

PILOT EXPRESSION ANALYSIS AND *KRAS* STATUS IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

Yana Feodorova¹, Anton Todorov², Desislava Tashkova³, Nikolai Mehterov¹, Gancho Kostov⁴,
Rosen Dimov⁵, Victoria Sarafian¹

Medical University – Plovdiv, Bulgaria

¹ Department of Medical Biology

² Department of Propedeutics of Surgical Diseases

³ Department of General And Clinical Pathology

⁴ Clinic of Surgery, Hospital “Kaspela” – Plovdiv, Bulgaria

⁵ Department of Special Surgery

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the second most frequent neoplastic disease. The risk for developing CRC is determined by genetic predisposition and environmental factors. CRC is the result of gradual accumulation of genetic and epigenetic alterations which lead to transformation of the normal intestinal mucosa into invasive neoplastic tissue. Most cases of CRC originate in adenomas that bear some of the genetic marks of malignant lesions. *APC*, *KRAS* and *p53* are the most frequently affected genes. Mutations in *KRAS* have the most clearly defined diagnostic, prognostic and predictive value since they are crucial for the response to the therapy with anti-EGFR inhibitors. The clinical presentation of these carcinomas, the aggressiveness, prognosis and susceptibility to treatment are still hard to predict. A good prospect in this direction offers the study of the mutation and transcription profiles as a road towards personalized therapy.

In the current study we determined the mutation status of the *KRAS* gene in four patients with sporadic CRC. In addition, we identified the transcription levels of seven genes (*EGFR*, *VEGF*, *MMP*, *SETD2*, *CD44*, *TNF*, *KRAS*), associated with adhesion, invasion, angiogenesis and metastasis which have not been studied before in this constellation. We used RT-qPCR with RT² Profiler™ PCR Array for analysis of mRNA levels. Tumor and normal tissue (internal control) were isolated from the patients by intrasurgical resection. We observe differences in the transcription levels between normal and tumor tissue. There is differential expression of the studied genes in the malignant tissue. However, mRNA levels do not seem to correlate with the presence or absence of mutations in the *KRAS* gene.

Key words: colorectal cancer (CRC), *KRAS* mutation status, expression analysis

Въведение

Колоректалният карцином е най-често диагностицираната неоплазия в Европа, с най-висока смъртност след рака на белия дроб. Около 20-25% от пациентите с КПК вече имат метастази по време на поставяне на диагнозата. В 20-25% от болните също ще се открият метастази по време на развитието на болестта, което води до висока смъртност от 40-45% (Reimers et al. 2013). Официалните статистически данни у нас показват, че КПК е най-честото злокачествено заболяване на гастроинтестиналния тракт – 15,1% от всички новооткрити неоплазми. През 2010 г. в България са регистрирани 1393 нови случая на карцином на колона при мъже и 1221 при жени, както и 1162 нови случая на карцином на ректума при мъже и 712 при жени. Рискът за КПК се определя от генетична предразположеност и факторите на околната среда, най-важният от които е възрастта. Над 90% от случаите на спорадичен КПК засягат индивиди над 50-годишна възраст (Cappell, 2008). Около 5% от случаите на КПК се дължат на наследствени генетични мутации (Power et al., 2010). Два синдрома – фамилна аденоматозна полипоза (FAP) и синдром на Линч, са в основата на наследствения КПК. В останалите 95% от случаите, 20% имат позитивна фамилна история, но не могат да бъдат категоризирани към нито един наследствен синдром (Power et al. 2010). КПК произхожда от постепенното акумулиране на генетични и епигенетични промени, които предизвикват

трансформация на нормалната чревна лигавица в инвазивна неопластична тъкан. Повечето случаи на КРК водят началото си от аденоми, които носят част от генетичните отпечатащи на малигнените лезии, като трансформацията продължава около 10-15 години (Al-Sohaily et al. 2012). Идентифицирани са три основни молекулярни пътища – хромозомна нестабилност (*Chromosome Instability – CIN*), микросателитна нестабилност (*Microsatellite Instability – MSI*), както и метилиране на промоторните региони на множество гени (*CpG Island Methylator Phenotype – CIMP*) (Фиг. 1) (Jass, 2007). Голям брой генни мутации са свързани с колоректалната карциногенеза, но тяхната роля за инициацията и прогресията на заболяването все още не е ясна. Най-често засегнатите гени са *APC*, *KRAS* и *p53*, като мутациите и в трите гена в един и същи тумор са изключително редки (Smith et al. 2002). С най-ясно дефинирана диагностична, прогностична и предиктивна стойност са *KRAS* мутациите, защото те имат ключово значение за отговора към терапия при КРК. Откриват се при 35-42% от случаите на КРК и се смята, че появата им е ранно събитие в карциногенезата. Около 97% от мутациите засягат единични нуклеотидни замени в кодони 12 и 13 на екзон 2 на гена (Reimers et al. 2013).

