liittyvälle keuhkosityöväälle.

**Tutkimusasetelma, aineisto ja menetelmät.** Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää DNA-metylaation muutoksia keuhkosityövässä käyttämällä tämän hetken perimänlaajuisia menetelmiä (ns. DNA-metylomien tutkiminen). Tutkimus käsitti yhteensä 28 keuhkosityöpätapausta, joista 14 oli työssään altistunut asbestille ja 14 tapauksella ei ollut työperäistä asbestialtistumista. Jokaisesta tapauksesta oli tutkittavana sekä keuhkosityöpäkudosta että normaalia keuhkokudosta niin, että näitä voitiin verrata pareittain mahdollisen yksilöllisen vaihtelun vähentämiseksi. Lisäksi tutkittiin kuudelta muuta keuhkovaivaa kuin syöpää sairastavalta kontrollitapaukselta keuhkokudosnäytteet.



Tutkittavien tapausten työperäinen asbestialtistuminen oli arvioitu määrittämällä asbestikuitupitoisuus normaalista keuhkokudoksesta pyyhkäisyelektronimikroskoopilla. Myös työhistoriasta ja tupakointitavoista oli tiedot olemassa.

Genominlaajuinen metylaatioanalyysi tehtiin Maailman terveysjärjestön alaisen Kansainvälisen syövätutkimuskeskuksen IARC:n laboratoriossa Lyonissa, jossa Eeva Kettunen oli vierailevana tutkijana. Tämä on osa kansainvälistä tutkimusyhteistyötämme IARC:n kanssa (pääyhteistyökumppanit Drs Zdenko Herceg ja Hector Hernandez-Vargas). Koko genomin kattava DNA-metylaatioanalyysi suoritettiin Illumina Infinium 450K HumanMethylation -teknologialla, joka hyödyntää ns. mikrosirutekniikkaa (koettimet kattavat yli 450.000 mahdollisesti metylaation kohteena olevaa eri genomin kohtaa [ns. CpG site]). Tekniikan vaatimat normalisoinnit ja laadunvarmennusanalyysit suoritettiin ennen metylaatiotulosten jatkokäsittelyä. Mikrosiruanalyyseissa tunnistettujen metylaatiomuutosten varmentamisessa käytettiin standardiksi muodostunutta bisulfiittikäsitellyn DNA-näytteen pyrosekvenssointia. Tulosanalysoinnissa käytettiin kolmea eri strategiaa: Ensimmäisessä tulokset analysoitiin yhtä genomikohtaa koskevien muutosten (differentially methylated positions, DMPs) suhteen sekä myös niin, että tarkasteltavien ryhmien välinen ero metylaatiotasossa oli vähintään 10% ( $\Delta 10\%$  DMP). Toisessa tarkasteltiin metylaatiomuutoksia tietyllä genomialueella (differentially methylated regions, DMRs). Kolmas analyysistrategia otti huomioon ns. suuren vaihtelun metylaatiokohtat (methylation variable positions, MVPs). Saadun analyysitulospainon esikäsittely, tilastollinen käsittely ja tulosanalyysit tehtiin perimänlaajuisille analyyseille käytettyjä menetelmiä hyödyntäen. Tilastollisissa analyyseissa ja bioinformaattisissa tulosten käsittelyssä käytettiin R/Bioconductor -ohjelmistoja ja joitain muita data-prosessointisovelluksia. DMP-kohtien genomisessa tunnistamisessa käytettiin HM450K-mikrosirumenetelmän antamia tietoja sekä ihmisen genomin referenssitietoja (hg19). Tutkimuksella oli tarvittavat eettiset lausunnot ja tutkimusluvut.

**Tulokset.** Asbestialtistuneiden keuhkosityöpätapausten ryhmässä keuhkojen asbestikuitupitoisuudet osoittivat selkeästi työperäistä altistumista (5,9 - 145 milj. kuitua/gramma kuivaa keuhkonäytettä), altistumattomien ryhmässä asbestikuitupitoisuudet olivat työperäisen altistumisen tasoa pienempiä (0 - 0,5 milj. kuitua/g) ja kontrollitapauksista kahden kuitumäärä osoitti työperäistä altistumista. Kaikki tutkitut olivat tupakoineet runsaasti, osa heistä oli lopettanut.

Metylaatiomuutosten genominlaajuinen analyysi onnistui erittäin hyvin. Mikrosiruanalyyysin tekninen toistoanalyysi sekä erilaiset tuotettujen metylaatioanalyysitulosten laatuarvioinnit osoittivat mikrosiruanalyyysin tulosten olevan hyvin toistettavia ja tuotettujen tulostietomasojen olevan muillakin tavoilla arvioituna laadullisesti hyviä.

Metylaatioanalyysin tuloksissa keuhkosityöpötilaiden normaali keuhkokudos erottui selvästi keuhkosityöpökudoksesta kaikilla eri tasoilla tehdyissä data-analyyseissa (DMP-,  $\Delta 10\%$

DMP-, DMR- ja MVP-analyysit). Useimmissa analyyseissa metylaatiomuutokset olivat tilastollisesti merkitsevästi erilaisia normaalikudoksessa verrattuna keuhkosityöpäkudokseen (vakioitu p-arvo tilastollisesti merkitsevä).

Tutkimuksessa havaittiin myös, että asbestialtistuminen liittyi tiettyjen genomialueiden metylaatiomuutoksiin. Tarkasteltaessa 100 analyysin kärkeen sijoittuvaa MVP-kohtaa havaittiin näistä 22 liittyvän tilastollisesti merkittävästi asbestialtistumiseen, kun analyysissä otettiin huomioon sekä syöpäkudos että normaalikudos (vakioitu p-arvo <0,05). Tulosanalyysit osoittivat, että myös tupakointiin liittyi tilastollisesti merkitsevästi yli 100 MVP-kohtaa. Saatut tulokset raportoidaan yksityiskohtaisesti tieteellisessä julkaisussa (käsikirjoitus valmis-teilla).

**Yhteenveto ja johtopäätökset.** Asbestialtistumiseen liittyvään keuhkosityöpään kohdistunut perimänlaajuinen metylaatiomuutosten tutkimushanke oli erittäin onnistunut ja tunnisti suuren joukon uusia genomien kohtia, joissa havaittiin metylaatiomuutoksia keuhkosityöpäkudoksen ja normaalin keuhkokudoksen välillä. Työperäistä asbestialtistumista tarkastelevat analyysit samalla tavoin tunnistivat suuren määrän uusia geenejä, joiden metylaatiomuutokset liittyivät tilastollisesti merkitsevästi asbestialtistumiseen. Myös tupakointiin havaittiin liittyvän suuri määrä metylaatiomuutoksia. Yhteenvetona tutkimuksen löydöksistä voi todeta, että tunnistetut metylaatiomuutokset paljolti osuivat geeneihin, jotka osallistuvat stressin ja tulehduksen, energia- ja rasva-aineenvaihdunnan sekä proteiinien hajoamisen prosesseihin soluissa, sopien näin hyvin aikaisempaan tietoon asbestiin liittyvistä syöpämekanismista. Keskeisten löydösten varmentaminen toisessa keuhkosityöpään kohdistuvassa tutkimuksessa on yleistettävyyden vuoksi tärkeää.

**Tutkimuksen merkitys.** Tässä raportoitu tutkimus tuotti uutta, koko genomien kattavaa tietoa DNA-metylaation muutoksista asbestialtistumiseen liittyvässä keuhkosityövässä. Saatut tulokset täydentävät merkittävällä tavalla tietoa asbestikuitualtistumiseen liittyvän syövän kehittämisessä vaikuttavista molekyyli-tason mekanismeista. Parempi tietämys metylaatiomuutoksista on tärkeää syöpärisikin arvioinnissa. On todennäköistä, että tämä tieto palvelee myös muiden kuitumaisten altisteiden syöpävaikutusten selvittämistä, esimerkiksi kuitumaiset hiilinanokuidut.

Hankkeen yhtenä tärkeänä piirteenä oli tutkimuksessa keskeisellä sijalla ollut kansainvälinen tutkimusyhteistyö Kansainvälisen syöväntutkimuskeskus IARC:n kanssa. Se teki mahdolliseksi tämän hetken kehitystä edustavien genomien laajuisten tekniikoiden käytön. Koska asbestin aiheuttamaan keuhkosityöpään liittyvistä molekyyli-tason muutoksista tiedetään vielä kovin vähän, ei ole ennakkotietoa, jonka avulla voisi kohdentaa metylaatiomuutosten analyyseja oikeisiin geeneihin tai genomien kohtiin.

## ABSTRACT

**Background.** Asbestos is the main occupational lung carcinogen causing approximately 8-20 % of lung cancer deaths, depending on the type and extent of the exposure and the population. Despite the high cancer mortality and proven causal relationship between exposure to asbestos fibers and human pulmonary cancer, our understanding of molecular alterations in asbestos-related lung carcinogenesis has remained relatively sparse. However, knowledge about mechanisms of fiber-carcinogenesis, including those on the molecular level, is a prerequisite for up-to-date risk assessment and further preventive actions. In addition, a better understanding of fiber-related lung carcinogenesis also contributes to identification of cancer risks related to other types of potentially carcinogenic fibrous materials, such as, for example, engineered fibrous nanoparticles.

Epigenetic modifications have emerged as major class of molecular alterations in cancer. DNA methylation is involved in the disruption of normal gene expression (e.g. of tumour suppressor genes, a most important class of the so called cancer genes). Current limited data suggest that epigenetics may play a role in asbestos-related cancer, similar to the much more widely recognized association between differential methylation and smoking in lung cancer: More detailed data are, however, in practice completely missing.

