



The clinical use of genetic analyses in colorectal cancer

Susanne Tumlin Ekelund

Bitr. Överläkare, Kir Klin, Södersjukhuset

Disputationsdatum: 16 december, 2011

Huvudhandledare: Med dr Hans Olivecrona KI-SöS.

Bihandledare: Med dr Ulrik Lindfors KI CMM och Doc Stefan Linder KI SöS.

Opponent: Prof Bengt Gustavsson Sahlgrenska, Göteborg.

Betygsnämnd: Doc Jan-Erik Frödin KI, Doc Birger Pålsson Lunds universitet, Med dr Louise Nordfors KI.

Bakgrund

Kolorektal cancer (CRC) drabbar ca 6000 individer/år i Sverige. Mortaliteten är nästan 50% totalt sett, men beror mycket på vilket stadium patienten har när tumören upptäcks. Stadiindelningen baseras på TNM-klassifikationen, där lymfkörtelmetastaser finns i stadium III men inte i stadium II. 5-årsöverlevnad för patienter med stadium II brukar anges till ca 75% och för stadium III ca 40%. De flesta patienter med stadium III erbjuds adjuvant cytostatikabehandling. Även om den mikroskopiska bedömningen utvecklats betydligt, går det inte med dagens metoder att säkert identifiera de patienter i stadium II med sämst prognos, dvs. en prognos lika dålig som den generella i stadium III, som därmed sannolikt skulle ha nytta av adjuvant behandling.

Tumörbiologin är komplex, men man vet att förluster av tumörsuppressorgener uttryck samt ökat uttryck av olika onkogener successivt leder till cancerutveckling. Många olika mekanismer i neoplasier ger minskat eller ökat genuttryck: förlust av kromosomdelar, metylering av gener och punktmutationer. Dessutom påverkar mikroRNA genuttrycket posttranskriptionellt genom att binda till mRNA (messenger-RNA). Man har ännu inte kunnat fastställa vilka typer av genetiska förändringar som har störst betydelse för den enskilda patienten med CRC.

Denna avhandling baseras på fyra arbeten där målsättningen var att identifiera genetiska förändringar i CRC-tumörer, som skulle kunna användas för en säkrare och mer individuell prognostisering, och därmed behandling, av CRC.

Arbete 1

Vid alla genetiska undersökningar som baseras på biopsier är det viktigt att materialet är representativt. Tumörmorfologin är heterogen och olika genetiska förändringar

kan slumpartat påverkas av hur och var biopsierna tas.

I denna första studie ville vi undersöka hur vanligt förekommande vissa speciellt intressanta genetiska förändringar är i en tumör och om tumören var tillräckligt homogen för att ett fåtal biopsier ska ge en rättvisande bild. Vanligen tas 1–3 biopsier i kliniska studier.

Tumörer från 17 konsekutiva patienter med CRC studerades. Alla tumörer delades upp i ca 3 mm stora "kuber" och analyserades var för sig. PCR-baserade tekniker användes och vi undersökte förekomsten av loss of heterozygosity (LOH) på kromosom 5q, 17p och 18q, microsatellit instabilitet (MI), punktmutation på K-ras oncogenen, samt om det förelåg metylering av generna p16 och MGMT. Alla dessa genetiska förändringar har tidigare visats förekomma i CRC och bedömts vara viktiga för tumörprogression och prognos.

Resultatet visade att LOH och MI existerade i alla 17 tumörer men i starkt varierande grad. Även metylering av p16 och MGMT kunde detekteras i nästan alla tumörer och även här i varierande grad.

K-rasmutationer distribuerades på ett annat sätt, i de fall där mutationen detekterades fann man den i alla bitar eller så fanns mutationen inte alls (fig 1).