ТИП КРК	ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРСИТИКА
CIMP high/MSI high (12%)	мутации в <i>BRAF</i> и метилиране на <i>MLH1</i>
CIMP high/MSI low or stable (8%)	мутации в <i>BRAF</i> и метилиране на множество гени
CIMP low/MSI low or stable (20%)	хромозомна нестабилност, мутации в <i>KRAS</i> и метилиране на <i>MGMT</i>
CIMP negative/microsatellite stable (57%)	хромозомна нестабилност
Наследствен неполипозен колоректален карцином (HNPCC) CIMP negative/MSI high (3%)	негативен за мутации в <i>BRAF</i>

Фигура 1. Тип, честота и генетична характеристика на КРК (Jass, 2007)

На този етап като прогностични биомаркери в клиничната практика се използват мутациите в *KRAS* и *BRAF* гените, които определят резистентност към терапията с анти-EGFR моноклонални антитела. Смята се, че КРК фенотипът, свързан с микросателитната нестабилност (MSI), се асоциира с по-добра прогноза. Анализът Oncotype DX colon cancer assay се базира на изследването на генната експресия на 12 гена и има стойност при определянето на лечението на пациенти с КРК във фаза II и III (Reimers et al. 2013). Въпреки акумулирането на нови данни за патогенезата на КРК, клиничната изява на тези карциноми, агресивността, прогнозата и податливостта на лечение засега са трудно предсказуеми.

Целта на настоящето пилотно проучване е да се установи доколко *KRAS* мутационният статус има отношение към генната експресия на 7 гена, асоциирани с адхезия, инвазия, ангиогенеза и метастазиране.

Методи

В проучването са включени четирима пациенти (1 жена и 3 мъже) на средна възраст $70 \pm 5,3$ г (Таблица 1). При пациенти 1, 3 и 4 се наблюдава умерено диференциран аденокарцином на дебелото черво, а при пациент 2 – ниско диференциран. Туморна и нормална тъкан (вътрешна контрола) са изолирани от пациентите чрез интраоперативна резекция. Част от туморната тъкан е фиксирана в 10% неутрален формалин и включена в парафин за хистологична оценка и изолация на ДНК. За изолирането на ДНК от парафинови срези е използван QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen), а за определяне на мутационния статус на гена *KRAS*– *therascreen KRAS RGQ PCR kit* (Qiagen). Генната експресия на *EGFR*,

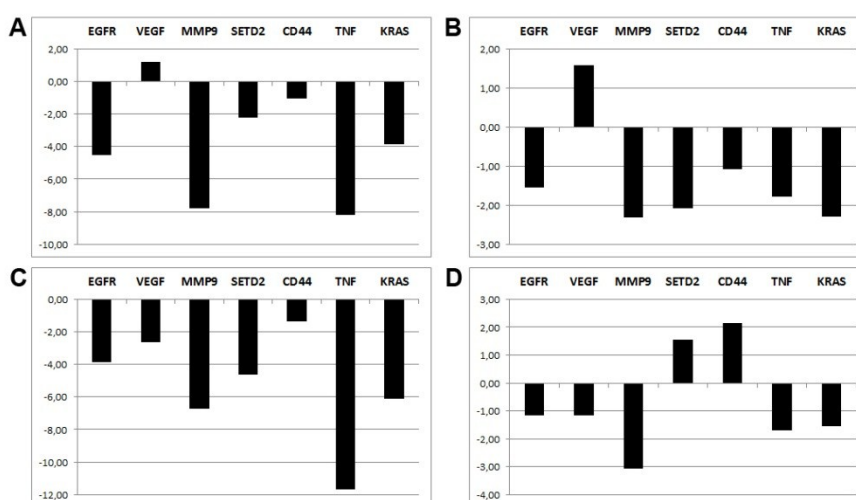
VEGF, *MMP9*, *CD44*, *SETD2*, *TNF-alpha* и *KRAS* гените е измерена чрез RT-qPCR с помощта на RT² Profiler™ PCR array (SABiosciences). Контролите не показват наличие на контаминация с геномна ДНК в нито една от пробите. Анализът на резултатите е направен въз основа на $\Delta\Delta C_T$ метода индивидуално за всеки пациент, като експресията в нормалната тъкан представлява вътрешна контрола. За референтен ген е използван *HPRT1*.