**Aims.** The present study explored DNA methylation patterns in lung cancer using a genome-wide approach, i.e. investigated the so-called DNA methylome. The goal was to identify with current genome-wide technologies differentially methylated genes and genomic regions which play significant roles during lung cancer development associated with asbestos exposure, with the ultimate aim of identifying and characterizing these as potential methylation biomarkers for asbestos-related lung cancer.

**Study design, materials, and methods.** Genome-wide differential DNA methylation was studied in lung tumor and normal peripheral lung tissue collected for each lung cancer case as a matched pair. The study comprised 28 male cases of lung cancer with (14 cases) or without (14 cases) occupational exposure to asbestos; all were relatively heavy current or former smokers. As controls, normal lung tissue from six male cases with non-malignant lung disease was included. Detailed data on pulmonary fiber counts (scanning electron microscopy), work and smoking histories, as well as patho-clinical data was available for the cases. Genome-wide differential methylation profiles were examined by Illumina Infinium 450K HumanMethylation technology covering more than 450 000 CpG sites. Validation experiments were done by pyrosequencing. After robust normalizations and corrections for multiple comparisons, the strategy for data analysis of DNA methylation was implemented at single-site level (differentially methylated positions, DMPs), regional (CpG island) level (differentially methylated regions, DMRs), and differential variable methylation site (MVPs).

The DNA methylome data were analyzed based on a combination of R/Bioconductor packages following recent guidelines for HM450K data mining, supplemented by other data processing applications. To study the genomic context of DMPs we used HM450K annotations, with hg19 as the human reference genome. The study has positive statements from the appropriate ethics committees and research permission as needed.

**Results.** Pulmonary asbestos fiber counts indicated clear occupational level exposure for the asbestos-exposed lung cancer group, and low-level or no exposure for the non-exposed lung cancer group, and two of the non-malignant controls had fiber counts indicative of occupational exposure. All cases included were smokers, either current ones or former smokers, with close to or more than 40 pack-years of smoking.

The genome-wide DNA methylation analysis was successfully performed as a collaborative effort in the laboratory of the WHO/International Agency for Research on Cancer in Lyon (PIs Drs Zdenko Herceg and Hector Hernandez-Vargas). Technical replicates and quality plots of the Illumina array results indicated repeatability and overall good quality of the assays.

On the various levels of data analysis (DMPs; DMPs with at least 10% difference; DMRs; MVPs), lung tumor tissue were found to show differential methylation pattern as compared with the corresponding (pairwise matched) normal lung tissue samples. The differences between tumor and normal lung reached statistical significance (adjusted p-value) in most of these data analyses, with clearly distinguishable methylation patterns between lung tumor and normal lung tissue observed.

The various levels of methylation analysis revealed differences associated with asbestos exposure. Of the top 100 MVPs, 22 were statistically significantly associated with asbestos exposure (adjusted p-value <0.05, both tumor and peripheral lung tissues included). In addition, the analyses suggested more than 100 MVPs as smoking-related. The results will be described in detail in a scientific report (manuscript in preparation).

**Summary and conclusions.** Our current study on genome-wide methylation analysis was highly successfully and discovered a multitude of genomic (CpG) sites, mostly residing in gene regions, which showed significantly differential methylation in lung cancer as compared to normal lung tissue. Our findings thus suggest that methylation profiles were globally affected in lung cancer tissue compared to matched normal lung. We also found associations to asbestos exposure and tobacco smoking, suggesting a role for these exposures in modification of genome-wide DNA methylation profiles. In a more general view, we observed differential methylation in lung cancer of genes such as those involved in cell stress and inflammation, cellular energy and lipid metabolism, and protein degradation processes,

fitting well to what is known or speculated about asbestos-related cancer mechanisms. Current findings obviously need to be validated in another study population, to further evaluate their significance.

**Significance of the study.** Our current work contributes to a deeper understanding of fiber-related lung carcinogenesis and to the role of differential methylation may play in it. Opening up asbestos-related carcinogenesis is highly important not only to understand molecular tumorigenesis during development lung cancer, but also for improved risk assessment and, ultimately, for development of more specific molecular biomarkers for early diagnosis and clinical follow up. An additional significant outcome of the study was the international collaboration which made it possible for us to utilize up-to-date laboratory technologies for investigating differential methylation on genome-wide level. This was highly beneficial for the study, since so little is known about alterations the fibers may cause in methylation and therefore a candidate gene-based studies are likely less optimal and may give as result narrower insights in the carcinogenesis process related to asbestos exposure.

# SISÄLLYS

<b>1</b>	<b>Tausta</b> .....	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Tavoitteet</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Tutkimusasetelma, aineisto ja menetelmät</b> .....	<b>4</b>
	Tutkimusasetelma ja aineisto.....	4
	Menetelmät ja data-analyysit.....	4
	Eettiset näkökohdat .....	5
<b>4</b>	<b>Tulokset</b> .....	<b>6</b>
	Asbestialtistuminen ja tupakointi .....	6
	Perimänlaajuinen metylaatioanalyysi.....	6
	Metylaatiomuutokset keuhkosyöpäkudoksen ja normaalin keuhkokudoksen välillä .....	6
	Asbestialtistumiseen liittyvät metylaatiomuutokset.....	7
	Tupakointi ja metylaatiomuutokset .....	7
<b>5</b>	<b>Pohdinta ja johtopäätökset</b> .....	<b>9</b>
<b>6</b>	<b>Tutkimuksen merkitys ja hyödyntäminen</b> .....	<b>11</b>
<b>7</b>	<b>Lähteet</b> .....	<b>12</b>
<b>8</b>	<b>Liitteet</b> .....	<b>18</b>
	Liite 1. Taulukot 1 ja 2. Tutkitut tapaukset ja heidän taustatietonsa .....	19
	Liite 2. Tieteelliset julkaisut ja kongressiabstraktit .....	23
	Liite 3. Tutkimuksen tuloksista raportoidut kongressiabstraktit .....	25

# 1 TAUSTA

Asbesti on ryhmä luonnosta saatavia kuitumaisia silikaattimineraaleja, jotka jakautuvat amfiboliasbestiin (krokidoliitti, amosiitti ja antofylliitti) ja serpentiiniasbestiin (krysotiili) ja joilla on ollut laajaa käyttöä rakentamisessa ja teollisuudessa. Kansainvälinen syöväntutkimuskeskus IARC on luokitellut kaikki asbestikuidut ihmiselle syöpää aiheuttaviksi (Straif ym. 2009; IARC 2012). Asbesti on merkittävin keuhkosityöpää aiheuttava työperäinen altiste, ja tutkimusten mukaan se aiheuttaa noin 8-20 % kaikista keuhkosityöpäkuolemista riippuen mm. kuitutypistä ja altistumisen määrästä (Karjalainen & Anttila 1997; Rushton ym. 2008; McCormack, ym. 2012; IARC 2012). Maailmanlaajuisesti työperäinen asbestialtistuminen aiheuttaa vuosittain hieman yli 40.000 keuhkosityöpäkuolemaa ja runsaat 50.000 mesotelioomaa. Lisäksi asbestoosiin arvioidaan maailmanlaajuisesti kuolevan vuosittain noin vajaat 10.000 – 20.000 ihmistä. Nämä luvut ovat kuitenkin todennäköisesti aliarvioita, sillä asbestisairauksia alidiagnosoidaan eikä tunnistettuja tapauksia myöskään raportoida täysimittaisesti (Collegium Ramazzini 2015).

Huolimatta näin merkittävistä kuolleisuusluvuista, pitävästi osoitetusta syy-yhteydestä asbestialtistumiseen ja tupakoinnin synergistisestä vaikutuksesta syöpäriskiin tunnetaan asbestisairauksien syntymekanismit huonosti (Oksa ym. 2014). Asbestiin liittyvää keuhkosityöpää tämä koskee erityisesti: molekyyli-tason muutoksia ja syöpäkasvun signaalireittejä tunnetaan tuskin lainkaan. Tiedon kartuttaminen syntymekanismeista on kuitenkin erittäin tärkeää ja sitä tarvitaan riskinarvioinnissa sekä ehkäisevien toimien tueksi (IARC 2012). Molekyyli-tason syntymekanismien selvittäminen auttaa tunnistamaan muihin kuitumaisiin altisteisiin liittyvää syöpäsairastumisriskiä (ns. kuitukarsinogeneesia) (Kane & Hurt 2008; Donaldson ym. 2010; Guo ym. 2012) sekä myös ymmärtämään muiden asbestisairauksien (esimerkkinä asbestoosi) suhdetta keuhkosityövän kehittymiseen (Mossman ym. 2011; Collegium Ramazzini 2015).

Tutkimus on viimeisten noin 10 vuoden aikana tuonut esiin, että perinnöllisten muutosten lisäksi ns. epigeneettisillä muutoksilla - muutoksilla, jotka vaimentavat normaalia geenitoimintaa muilla mekanismeilla kuin perimän pysyvillä muutoksilla - on merkittävä rooli syövän kehittämisessä (Baylin and Jones 2011; Berger ym. 2011). On myös osoitettu, että epigeneettiset muutokset, erityisesti DNA-metylaation muutokset, ovat keskeisiä myös altistumiseen liittyvissä syövyissä (Christensen & Marsit 2011; Feil & Fraga 2012). Tutkituin esimerkki tästä on DNA-metylaation muutokset tupakointiin liittyvässä keuhkosityövässä (Jarmalaitte ym. 2003; Belinsky 2004; Divine ym. 2005; Leng ym. 2015). Viimeaikoina on saatu viitteitä metylaatiomuutoksista myös asbestialtistumiseen liittyvässä keuhkosityövässä ja mesoteliomassa (Christensen ym. 2009; Herceg ym. 2013; Vandermeers ym. 2013).