Resultatet ger stöd åt att en eller ett fåtal biopsier ger en sann bild av förekomsten av eventuell K-rasmutation i en enskild tumör. Detta talar för att mutationen uppkommer relativt tidigt i förloppet och sedan bibehålls i de fall den förkommer. Det är viktigt att veta att vi kan lita på biopsierna, då man har visat att onkologisk behandling med anti-EGFR-preparat (t.ex. Erbitux) endast har effekt om patienten har normal, icke-muterad K-ras-gen. Studien visar att prognostiska studier avseende framför allt LOH, men även metylering av p16 och MGMT- ➤

Patient #	K-ras/total	Metylerad p16/total	Metylerad MGMT/total
1	0/25	11/25	25/25
2	23/23	25/25	0/25
3	0/27	15/19	18/20
4	0/20	16/20	16/20
5	1/20	9/20	5/20
6	0/33	12/19	1/19
7	0/22	21/21	3/21
8	15/17	18/19	13/18
9	0/23	19/19	17/19
10	17/17	19/19	5/19
11	0/27	4/20	19/20
12	17/18	17/17	12/13
13	26/26	1/19	0/19
14	0/20	19/20	18/20
15	0/30	0/20	19/20
16	19/19	8/20	0/20
17	20/20	9/20	17/20

Figur 1. Andel biopsier positiva för K-rasmutation, p16-metylering resp MGMT-metylering.

genen, sannolikt har begränsat värde, eftersom de förekommer i stort sett i alla tumörer men ytterst heterogent och i starkt varierande täthet utefter tumörmassan.

Arbete 2

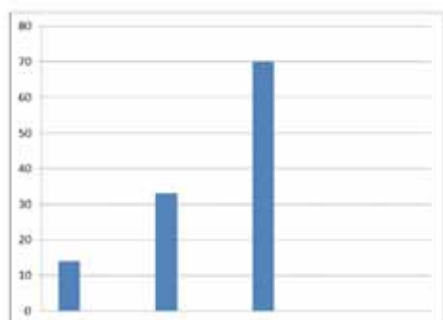
I samband med CRC-kirurgi är lymfkörtelundersökningen viktig. I stadium II, dvs. hos patienter med samtliga lymfkörtlar mikroskopiskt fria, är 5-årsmortaliteten 25%. I denna studie ville vi se om vi kunde detektera K-ras-mutationer i mikroskopiskt sett ”friska” lymfkörtlar och på så vis påvisa ett samband mellan molekylärbio-logiskt påvisad mikrometastaser och försämrad prognos.

99 konsekutiva patienter med CRC stadium II inkluderades i studien. Paraffinerade preparat undersöktes åter mikroskopiskt, och med ledning av mikroskopin preparerades vävnad fram för analys. K-rasmutationer detekterades med hjälp av PCR och TGGE (temperature gradient gel electrophoresis).

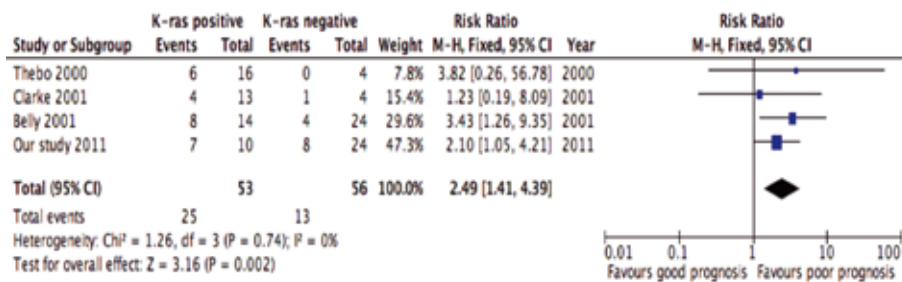
Trots tillgång till flera hundra patienter i inledningsskedet visade det sig att endast 99 kunde analyseras adekvat (frånvaro av relevanta lymfkörtelpreparat, pH instabilitet etc.), varför materialet i studien kom att bli relativt litet. Efter genomgång av litteraturliteraturdata med specifik frågeställning kring K-ras-positivitet i lymfkörtlar vid CRC utfördes en metaanalys.