## 2 TAVOITTEET

Hankkeen tavoitteena oli tutkia DNA-metylaation muutoksia keuhkosyövässä käyttämällä uusia, koko perimänlaajuisia menetelmiä. Erityisesti tavoitteena oli

- tunnistaa genominlaajuisesti sellaisia metylaatiomuutosten kohteena olevia geenejä tai genomialueita, jotka ovat keskeisiä erityisesti asbestialtistumiseen liittyvän keuhkosyövän kehittämisessä;
- karakterisoida tällaisia asbestialtistumiseen liittyviä metylaatiomuutoksia/geenejä niin, että ne olisivat käytettävissä ns. biomarkkereina syöpävaaran tieteellisessä arvioinnissa ja asbestikeuhkosyövän varhaisessa tunnistamisessa sekä viimekädessä myös hoidossa.



## 3 TUTKIMUSASETELMA, AINEISTO JA MENETELMÄT

### 3.1 Tutkimusasetelma ja aineisto

Asbestialtistumiseen liittyvässä keuhkosyövässä tutkittiin DNA-metylaation muutoksia perimänlaajuisin menetelmin (ns. DNA-metylomien tutkiminen). Tutkimus käsitti yhteensä 28 keuhkosyöpätapausta, joista 14 oli työssään altistunut asbestille ja 14 tapauksella ei ollut työperäistä asbestialtistumista. Jokaisesta tapauksesta oli tutkittavana sekä keuhkosyöpäkudosta että normaalia keuhkokudosta niin, että näitä voitiin verrata pareittain. Tämä on tärkeää mahdollisen yksilöllisen vaihtelun vaikutuksen eliminoimisessa. Lisäksi tutkimus käsitti näytteitä normaalista keuhkokudoksesta muuta keuhkosairautta kuin syöpää sairastavalta kuudelta kontrollitapaukselta. Myös muutamien samojen tapausten verinäytteiden metylaatiomuutokset analysoitiin verrokkikudoksena.

Tutkittavien tapausten työperäinen asbestialtistuminen oli arvioitu määrittämällä normaalin keuhkokudoksen asbestikuitupitoisuus pyyhkäisyelektronimikroskoopilla. Myös työhistoriasta ja tupakointitavoista oli tiedot.

### 3.2 Menetelmät ja data-analyysit

Genominlaajuiseen DNA-metylaatioanalyysiin tarvittiin jokaisesta kudoksenäytteestä 600 µg DNA:ta, joka muokattiin analyysia varten ns. bisulfiittikäsittelyllä. Analyysi suoritettiin Illumina Infinium HM450K BeadChip –teknologialla, joka hyödyntää ns. mikrosirutekniikkaa. Käytetyn tekniikan koettimet kattavat yli 450.000 mahdollisesti metylaation kohteena olevaa eri kohtaa (ns. CpG site) genomissa (Bibikova ym. 2011). Tämä vaativa analyysi tehtiin osana kansainvälistä tutkimusyhteistyötämme IARC:n Section of Mechanisms of Carcinogenesis –yksikön (Lyon) kanssa. Tämän yhteistyön kautta hanke sai käyttöönsä perimänlaajuiseen metylaatioanalyysiin tarvittavan uuden teknologian sekä tulosten käsittelyssä ja tulkinnassa tarvittavan erityisosaamisen. Tekniikan vaatimat normalisoinnit ja laadunvarmennus-toimenpiteet suoritettiin ennen analyysitulosten jatkokäsittelyä (mm. Chen ym., 2013; Teschendorff ym. 2013).

Metylaatiomuutosten tulosanalysoinnissa käytettiin kolmea eri strategiaa. Ensimmäisenä tulokset analysoitiin yhtä muutoskohtaa koskevien muutosten (differentially methylated positions, DMPs) suhteen. Näitä DMP-tuloksia analysoitiin myös niin että tarkasteltavien ryhmien välisen metylaatiotason eron piti olla suuruudeltaan vähintään 10% ( $\Delta 10\%$ ). Toisena analysoinnin tasona käytettiin metylaatiomuutoksia tietyllä genomialueella (differentially methylated regions, DMRs). Kolmas analyysistrategia otti huomioon syövässä havaitun

suuren vaihtelun metylaatioissa tietyissä genomien kohdissa (methylation variable positions, MVPs) (Hansen ym. 2011; Phipson & Oshlack 2014).

Genomilaajuisen metylaatioanalyysin tuottama valtava tietomäärä esikäsiteltiin genomilaajuisen menetelmän vaatimalla tavalla. Saadun tietomassan esikäsitely, tilastollinen käsitely ja analyysit (muunnokset ja tilastollisessa analysoinnissa monien eri vertailujen vaatimat korjaukset) tehtiin perimälaajuisille analyyseille käytettyjä menetelmiä hyödyntäen (Du ym. 2010; Leek ym. 2012). Raakadatan siirrossa käytettiin tähän soveltuvaa menetelmää (Aryee ym. 2014). Tilastollisissa analyyseissa ja bioinformaattisessa tulosten käsittelyssä käytettiin R/Bioconductor –ohjelmistojä ja muita sovelluksia HM450K-mikrosirumenetelmän tiedonlouhintakäytäntöjen mukaisesti. Datamassan prosessoinnissa ja analysoinnissa käytettiin myös IARC:n ryhmän omia R-ohjelmointeja.

Tutkittavien DMP-kohtien genomisessa tunnistamisessa käytettiin HM450K-mikrosirumenetelmän antamia tietoja, ihmisen genomien referenssitietoja (hg19) sekä aikaisemmin julkaistuja tietoja (Sliker ym. 2013). DMR-analyysit suoritettiin kirjallisuudessa kuvatulla tavalla (Jaffe ym. 2012; Du & Bourgon 2014).

DMP-analyyseissa arvioitiin tilastollista merkitsevyyttä vakioidulla ns. False Discovery Rate (FDR) p-arvolla ottaen huomioon metylaatiomuutosten analysointiin liittyvät erityispiirteet (Smyth 2004); merkitsevyyden raja-arvona käytettiin  $FDR < 0,05$ . DMR-analyyseissa tilastollisen merkitsevyyden arvioitiin vakioidulla p-arvolla (ns. Family-wise error rate), rajana  $FWER < 0,05$ . MVP-analyyseissa käytettiin tilastollisen merkitsevyyden rajana vakioitua p-arvoa  $FDR < 0,05$ .

Siruanalyysissa tunnistettujen metylaatiomuutosten varmentamisessa käytettiin standardiksi muodostunutta bisulfiittikäsitellyn DNA-näytteen pyrosekvenssointia (käytetyt primerit olivat joko PyroMark (Qiagen) CpG tai itse suunniteltuja) aikaisemmin kuvatun mukaisesti (Hernandez-Vargas ym. 2010).

### 3.3 Eettiset näkökohdat

Tutkimus perustui tutkittavien antamaan suostumukseen ja se on saanut tarvittavat puoltavat eettiset lausunnot ja tutkimusluvut (Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin Koordinoiva eettinen toimikunta, Sosiaali- ja terveysalan lupa- ja valvontavirasto Valvira, THL; DNr 105/13/03/00/2013; 5929/06.01.03.01/2013; THL/1055/5.05.01/2013).

## 4 TULOKSET

### 4.1 Asbestialtistuminen ja tupakointi

Tutkittujen tapausten altistumis- ja muut taustatiedot on kuvattu taulukoissa 1 ja 2 (liite 1).

Asbestille altistuneiden keuhkosityöpätapausten keuhkojen asbestikuitupitoisuudet vaihtelivat välillä 5,9 - 145 miljoonaa kuitua/gramma kuivaa keuhkonäytettä, osoittaen selkeää työperäistä altistumista. Altistumattomien keuhkosityöpätapausten ryhmässä asbestikuitupitoisuudet olivat tasolla, joka on työperäistä altistumista pienempi (0 - 0,5 miljoonaa kuitua/g). Kontrollitapausten asbestikuitupitoisuus vaihteli välillä 0 - 3,0 miljoonaa kuitua/g, ja kahdella pitoisuus osoitti työperäistä altistumista. Kaikki tutkitut tapaukset olivat tupakoineet runsaasti, osa heistä oli lopettanut tupakoinnin ennen keuhkosityöpädiagnoosia. Asbestialtistuneiden tapausten ryhmässä keskimääräinen tupakointi oli  $40 \pm 24$  ns. pakkavuotta (yksi pakkavuosi = laskennallisesti yksi vuosi, jona tupakoitu päivittäin 20 savuketta), altistumattomien ryhmässä vastaava määrä oli  $44 \pm 10$  ja kontrollitapauksilla  $38 \pm 11$  pakkavuotta.

### 4.2 Perimänlaajuinen metylaatioanalyysi

Yhteistyönä tehty metylaatiomuutosten genomilaajuinen analyysi mikrosirumenetelmällä onnistui hyvin IARC:n laboratoriossa Lyonissa. Erilaisten suodatusten ja muiden laatuksentrollitoimenpiteiden jälkeen metylaatiotulos saatiin jokaisesta näytteestä keskimäärin yli 434.000:stä kohdasta genomissa näytettä kohti (parittaiset kasvain-normaalikeuhko – näytteet). Mikrosiruanalyysin tekninen toistoanalyysi sekä erilaiset tuotettujen metylaatioanalyysitulosten laatuarvioinnit osoittivat mikrosiruanalyysin tulosten olevan hyvin toistettavia ja tuotettujen tietomassojen olevan muillakin tavoilla arvioituna laadullisesti hyviä.

Tässä raportissa kuvatut tutkimuksen pääasialliset tulokset perustuvat eri kudoksissa ja eri tutkittavissa ryhmissä havaittuihin perimänlaajuisiin metylaatiomuutoksiin tarkasteltuna ns. heatmap-muodossa. Näissä "kartoissa" tutkimuksen kokonaistulokset saadaan havainnollisesti esiin eri tarkasteluryhmien metylaatioprofiileina (havaitut metylaatiotasot ja näiden trendit).

### 4.3 Metylaatiomuutokset keuhkosityöpäkudoksen ja normaalin keuhkokudoksen välillä

Metylaatioanalyysin tuloksissa keuhkosityöpötilaiden normaali keuhkokudos erottui selvästi keuhkosityöpäkudoksesta kaikilla eri tasoilla tehdyissä data-analyyseissa (DMP-,  $\Delta 10\%$

DMP-, DMR- ja MVP-analyysit). Useimmissa analyyseissa metylaatiomuutokset olivat tilastollisesti merkitsevästi erilaisia normaalikudoksessa verrattuna keuhkosyöpäkudokseen (vakioitu p-arvo tilastollisesti merkitsevä). Yhteenvedona näytti olevan niin, että syöpäkudoksessa metylaatiotasot olivat useissa genomikohdissa suuremmat (ns. hypermetylaatio, joka geenin säätely tai ns. promoottorialueella liittyy geenin vähäisempään ilmenemiseen tai geenitoiminnan vaimentamiseen: tällaisia usein ns. kasvurajoite- eli tuumorisuppresso-rigeenit) ja samojen tapausten normaalikudoksessa nämä kohdat olivat usein vähemmän metyloituneita (hypometylaatio, joka liittyy geenin suurempaan ilmenemiseen). Genomissa oli kuitenkin myös alueita, joissa tämä profiili oli päinvastoin eli syöpäkudoksessa oli vähäisempää metylaatiota ja normaalissa keuhkokudoksessa taas suurempaa metylaatiota viittaten siihen, että näillä alueilla sijaitsevien geenien voimakas ilmeneminen liittyy syöpäkasvuun (ns. onkogeenin lailla toimivat geenit).

## 4.4 Asbestialtistumiseen liittyvät metylaatiomuutokset

Tutkimuksessa havaittiin, että asbestialtistuminen liittyi tiettyjen genomialueiden metylaation muutoksiin. Kun tarkasteltiin sataa analyysin kärkeen sijoittuvaa genomikohtaa (DMP-tulokset), joissa todettiin metylaatiotason muutoksia asbestialtistumiseen liittyen, niin havaittiin, että hypometylaatio oli tyypillistä asbestialtistuneilla (sekä keuhkosyöpäkudos että normaalikeuhkokudos mukana analyysissa) verrattuna altistumattomiin, joilla taas oli runsaasti hypermetylaatiota. Samalla tavoin MVP-analyysin tulosten tarkastelu viittasi siihen, että hypometylaatio liittyy asbestialtistumiseen. Tätä havaintoa tuki osaltaan myös se, että yhden havaittavan ryppään asbestialtistumiseen liittyvässä MVP-kohtien heatmap-analyysissa muodostivat altistumattomien tapausten syöpäkudospäätteet, joissa noin puolet näistä sadasta MVP-kohdasta oli hypermetyloituneita.

Sadasta kärkeen sijoittuvasta MVP-kohdasta 22 liittyi tilastollisesti merkittävästi asbestialtistumiseen, kun analyysissä otettiin huomioon sekä syöpäkudos että normaalikudos (vakioitu p-arvo  $<0,05$ ). Kun tarkasteltiin vain syöpäkudospäätteillä tehdystä vertailusta saatuja MVP-tuloksia, niin analyysi tunnisti 11 tilastollisesti merkitsevästi asbestiin liittyvää MVP-muutosta. Tämänkin analyysin mukaan vaikuttaisi siltä, että asbestialtistumiseen liittyvissä syöissä hypometylaatio on tärkeää. Nämä 11 havaittua metylaatiomuutoskohtaa sijaitsevat pääosin geenialueilla ja tunnistavat näin useita uusia asbestisyöpään liittyviä geenejä.

## 4.5 Tupakointi ja metylaatiomuutokset

Sekä DMP- että MVP-tulosanalyyseissa havaittiin metylaatiokohtia, joiden muutokset liittyivät tupakointiin. DMP-analyysin tulokset tunnistivat lähes 20 eri metylaatiokohtaa, joissa metylaatiomuutos liittyi tilastollisesti merkitsevästi tupakointiin (keuhkosyöpä- ja normaali keuhkokudos mukana analyysissa ja tupakointi otettu huomioon jatkuvana muuttujana).

Yleispiirteenä vaikuttaa siltä, että tupakointiin - toisin kuin asbestialtistumiseen - liittyy suurentunutta metylaatiota (hypermetylaatiota). MVP-tulosanalyysi osoitti samoin, että sadasta tupakointiin liittyvästä kärke muutoksesta noin yksi kolmasosa oli sellaisia, joissa havaittiin hypermetylaatiota. Muut MVP-kohdat olivat tavallisimmin hypometyloituneita.

Tutkimustuloksiamme on esitelty kahdessa eri kansainvälisessä kokouksessa (Kettunen ym. 2014, 2015) ja tuloksista on valmisteilla käsikirjoitus kansainväliseen tieteelliseen julkaisuun (Eeva Kettunen, Hector Hernandez-Vargas, Marie-Pierre Cros, Geoffroy Durand, Florence Le Calvez-Kelm, Henrik Wolff, Kaisa Salmenkivi, Sisko Anttila, Zdenko Herceg & Kirsti Husgafvel-Pursiainen. Epigenome-wide DNA methylation profiling of asbestos-exposed patients' lung tumors, in preparation).

Tutkimuksen tuloksista julkaistut kokousabstraktit sekä muut tieteelliset julkaisut on listattu liitteessä (liite 2). Kongressiabstraktit ovat kokonaisuudessaan liitteessä 3.

## 5 POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä raportoitu, asbestialtistumiseen liittyvään keuhkosityöpään kohdistunut perimänlaajuinen metylaatiomuutosten analyysi oli erittäin onnistunut ja tunnisti suuren joukon uusia genomien kohtia, joissa havaittiin metylaatiomuutoksia keuhkosityöpäkudoksen ja normaalin keuhkokudoksen välillä. Useimmat näistä sijaitsivat geenialueilla ja näin tutkimus toi esiin ison määrän uusia geenejä, jotka liittyvät keuhkosityövän kehittymiseen. Työperäistä asbestialtistumista tarkasteltaessa tehdyt metylaatiomuutosanalyysit samalla tavoin tunnistivat lukuisan joukon uusia geenejä, jotka tilastollisesti merkitsevästi liittyivät asbestialtistumiseen. Sama koskee metylaatiomuutoksia tupakointiin liittyvissä keuhkosityövissä: tutkimus tunnisti lähes 20 genomista kohtaa/geeniä, jotka assosioituivat tilastollisesti merkitsevästi tupakointiin.

Yhteenvetona voi todeta, että tehdyt analyysit tunnistivat metylaatiomuutoksia geeneissä, joiden tiedetään osallistuvan tavalla tai toisella syövän syntyprosessiin. Osasta näitä geenejä on olemassa aikaisempia havaintoja niiden osallisuudesta keuhkokarsinogeneesiin (Belinsky 2004; Liloglou ym. 2014; Langevin ym. 2015). Lisäksi tunnistimme metylaatiomuutoksia geeneissä, joista ei juurikaan ole aikaisempaa näyttöä, että niiden muutokset olisivat tärkeitä syövän synnyssä, vaan niiden tiedetään osallistuvan normaaleihin biologisiin prosesseihin, kuten kasvun säätelyyn sekä solujen jakautumiseen ja erilaistumiseen. Asbestialtistumiseen liittyvässä keuhkosityövässä esiin nousseista geeneistä valtaosa oli uusia eikä niitä ei ole aikaisemmin liitetty asbestikeuhkosityöpään (Roggli ym. 2014).

Suuri tunnistettujen geenien sekä niiden biologisten prosessien määrä, joihin nämä osallistuvat, tuntuu viittaavan siihen, että hyvin suuri joukko erilaisia normaaleja biologisia toimintoja ohjaavia geenejä on metylaatiomuutosten kohteena asbestiin liittyvän keuhkosityövän kehitymisessä. Vaikuttaa myös siltä, että osa näistä muutoksista tapahtuu jo karsinogeneesin alkuvaiheessa: Tunnistimme keuhkosityöpäkudoksessa ilmeneviä metylaatiomuutoksia keuhkosityöpätausten normaalista keuhkokudoksesta, kun tehtiin parittainen vertailu normaalin keuhkokudoksen ja keuhkosityöpäkudoksen välillä. Verrattaessa keuhkosityöpätausten normaalia keuhkokudosta kontrollitapausten normaaliin keuhkokudokseen havaittiin myös eroja metylaatiomuutoksissa, jotka ovat samansuuntaisia aiemmin julkaistujen, lähinnä ehdokasgeenipohjaisissa tutkimuksissa saatujen tulosten kanssa metylaatiomuutosten varhaisesta ilmenemisestä (esim. Belinsky ym. 2005; Hubers ym. 2014; Leng ym. 2015). Tämänkaltaiset löydökset antavat tukea sille, että metylaatiomuutoksia voitaisiin käyttää biomarkkerina keuhkosityövän, mahdollisesti myös asbestiin liittyvän keuhkosityövän varhaisessa havaitsemisessa ja tunnistamisessa sekä toivottavasti tulevaisuudessa myös hoidossa (Schmidt ym. 2010; Shivapurkar & Gazdar 2010; Sandoval ym. 2013; Hubers ym. 2014; Liloglou ym. 2014; Langevin ym. 2015).