K-rasmutation kunde ses i 34% av tumörerna (34 patienter). 10 av dessa tumörpositiva patienter hade även K-rasmutationen i lymfkörtlarna och av de patienterna återföll 7 st (70%) i sjukdomen. Av de 24 med mutation i tumören som inte hade positiva lymfkörtlar återföll 8 st (33%) (fig 2). Skillnaden var dock inte signifikant (p=0,07). En metaanalys av våra resultat tillsammans med tidigare arbeten visade att riskökningen var 2,5 gånger för återfall i sjukdomen om lymfkörtlar var K-raspositiva (fig 3).

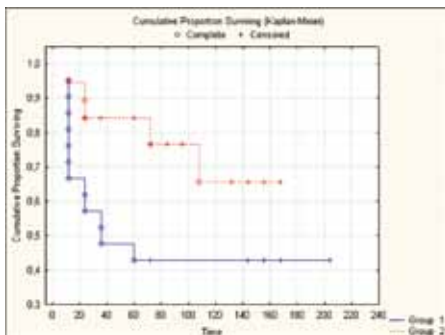
% Recidiv



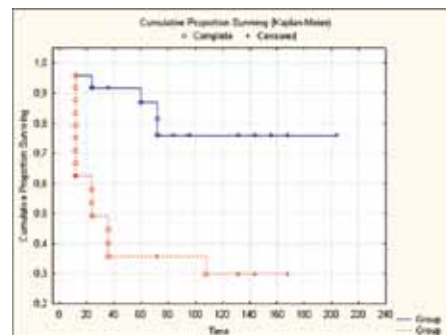
Figur 2. Recidivrisk i förhållande till K-ras. Stapel 1: Tumör neg+ lgl neg. Stapel 2: Tumör pos+ lgl neg. Stapel 3: Tumör pos+ lgl pos.



Figur 3. Tree plot för metaanalysen av K-raspositiva/negativa lymfkörtlar och risken för återfall.



Figur 4. Kaplan-Meierkurva för hög (röd) respektive låg (blå) miR-133b-nivå.



Figur 5. Kaplan-Meier kurva för hög (röd) respektive låg (blå) miR-185 nivå.

Arbete 3

MikroRNA är en kort, icke kodande RNA-sekvens som påverkar genexpressionen genom att klyva eller hämma translationen av mRNA. De senaste åren har man visat att nivåerna av olika mikroRNA i tumörvävnad är förändrade jämfört med i normal vävnad. Vi ville undersöka förekomsten och nivåerna av olika mikroRNA i tumörvävnad och sedan försöka korrelera det till prognos.

55 patienter med CRC och med kända behandlingsresultat ingick i studien. 5 patienter med lång överlevnad och 5 patienter med lång överlevnad valdes för en initial mikroRNA-profiler. Av ca 700 undersökta mikroRNA användas i denna screening valdes 7 stycken intressanta mikroRNA (miR-185, miR-615-5p, miR-133b, miR-892b, miR320b, miR-663b och miR-21) som studerades på alla 50 patienters tumörer.

Vi fann att miR-185 hade signifikant högre nivåer och miR-133b signifikant lägre nivåer hos de patienter som haft sämst överlevnad (fig 4, 5). Övriga undersökta mikroRNA var icke signifikant korrelerade till prognos. MiR-185 och miR-133b är således presumtiva tumörprognosmarkörer.

Arbete 4

MikroRNA kan förutom i vävnad även detekteras i blod och är stabila under lång

Patient	mir133	mir185	mir21
1	0.00344	0.01613	0.13034
2	-0.00297	-0.00001	0.02366
3	-0.13394	-0.06222	0.10808
4	0.01977	0.05336	0.41261
5	0.01026	0.01266	-0.59313
6	-0.00044	-0.01655	-0.13388
7	-0.00108	-0.0233	-0.15427
8	0.01186	0.06856	0.09316
9	-0.00496	-0.00327	0.03766
10	-0.01956	-0.00708	-0.12193
11	0.08208	-0.01697	-0.11709
12	-1.1135	-0.26493	0.14064
13	-0.41871	-1.25967	0.085387
14	0	0.18468	0.58976
15	0	0.128729	0.113096
16	0	0.037872	0.03096
17	0	-0.57776	-0.05061

Wilcoxon's signed-rank test p-values: p=0.027 p=0.712 p=0.517

Figur 6. Förändringen i miR-nivåer före och efter operation, där röd markering innebär sjunkande nivåer och grön stigande nivåer efter operation.

tid. Vi ville se om de två mikroRNA (miR) vi i arbete 3 kunde korrelera till prognos i tumörvävnad, även kunde detekteras och användas i prognostiskt syfte i blodprover. Vi studerade även miR-21 som man i flera studier visat vara av prognostiskt värde. Vi ville också se om miR-nivåerna av dessa förmodat tumörberoende, potentiella serummarkörer, ändras i blodprovet före och efter radikal kirurgi.

16 patienter med CRC och en patient med adenom ingick i studien. Serum togs före operation och 30 dagar efter operation.

Inga signifikanta skillnader kunde ses i förhållande till patienternas prognos. Nivåerna av miR-133b sjönk signifikant efter operation, men nivåerna av miR-21 och miR-185 visade inte entydiga skillnader (fig 6). miR-21 uppvisade en trend att stiga efter operation, vilket kan tala för att miR-21 stiger av den inflammatoriska responsen och läkningsförloppet efter kirurgi och därmed stör tolkningen av denna markör i tumörprognostiska analyser.

Sammanfattning:

K-ras-mutationer är jämnt fördelade i CRC-tumörer vilket talar för att om de existerar kommer tidigt i tumörutvecklingen och att de är lämpliga biomarkörer baserat på biopsier till skillnad från många andra genetiska avvikelser.

LOH 5q, LOH 17p, LOH 18q, metylering

av MGMT och p16 är ojämnt distribuerade i CRC-tumörer och därmed av begränsat värde som prognostisk biomarkörer.

Mutationer i K-ras kan detekteras i histologiskt sett friska lymfkörtlar och indikerar då en sämre prognos. Detta skulle om det verifieras i större material, och med fler markörer, kunna få stor betydelse för patienter med stadium II-tumörer som idag inte erbjuds adjuvant behandling.

Låga nivåer av miR-133b och höga nivåer av miR-185 i CRC-tumörer är korrelerade till kortare överlevnad.

Nivåerna av miR-21, som rapporterats uppreglerade i tumörer, minskar inte i serum efter radikal kirurgi, vilket troligen speglar att nivåerna påverkas av läkningsförloppet. Data från vårt lilla material indikerar dock att nivåerna av miR-133b sjunker efter radikal CRC-kirurgi.

1. "Tissue sampling for mutation analysis in colorectal cancer: K-ras is homogeneously distributed throughout the tumor tissue". S. Ekelund, N. Papadogiannakis, H. Olivecrona, U. Lindfors. *Oncology Reports*, Jan 2011, p. 253-258
2. "The prognostic significance of K-ras mutations in regional lymph nodes after radical resection for stage II colorectal carcinoma". S. Tumlin-Ekelund, N. Papadogiannakis, K. Gullberg, L. Törkvist, G. Lindberg, A. Karkamanis, H. Olivecrona, U. Lindfors. Manus
3. "miR-185 and miR-133b deregulation is associated with overall survival and metastasis in colorectal cancer". P. Akcakaya, S. Ekelund, I. Kolosenko, S. Caramuta, D. Özata, H. Xie, U. Lindfors, H. Olivecrona, W-O. Lui. *International Journal of Oncology*, Aug 2011, p. 311-318
4. "The Effect of Radical Tumor Resection on Serum MicroRNA in Cancer Patients – a Long-term Follow-up of Patients with Colorectal Carcinoma". S. Tumlin Ekelund, U. Lindfors, M. Leinonen, H. Olivecrona. Manus