Alustavat tutkimustuloksemme antavat myös viitteitä siitä, että metylaatiotasojen muutoksista hypometylaatio näyttäisi olevan tyypillisempää asbestialtistumiseen liittyvässä keuhkosyövässä kuin altistumattomien keuhkosyövässä. Eri genomien alueilla esiintyvän hypometylaation merkitystä osana syövän epigeneettisiä muutoksia ei tällä hetkellä tunneta vielä kovin hyvin (Berman ym. 2012, Shen & Laird, 2013; Lay ym. 2015; Yao ym. 2015). Tulostemme perusteella vaikuttaisi myös siltä, että tupakointiin liittyvälle keuhkosyövälle taas hypermetylaatiomuutokset osassa geenejä olisivat enemmän luonteenomaisia. Tämä vastaa aikaisempaa tutkimustietoa, mutta monet tutkimuksessamme havaituista hypermetyloituneista geeneistä ovat uusia löydöksiä verrattuna aikaisemmin tunnistettuihin (Beliński 2004; Husgafvel-Pursiainen 2013; Guida ym. 2015; Leng ym. 2015;). Nämä mahdollisesti erilaiset asbestialtistumiseen ja tupakointiin liittyvät metylaatiomuutosten profiilit ovat alustavaa uutta tietoa ja vaativat tarkentavia analyyseja ja lisätutkimuksia sekä varmentamista laajemmassa keuhkosyöpäaineistossa.

Kokonaisuutena tutkimustieto asbestiin liittyvän keuhkosyövän metylaatiomuutoksista koko genomien tasolla on uutta eikä vastaavaa, keuhkojen asbestikuitupitoisuuden avulla varmennettuihin työperäisiin tapauksiin kohdistuvaa tutkimusta ole tehty. Kokonaiskuvan saamiseksi juuri perimänlaajuinen lähestymistapa on tärkeä, sillä aikaisemmat tutkimukset ovat olleet lähes kokonaan ehdokasgeenipohjaisia. Metylaatiomuutosten tutkiminen koko genomien alueella tarjoaa syöpävaarallisuuden arviointiin laajempaa näkemystä altistumiseen liittyvän syövän kehittymisessä vaikuttavista mekanismeista, kuin mitä tähän asti on ollut käytettävissä (Herceg ym. 2013; Wild ym. 2013; Collegium Ramazzini 2015).

Tietoa kuitukarsinogeneesin molekyyli-tason mekanismeista voidaan hyödyntää myös laajemmin, esimerkiksi teollisesti tuotettuihin nanopartikkeleihin mahdollisesti liittyvien terveysriskien arvioinnissa. Joistakin teollisesti valmistetuista nanohiukkasista on jo olemassa melko vahvaa näyttöä haitallisista toksikologisista ominaisuuksista ja vaikutuksista sekä myös kokeellista näyttöä kyvystä aiheuttaa syöpää. Yhä kasvava joukko tutkimuksia osoittaa, että asbestikuitujen ja kuitumaisten hiilinanopartikkeleiden karsinogeenisuusmekanismit ovat hyvin samankaltaisia, varsinkin koskien mesotelioomaa (esim. Guo ym. 2012; Nagai & Toyokuni 2012; Donaldson ym. 2013; Rittinghausen ym. 2014). Teollisesti tuotettujen nanopartikkeleiden on myös osoitettu voivan aiheuttaa metylaatiomuutoksia soluissa (Lu ym. 2015). IARC:n tuoreessa syöpävaaran arvioinnissa hiilinanoputket luokiteltiin tämän hetkisen näytön perusteella ryhmään 2B, mahdollisesti ihmiselle syöpää aiheuttava (Grosse ym. 2014).

## 6 TUTKIMUKSEN MERKITYS JA HYÖDYNTÄMINEN

Tässä raportoitu tutkimus tuotti uutta, koko genomin kattavaa tietoa DNA-metylaation muutoksista asbestialtistumiseen liittyvässä keuhkosityövässä. Saadut tulokset täydentävät merkittävällä tavalla tietoa kuitualtistumisen aiheuttaman syövän kehittämisessä vaikuttavista molekyylitason mekanismeista. Asbestikeuhkosityövän metylaatiomuutoksiin liittyvien patomekanismien selvittäminen antaa mahdollisuuden verrata havaittuja muutoksia muissa asbestisairauksissa tunnistettuihin mekanismeihin ja arvioimaan näiden keskinäisiä suhteita (esim. asbestoosiin ja mesotelioomaan liittyvät muutokset). Tutkimuksen havainnot metylaatiomuutosten varhaisesta ilmenemisestä keuhkosityövän kehittymisen aikana antavat osaltaan tukea metylaatiomuutosten soveltuvuudesta käytettäväksi keuhkosityövän, mahdollisesti myös asbestiin liittyvän keuhkosityövän biomarkkerina varhaisessa tunnistamisessa ja muussa kliinisessä käytössä.

Tietoa metylaatiomuutoksista voidaan hyödyntää myös syöpäriskin arvioinnissa yhtenä tärkeänä molekyylitason syntymekanismina. Tältä osin tutkimuksemme antaa uutta tietoa metylaatiomuutoksiin liittyvistä syöpämekanismeista, jotka koskevat työperäiseen asbestialtistumiseen liittyvää keuhkosityöpää. On kuitenkin todennäköistä tämä tieto palvelee myös muiden kuitumaisten altisteiden syöpävaikutusten selvittämistä.

Hankkeen yhtenä tärkeänä piirteenä oli tutkimuksessa keskeisellä sijalla ollut kansainvälinen tutkimusyhteistyö WHO:n alaisen Kansainvälisen syövätutkimuskeskus IARC:n kanssa. Se teki mahdolliseksi tämän hetken kehitystä edustavien genominlaajuisten tekniikoiden käytön. Koska asbestin aiheuttamaan keuhkosityöpään liittyvistä molekyylitason muutoksista tiedetään vielä kovin vähän, on hyvin vaikea osata ennakolta kohdentaa metylaatioanalyseja oikeisiin geeneihin tai genomin kohtiin. Tästä syystä olisi perinteinen ehdokasgeenitutkimus ollut huomattavasti rajoittuneempi vaihtoehto. Tämä rajoittuneisuus voitiin välttää käyttämällä perimänlaajuisia lähestymistä, joka tarjoaa kokonaiskuvan.

Hankkeen kansainvälinen yhteistyö myös tarjosi tutkimuksessa erikoistutkijana toimineelle FT Eeva Kettuselle mahdollisuuden työskennellä kaksi tutkimusjaksoa kansainvälisessä laboratoriossa. IARC on tutkimuslaitos, joka tarjoaa myös erinomaisen mahdollisuuden perehtyä laajemmin mm. syövän syytekijöihin, patomekanismeihin ja biomarkkereihin kohdistuvaan kansainväliseen tutkimukseen ja alan nimekkäisiin tutkijoihin.



## 7 LÄHTEET

Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, Irizarry RA. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics* 2014; 30(10):1363-1369.

Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(10):726-734.

Belinsky SA, Klinge DM, Dekker JD, Smith MW, Bocklage TJ, Gilliland FD, Crowell RE, Karp DD, Stidley CA, Picchi MA. Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk. *Clin Cancer Res.* 2005 Sep 15;11(18):6505-11.

Belinsky SA. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Sep; 4(9):707-17.

Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. *Nature* 2011; 476(7359):163-169.

Berman BP, Weisenberger DJ, Aman JF, Hinoue T, Ramjan Z, Liu Y, Noushmehr H, Lange CP, van Dijk CM, Tollenaar RA, Van Den Berg D, Laird PW. Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat Genet* 2012; 44(1):40-46.

Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson KL, Fan JB, Shen R. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* 2011; 98(4):288-295.

Chen YA, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, Gallinger S, Hudson TJ, Weksberg R. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics* 2013; 8(2):203-209.

Christensen B, Houseman E, Godleski J, Marsit C, Longacker J, Roelofs C, Karagas M, Wrensch M, Yeh R, Nelson H, Wiemels J, Zheng S, Wiencke J, Bueno R, Sugarbaker D, Kelsey K. Epigenetic profiles distinguish pleural mesothelioma from normal pleura and predict lung asbestos burden and clinical outcome. *Cancer Res* 2009; 69(1):227-234.

Christensen BC, Marsit CJ. Epigenomics in environmental health. *Front Genet* 2011; 2:84.

Collegium Ramazzini. The Global health dimensions of asbestos and asbestos-related diseases. 18th Statement of the Collegium Ramazzini. Collegium Ramazzini, 2015 (<http://www.collegiumramazzini.org/>).

Divine KK, Pulling LC, Marron-Terada PG, Liechty KC, Kang T, Schwartz AG, Bocklage TJ, Coons TA, Gilliland FD, Belinsky SA. Multiplicity of abnormal promoter methylation in lung

adenocarcinomas from smokers and never smokers. *Int J Cancer*. 2005 Apr 10; 114(3):400-5.

Donaldson K, Murphy F, Duffin R, Poland C. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part Fibre Toxicol*, 2010; 7(1): 5 <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/7/1/5>.

Donaldson K, Poland CA, Murphy FA, MacFarlane M, Chernova T, Schinwald A. Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos - similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev* 2013, 65:2078–2086.

Du P, Bourgon R. *methyAnalysis*: DNA methylation data analysis and visualization. R package version 1.10.0. 2014.

Du P, Zhang X, Huang CC, Jafari N, Kibbe WA, Hou L, Lin SM. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics* 2010; 11:587.

Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet* 2012; 13(2):97-109.

Grosse Y, Loomis D, Guyton KZ, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Scoccianti C, Mattock H, Straif K, and the International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *Lancet Oncol* 2014 Dec; 15(13):1427-1428.

Guida F, Sandanger TM, Castagné R, Campanella G, Polidoro S, Palli D, Krogh V, Tumino R, Sacerdote C, Panico S, Severi G, Kyrtopoulos SA, Georgiadis P, Vermeulen RC, Lund E, Vineis P, Chadeau-Hyam M. Dynamics of smoking-induced genome-wide methylation changes with time since smoking cessation. *Hum Mol Genet*. 2015 Apr 15; 24(8):2349-59.

Guo, NL, Wan YW, Denvir J, Porter DW, Pacurari M, Wolfarth MG, Castranova V, and Qian Y. Multiwalled carbon nanotube-induced gene signatures in the mouse lung: potential predictive value for human lung cancer risk and prognosis. *J Toxicol Environ Health A*, 2012; 75: 1129-53.

Hansen KD, Timp W, Bravo HC, Sabunciyan S, Langmead B, McDonald OG, Wen B, Wu H, Liu Y, Diep D, Briem E, Zhang K, Irizarry RA, Feinberg AP. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet* 2011; 43(8):768-775.

Herceg Z, Lambert MP, van Veldhoven K, Demetriou C, Vineis P, Smith MT, Straif K, Wild CP. Towards incorporating epigenetic mechanisms into carcinogen identification and evaluation. *Carcinogenesis* 2013; 34(9):1955-1967.

Hernandez-Vargas H, Lambert MP, Le Calvez-Kelm F, Gouysse G, McKay-Chopin S, Tavtighian SV, Scoazec JY, Herceg Z. Hepatocellular carcinoma displays distinct DNA methylation signatures with potential as clinical predictors. *PLoS ONE* 2010; 5(3):e9749.

Hubers AJ, van der Drift MA, Prinsen CF, Witte BI, Wang Y, Shivapurkar N, Stastny V, Bolijn AS, Hol BE, Feng Z, Dekhuijzen PN, Gazdar AF, Thunnissen E. Methylation analysis in spontaneous sputum for lung cancer diagnosis. *Lung Cancer*. 2014 May;84(2):127-33.

Husgafvel-Pursiainen K. mechanistic considerations for air pollution and lung cancer: genotoxicity and molecular biomarker data from experimental and human studies. In: Straiff K, Cohen A, Samet J (Eds). *Air pollution and cancer*. IARC Scientific Publications vol. 161. IARC, Lyon, France, 2013. (ePublication).

IARC. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. A review of human carcinogens. Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts. Vol 100 C. IARC, Lyon, France, 2012.

Jaffe AE, Murakami P, Lee H, Leek JT, Fallin MD, Feinberg AP, Irizarry RA. Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. *Int J Epidemiol* 2012; 41(1):200-209.

Jarmalaite S, Kannio A, Anttila S, Lazutka JR, Husgafvel-Pursiainen K. Aberrant p16 promoter methylation in smokers and former smokers with nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003; 106(6):913-18.

Kane AB, and Hurt RH. Nanotoxicology: the asbestos analogy revisited. *Nat Nanotechnol*, 3(7): p. 378-9 2008.

Karjalainen A, Anttila S. Asbestos exposure and the risk of lung cancer in urban populations. In: Cheremisinoff P (Ed.), *Health and Toxicology, Advances in Environmental Control Technology Series*. Houston, USA, 1997, p. 127-136.

Kettunen E, Hernandez-Vargas H, Cros MP, Durand G, Le Calvez-Kelm F, Wolff H, Salmenkivi K, Anttila S, Herceg Z, Husgafvel-Pursiainen K. Epigenome-wide DNA methylation profiling of lung tumors from asbestos-exposed patients. *Intl Conference on Monitoring and Surveillance of Asbestos-related Diseases, Helsinki Asbestos 2014*, Espoo, Finland. 11.-13.2.2014. Programme and Abstracts. FIOH Helsinki.

Kettunen E, Hernandez-Vargas H, Cros MP, Durand G, Le Calvez-Kelm F, Wolff H, Salmenkivi K, Anttila S, Herceg Z, Husgafvel-Pursiainen K. Epigenome-wide DNA methylation profiling of lung tumors from asbestos-exposed patients. *Proceedings Vol 56, April 2015, AACR Annual meeting Philadelphia, USA*.

Langevin SM, Kratzke RA, Kelsey KT. Epigenetics of lung cancer. *Transl Res*. 2015 Jan; 165(1):74-90.

Lay FD, Liu Y, Kelly TK, Witt H, Farnham PJ, Jones PA, Berman BP. The role of DNA methylation in directing the functional organization of the cancer epigenome. *Genome Res* 2015; 25(4):467-477.

Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* 2012; 28(6):882-883.

Leng S, Liu Y, Weissfeld JL, Thomas CL, Han Y, Picchi MA, Edlund CK, Willink RP, Gaither Davis AL, Do KC, Nukui T, Zhang X, Burki EA, Van Den Berg D, Romkes M, Gauderman WJ, Crowell RE, Tesfaigzi Y, Stidley CA, Amos CI, Siegfried JM, Gilliland FD, Belinsky SA. 15q12 variants, sputum gene promoter hypermethylation, and lung cancer risk: a GWAS in smokers. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Feb 23; 107(5). pii: djv035. doi: 10.1093/jnci/djv035.

Liloglou T, Bediaga NG, Brown BR, Field JK, Davies MP. 2014. Epigenetic biomarkers in lung cancer. *Cancer Lett* 2014; 342(2):200-212.

Lu X, Miousse IR, Pirela SV, Melnyk S, Koturbash I, Demokritou P. Short-term exposure to engineered nanomaterials affects cellular epigenome. *Nanotoxicology* 2015; May 4:1-11. [Epub ahead of print].

McCormack V, Peto J, Byrnes G, Straif K, Boffetta P. Estimating the asbestos-related lung cancer burden from mesothelioma mortality. *Br J Cancer* 2012; 106(3): p. 575-84.

Mossman BT, Lippmann M, Hesterberg TW, Kelsey KT, Barchowsky A, Bonner JC. Pulmonary endpoints (lung carcinomas and asbestosis) following inhalation exposure to asbestos. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2011; 14(1-4): 76-121.

Nagai H, Toyokuni S. Differences and similarities between carbon nanotubes and asbestos fibers during mesothelial carcinogenesis: Shedding light on fiber entry mechanism. *Cancer Sci* 2012; 103 (8): 1378–1390.

Oksa P, Wolff H, Vehmas T, Pallasaho P, Frilander H. (Eds.). *Asbestos, Asbestosis, and cancer. Helsinki Criteria for Diagnosis and Attribution* 2014. Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki, 2014.

Phipson B, Oshlack A. DiffVar: a new method for detecting differential variability with application to methylation in cancer and aging. *Genome Biol* 2014; 15(9):465.

Rittinghausen S, Hackbarth A, Creutzenberg O, Ernst H, Heinrich U, Leonhardt A, Schaudien D. The carcinogenic effect of various multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) after intraperitoneal injection in rats. *Particle Fibre Toxicology* 2014; 11:59 doi:10.1186/s12989-014-0059-z.

Roggli VL, Anttila S, Kane AB, Inai K, Wolff H. Pathology and biomarkers. In: Oksa P, Wolff H, Vehmas T, Pallasaho P, Frilander H (Eds.). *Asbestos, asbestosis and cancer - Helsinki Criteria for diagnosis and attribution*. Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki, 2014, p 123-151.

Rushton L, Hutchings S, Brown T. The burden of cancer at work: estimation as the first step to prevention. *Occup Environ Med* 2008; 65:789–800.

Sandoval J, Mendez-Gonzalez J, Nadal E, Chen G, Carmona FJ, Sayols S, Moran S, Heyn H, Vizoso M, Gomez A, Sanchez-Cespedes M, Assenov Y, Müller F, Bock C, Taron M, Mora J, Muscarella LA, Liloglou T, Davies M, Pollan M, Pajares MJ, Torre W, Montuenga LM, Brambilla E, Field JK, Roz L, Lo Iacono M, Scagliotti GV, Rosell R, Beer DG, Esteller M. A prognostic DNA methylation signature for stage I non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 10; 31(32):4140-7.

Schmidt B, Liebenberg V, Dietrich D, Schlegel T, Kneip C, Seegebarth A, Flemming N, Seemann S, Distler J, Lewin J, Tetzner R, Weickmann S, Wille U, Liloglou T, Raji O, Walshaw M, Fleischhacker M, Witt C, Field JK. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer based on bronchial aspirates. *BMC Cancer*. 2010 Nov 3; 10:600. doi: 10.1186/1471-2407-10-600.

Shen H, Laird PW. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell*. 2013 Mar 28; 153(1):38-55.

Shivapurkar N, Gazdar AF. DNA methylation based biomarkers in non-invasive cancer screening. *Curr Mol Med* 2010; 10(2):123-132.

Slieker RC, Bos SD, Goeman JJ, Bovee JV, Talens RP, van der Breggen R, Suchiman HE, Lameijer EW, Putter H, van den Akker EB, Zhang Y, Jukema JW, Slagboom PE, Meulenbelt I, Heijmans BT. Identification and systematic annotation of tissue-specific differentially methylated regions using the Illumina 450k array. *Epigenetics Chromatin* 2013; 6(1):26.

Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; 3: Article3.

Straif K, Benbrahim-Tallaa L, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglianò V. A review of human carcinogens--part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *Lancet Oncol* 2009; 10(5):453-454.

Teschendorff AE, Marabita F, Lechner M, Bartlett T, Tegner J, Gomez-Cabrero D, Beck S. A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. *Bioinformatics* 2013; 29(2):189-196.

Vandermeers F, Neelature Sriramareddy S, Costa C, Hubaux R, Cosse JP, Willems L. The role of epigenetics in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer*. 2013 Sep;81(3):311-8.

Wild CP, Scalbert A, Herceg Z. Measuring the exposome: A powerful basis for evaluating environmental exposures and cancer risk. *Environ Mol Mutagen* 2013; 54(7):480-499.

Yao L, Shen H, Laird PW, Farnham PJ, Berman BP. Inferring regulatory element landscapes and transcription factor networks from cancer methylomes. *Genome Biology* 2015; 16:105, doi: 10.1186/s13059-015-0668-3.

## 8 LIITTEET

Liite 1. Taulukot 1 ja 2. Tutkitut tapaukset ja heidän taustatietonsa

Liite 2. Tieteelliset julkaisut ja kongressiabstractit

Liite 3. Tutkimustuloksista julkaistut kongressiabstractit

## 8.1 Liite 1. Taulukot 1 ja 2. Tutkitut tapaukset ja heidän taustatietonsa



Taulukko 1. Tutkittujen keuhkosityöpätapausten ikä, asbestikuitualtistumis- ja kliiniset tiedot (kaikki miehiä).

Tapaus- nro	Ikä <sup>1</sup> (v)	Asbestialt. (työhisto- ria) <sup>2</sup>	Asbestikuitu- pitoisuus (SEM) <sup>3</sup>	Tupa- kointi <sup>4</sup>	Pakka- vuodet <sup>5</sup>	Keuhkosityöpa		
						Levinn. <sup>6</sup>	Eri- laist. <sup>7</sup>	Solut. <sup>8</sup>
<b>Keuhkosityöpätapaukset, joilla ei asbestialtistumista</b>								
1	55	3	0	tup	36	IB	III	AC
2	54	2	0	tup	ET	IA	ET	AC
3	69	3	0	tup	47	IV	III	AC
4	70	4	0	aik	38	IB	III	AC
5	65	4	0	aik	52	IV	III	AC
6	67	4	0	tup	50	IA	II	AC
7	55	3	0,1	aik	54	IA	III	AC
8	41	3	0	aik	31	IV	III	AC-SCC
9	50	4	0	tup	35	IIIA	III	SCC
10	64	3	0	tup	45	I	III	SCC
11	58	2	0	aik	37	IB	II	SCC
12	67	3	0	aik	47	IB	II	SCC
13	72	3	0,5	aik	36	IIA	ET	LCLC
14	64	3	0	tup	66	IIIA	IV	SCLC
	60,8 (40-71) Keskiarvo (vaihteluväli)		0,0 (0-0,5) Mediaani (vaihteluväli)		44 ± 10 Keskiarvo (± keski- hajonta)			
<b>Keuhkosityöpätapaukset, joilla työperäinen asbestialtistuminen</b>								
15	79	2	7,8	ET	ET	IB	II	AC
16	59	2	12,6	tup	105	IB	III	AC
17	64	1	72,9	aik	33	IB	I	AC
18	65	1	10,8	aik	23	IIA	II	AC
19	65	2	9,4	tup	25	IIIA	III	AC
20	59	1	35,0	aik	36	IIIA	II	AC
21	64	1	145	aik	22	IV	III	AC-SCC
22	65	1	5,9	tup	32	IB	III	SCC
23	63	2	10,8	aik	27	IB	II	SCC
24	57	1	6,6	aik	36	IIIB	III	SCC
25	66	1	19,0	aik	35	IB	III	LCLC
26	58	1	90	tup	65	IB	III	LCLC
27	63	2	8,4	aik	20	IIIA	ET	LCLC
28	62	1	12,8	tup	55	IV	IV	SCLC
	63,5 (57-78) Keskiarvo		11,7 (5,9-145)		40 ± 24 Keskiarvo			

(vaihteluväli)	Mediaani (vaihteluväli)	(± keski- hajonta)
----------------	----------------------------	-----------------------

<sup>1</sup>Ikä leikkaushetkellä; <sup>2</sup>Asbestialtistuminen arvioituna työhistorian perusteella perustuen henkilökohtaiseen tutkimushaastatteluun ja työhygieenikon arviointiin: 1, varma; 2, todennäköinen; 3, mahdollinen; 4 epätodennäköinen. <sup>3</sup>Keuhkokudoksen asbestikuitumäärät määritettynä pyyhkäisyelektronimikroskoopilla (SEM): kuituja grammaa kuivaa keuhkokudosta kohti (miljoonia) (määritysraja ~ < 0.1 million f/g). <sup>4</sup>tup, tupakoiva; aik, lopettanut, tupakoinut aikaisemmin; <sup>5</sup>Pakkavuosi= laskennallinen vuosi, jona aikana tupakoinut keskimäärin 20 savuketta päivässä; <sup>6</sup>Syövän levinneisyysaste (stage), I-IV; <sup>7</sup>Syöpäkudoksen erilaistumisaste (gradus), I-IV; <sup>8</sup>Keuhkosyövän solutyypit (histologia): AC, adenokarsinoma; SCC, levyepiteelikarsinoma; AC-SCC, adeno-levyepiteelikarsinoma; SCLC, pienisoluisen karsinoma; LCLC, suurisoluisen karsinoma. ET, ei tietoa.

Taulukko 2. Tutkittujen kontrollitapausten (muu keuhkovaiva kuin syöpä) ikä, asbestikuituallistumis- ja tupakointitiedot (normaali-keuhkokudosnäyte tutkittu). Kaikki kontrollitapaukset miehiä.

Tapaus- nro	Ikä <sup>1</sup> (v)	Asbestialt. (työhistoria) <sup>22</sup>	Asbestikuitu- pitoisuus (SEM) <sup>3</sup>	Tupakointi <sup>4</sup>	Pakka- vuodet <sup>5</sup>	Keuhkoku- dos <sup>6</sup>
32	66	3	0	aik	23	Norm
29	58	3	0,9	tup	46	Norm
30	67	2	3,0	aik	31	Norm
31	56	2	2,8	tup	48	Norm
33	68	ET	ET	tup	ET	Norm
34	32	ET	ET	aik	ET	Norm
57,8 (32-68) Keskiarvo (vaihteluväli)			1,9 (0-1,9) Mediaani (vaihteluväli)		38 ± 11 Keskiarvo (± keskivirhe)	

<sup>1</sup>Ikä leikkaushetkellä, vuosia; <sup>2</sup>Asbestialtistuminen arvioituna työhistorian perusteella perustuen henkilökohtaiseen tutkimushaastatteluun ja työhygieenikon arviointiin: 1, varma; 2, todennäköinen; 3, mahdollinen; 4 epätodennäköinen. <sup>3</sup>Keuhkokudoksen asbestikuitumäärät määritettynä pyyhkäisyelektronimikroskoopilla (SEM): kuituja grammaa kuivaa keuhkokudosta kohti (miljoonia) (määritysraja ~ < 0.1 million f/g). <sup>4</sup>tup, tupakoiva; aik, lopettanut, tupakoinut aikaisemmin; <sup>5</sup>Pakkavuosi = laskennallinen vuosi, jona aikana tupakoinut keskimäärin 20 savuketta päivässä; <sup>6</sup>Norm, keuhkokudos normaali patologin mikroskooppisen tutkimuksen perusteella. ET, ei tietoa.

## 8.2 Liite 2. Tieteelliset julkaisut ja kongressiabstractit

### Julkaisut

Sarhadi VK, Lahti L, Scheinin I, Ellonen P, Kettunen E, Serra M, Scotlandi K, Picci P, Knuutila S. Copy number alterations and neoplasia-specific mutations in MELK, PDCD1LG2, TLN1, and PAX5 at 9p in different neoplasias. *Genes Chromosomes Cancer*. Epub 2014, Mar 24. 2014 53(7):579-88. doi: 10.1002/gcc.22168.

Kettunen E & Knuutila S. Malignant mesothelioma (molecular markers). *Clinical and Pathological Features, Assessment and Diagnosis*. (Invited contribution). In: Anttila S & Boffetta P (Eds), *Occupational Cancers*. Springer-Verlag, London, 2014.

Nymark P, Kettunen E & Knuutila S. Tumor of the lung. (Invited contribution). In: Heim S & Mitelman F (Eds), *Cancer Cytogenetics*, 4th edition. Wiley. In press, 2015.

Husgafvel-Pursiainen K, Carton M, Luce D, Wolff H, Holmila R, Schlünssen V, Bornholdt J, Hansen J. Sinonasal cancer. In: Anttila S, Boffetta P (Eds.). *Occupational Cancers*. Springer-Verlag, London, 2014. pp. 139-168.

Husgafvel-Pursiainen K. Human molecular biomarker studies: mechanistic considerations for air pollution and lung cancer. *Air Pollution and Cancer*. IARC Scientific Publications 161; 159-201 [eBook]. International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. 2013.

Mäki-Nevala S, Sarhadi VK, Knuutila A, Scheinin I, Ellonen P, Lagström S, Rönty M, Kettunen E, Husgafvel-Pursiainen K, Wolff H and Knuutila S. Driver gene and novel mutations in asbestos-exposed lung adenocarcinoma and malignant mesothelioma detected by exome sequencing. Submitted.

### Kongressiabstractit

Kettunen E, Hernandez-Vargas H, Cros MP, Durand G, Le Calvez-Kelm F, Wolff H, Salmenkivi K, Anttila S, Herceg Z, Husgafvel-Pursiainen K. Epigenome-wide DNA methylation profiling of lung tumors from asbestos-exposed patients. *Intl Conference on Monitoring and Surveillance of Asbestos-Related Diseases*, Helsinki Asbestos 2014, Espoo, Finland. 11.-13.2.2014. Programme and Abstracts, p. 38. Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki.

Mäki-Nevala S, Sarhadi V, Scheinin I, Pekka Ellonen P, Rönty M, Knuutila A, Kettunen E, Husgafvel-Pursiainen K, Wolff H, Knuutila S. Exome sequencing reveals novel recurrent mutations in asbestos-exposed lung adenocarcinoma and malignant mesothelioma. *Meeting of International Mesothelioma Interest Group*, Cape Town, Oct. 2014. (Abstract).

Kettunen E, Hernandez-Vargas H, Cros MP, Durand G, Le Calvez-Kelm F, Wolff H, Salmenkivi K, Anttila S, Herceg Z, Husgafvel-Pursiainen K. Epigenome-wide DNA methylation profiling of lung tumors from asbestos-exposed patients. AACR Annual Meeting 2015, April 2015, Philadelphia, USA. AACR Annual Meeting 2015 Proceedings Vol 56, abstract #1060.

### 8.3 Liite 3. Tutkimuksen tuloksista raportoidut kongressiabstractit

*International Conference on Monitoring and Surveillance of Asbestos-Related Diseases, Helsinki Asbestos 2014, Hanasaari Cultural Centre, Espoo, Finland 11.-13.2.2014. Abstract. (Programme and Abstracts, p.38. Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki).*

*(Oral presentation)*

## **Epigenome-wide DNA methylation profiling of lung tumors from asbestos-exposed patients**

Kettunen E<sup>1</sup>, Hernandez-Vargas H<sup>2</sup>, Cros MP<sup>2</sup>, Durand G<sup>3</sup>, Le Calvez-Kelm F<sup>3</sup>, Wolff H<sup>1</sup>, Salmenkivi K<sup>4</sup>, Anttila S<sup>1,4</sup>, Herceg Z<sup>2</sup>, Husgafvel-Pursiainen K<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Systems Toxicology, Health and Work Ability, Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki, Finland

<sup>2</sup>Epigenetics Group and <sup>3</sup>Genetic Cancer Susceptibility Group, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

<sup>4</sup>Department of Pathology, HUSLAB, Helsinki University Central Hospital, HUS, Finland

**Introduction and objectives.** Epigenomic variation can produce different phenotypes from the same genotype. Epigenetic modifications such as DNA methylation have emerged as one of the major mechanisms in multiple human diseases, including exposure-related lung cancer. However, not much is known about the role of epigenetics in human lung carcinogenesis associated with asbestos exposure.

In our long-term research to better understand molecular mechanisms of fiber-related human carcinogenesis, we have focused on lung cancer from asbestos-exposed and non-exposed patients who were mostly smokers. In the current work, we explore the epigenome-wide DNA methylation (DNA methylome) patterns in lung tumors to reveal methylation markers in association with exposure, lung cancer pathology, or clinical features.

**Study design, subjects, and methods.** DNA methylome was studied in lung tumors and adjacent normal lung as matched pairs obtained from 28 patients from lung surgery in Helsinki during years 1988-1996. Data on the patients' work history and pulmonary fiber counts were available. Fourteen patients had been exposed to asbestos and fourteen were non-exposed. As controls, leucocyte DNA samples as well as normal lung specimens from patients with non-malignant lung disease were studied for genome-wide DNA methylation. The DNA methylome was examined at IARC by Illumina Infinium 450K HumanMethylation technology covering more than 450 000 CpG sites. Validation experiments were done by pyrosequencing at FIOH.

**Results.** Preliminary data analysis indicates that DNA methylation profiles differed in relation to sample type, tumor histology, and exposure status. DNA leucocytes exhibited a pattern of DNA methylation that clearly differed from the rest of samples. Significantly differential methylation was observed at 7.7% of the CpG loci between lung tumors and normal lung from non-malignant lung disease patients whereas 1.5% of the CpG sites showed significantly differential methylation ( $p < 0.001$ ) between lung tumors and adjacent normal lung. Distinct groups of genes showed hypomethylation in lung tumor tissue from asbestos-exposed cases as compared to non-exposed lung tumor tissue.

**Discussion and conclusions.** Our preliminary analysis indicates that DNA methylation patterns showed tissue specificity and that significantly differential methylation in tumor vs. normal lung was more pronounced among normal lung from non-malignant lung disease patients than among adjacent normal lung. Differential methylation of distinct genes showed linkage to patients' exposure status.



*American Association for Cancer Research, AACR Annual Meeting 2015, 18.4.-22.4.2015, Philadelphia, USA. (AACR Annual Meeting 2015, Proceedings Vol 56, abstract #1060).*

*(Poster presentation).*

## **Epigenome-wide DNA methylation profiling of lung tumors from asbestos-exposed patients**

Short: DNA methylation in lung tumors

Eeva Kettunen<sup>1</sup>, Hector Hernandez-Vargas<sup>2</sup>, Marie-Pierre Cros<sup>2</sup>, Geoffroy Durand<sup>3</sup>, Florence Le Calvez-Kelm<sup>3</sup>, Henrik Wolff<sup>1</sup>, Kaisa Salmenkivi<sup>4</sup>, Sisko Anttila<sup>1,4</sup>, Zdenko Herceg<sup>2</sup>, Kirsti Husgafvel-Pursiainen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Systems Toxicology, Health and Work Ability, Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki, Finland

<sup>2</sup>Epigenetics Group and <sup>3</sup>Genetic Cancer Susceptibility Group, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

<sup>4</sup>Department of Pathology, HUSLAB, Helsinki University Central Hospital, P.O. Box 400, 00029 HUS, Finland

### **Introduction and objectives.**

Epigenetic modifications such as changes in DNA methylation have been shown as response to many toxic exposures. However, not much is known about the role of epigenetics in human lung carcinogenesis associated with asbestos exposure. Here, we explored the epigenome-wide DNA methylation (DNA methylome) patterns in lung tumors focused on asbestos-exposed and non-exposed patients who were mostly smokers. We sought to investigate whether methylation markers in lung cancer associate with exposure (asbestos, tobacco smoke) and clinico-pathological features.

### **Study design, subjects, and methods.**

The DNA methylome was examined by Illumina Infinium 450K HumanMethylation technology covering more than 450 000 CpG sites. Validation experiments were done by pyrosequencing. DNA methylation was studied in lung tumors and normal lung as matched pairs obtained from 28 patients from lung surgery in Helsinki during years 1988-1996. Detailed data on the patients' work and smoking histories, pulmonary fiber counts (14 asbestos-exposed and 14 non-exposed), and clinical data were available. As controls, normal lung specimens from patients with non-malignant lung disease were studied for genome-wide DNA methylation.

### **Results.**

DNA methylation profiles differed in relation to sample type, tumor histology and exposure status. We identified more than 10.000 methylation variable positions (MVPs) that differed (adjusted  $P < 0.05$ ) between lung tumors and matched normal lung. Differential methylation in 14 MVPs were significantly associated with asbestos exposure in lung tumor tissue whereas more than 100 MVPs were suggested as smoking-related. Differential methylation of genes such as those involved in cell stress and

inflammation, cellular energy and lipid metabolism, and protein degradation processes were observed in lung tumors.

**Conclusions.**

Our analysis suggests that methylation profiles were globally affected in lung tumors in comparison to matched normal lung. We also found associations to asbestos exposure and tobacco smoking, suggesting a role for these exposures in modification of DNA methylome profiles.

Asbesti on merkittävin keuhkosityöpää aiheuttava työperäinen altiste; tutkimusten mukaan se aiheuttaa noin 8-20 % kaikista keuhkosityöpäkuolemista, riippuen mm. kuitutyypistä ja altistumisen määrästä. Huolimatta merkittävistä kuolleisuusluvuista ja pitävästi osoitetusta syy-yhteydestä asbestikuitualtistumiseen tunnetaan asbestisairauksien syntymekanismit huonosti. Asbestiin liittyvää keuhkosityöpää tämä koskee erityisesti: molekyyllitason muutoksia ja syöpäkasvuun liittyviä signaalireittejä soluissa tunnetaan tuskin lainkaan.

Tässä raportoitu tutkimus tuotti uutta, koko genomin kattavaa tietoa epigeneettisistä (DNA-metylaation) muutoksista asbestikuitualtistumiseen liittyvässä keuhkosityövässä. Tulokset täydentävät aikaisempaa tietoa asbestialtistumiseen liittyvän syövän kehittämisessä vaikuttavista molekyyllitason mekanismeista. On todennäköistä, että tutkimuksessa saatu tieto palvelee osaltaan myös muihin kuitumaisiin altisteisiin liittyvien syntymekanismien (ns. kuitukarsinogeneesin) selvittämistä.

**Työterveyslaitos**  
**Arbetshälsoinstitutet**  
**Finnish Institute of Occupational Health**

Topeliuksenkatu 41 a A, 00250 Helsinki

**www.ttl.fi**

ISBN 978-952-261-570-1 (nid.)  
ISBN 978-952-261-571-8 (PDF)



**Työterveyslaitos** | Arbetshälsoinstitutet  
Finnish Institute of Occupational Health



**Työsuojelurahasto**  
Arbetskyddsfonden  
The Finnish Work Environment Fund