Таблица 1: Характеристика на пациентите, включени в проучването

	Възраст	Диагноза	Стадий	Терапия	<i>KRAS</i> статус
Пациент 1	68 г.	Ca sigmatis	T3N0M0	без предоперативна химио- или лъчетерапия	WT
Пациент 2	79 г.	Ca cõeci	T3N0M0		WT
Пациент 3	68 г.	Ca sigmatis	T2N0M0		12ALA
Пациент 4	65 г.	Ca rectosigmoidalis	T2N0M0		12 ASP

Резултати

Данните, получени при ДНК анализа, показват, че двама от пациентите са носители на див тип *KRAS* (wild type *KRAS* – WT *KRAS*), а при другите двама се откриват следните мутации в кодон 12 на екзон 2 на гена – 12ALA и 12ASP. Резултатите от количествения PCR разкриват намалена експресия на *EGFR*, *MMP9*, *SETD2*, *TNF-alpha* и *KRAS* и нормални нива на *VEGF* и *CD44* при пациент 1 (WT *KRAS*) (Фиг. 2, А). При втория пациент с див тип експресията на *MMP9*, *SETD2* и *KRAS* е много слабо понижена спрямо нивата в нормалната тъкан, а нивата на останалите проучвани гени са близки до тези в контролата (Фиг. 2, В). Експресията е увеличена, когато нивата на транскриптите са поне 2 пъти по-високи от тези в контролната тъкан (>2). При понижена експресия количеството иРНК от съответния ген в тумора е поне 2 пъти по-ниско (<-2). При пациента с мутация в *KRAS* 12ALA се наблюдава понижена регулация на всички гени с изключение на *CD44* (Фиг. 2, С). При пациент 4, с мутация 12ASP, нивото на експресия на *CD44* е увеличено два пъти спрямо това в нормалната тъкан. *EGFR*, *VEGF*, *SETD2*, *TNF-alpha* и *KRAS* показват нормална експресия, а нивата на *MMP9* са понижени (Фиг. 2, D).



Фигура 2. Експресионен профил на пациенти с КПК в съпоставка с *KRAS* статуса.

А: Пациент 1 (WT *KRAS*); **В:** Пациент 2 (WT *KRAS*); **С:** Пациент 3 (12ALA); **Д:** Пациент 4 (12ASP)

Дискусия

Генният продукт на *KRAS* гена е малък 21-kDa GTP/GDP свързващ белтък, регулиращ клетъчния отговор към множество екстрацелуларни сигнали (Schubbert et al. 2007). *KRAS* активира MAPK сигналния път, свързан с клетъчната пролиферация, диференциация и оцеляване (Bos, 1989). Мутациите в *KRAS* водят до конститутивно активиране на EGFR и липса на отговор към терапията с анти-EGFR антитела при пациенти с мутантен фенотип (Berg and Soreide, 2012). Резултатите от ДНК анализа на пациентите, включени в нашето пилотно проучване, показва наличие на мутации при двама от тях. Изненадващо, при пациента с 12ASP мутация транскрипционното ниво на гена остава непроменено спрямо това в нормалната тъкан, а при останалите пациенти е понижено.

EGFR е рецептор-тирозин киназа, която има важно значение за пролиферацията и диференциацията на нормалните клетки, но свръхекспресията (при 30-85% от пациентите) и повишената активност на EGFR води до засилена пролиферация и ангиогенеза, миграция и избягване на апоптозата при КПК (Yokota, 2012). Резултатите от RT-qPCR анализа показват нормална или умерено понижена регулация (3-4 пъти) на гена за EGFR при изследваните от нас пациенти, като тези нива не се определят от наличието или липсата на мутации в *KRAS* гена.

CD44 е трансмембранен гликопротеин, който засилва туморния растеж и метастазирание, инхибира апоптозата и играе роля при насоченото движение на туморните клетки (Naog et al. 2008). Освен това, нови изследвания насочват към ролята на CD44 при ангиогенезата. Фактът, че блокирането на CD44 може да инхибира неоангиогенезата, го прави интересен потенциален таргет за антитуморна терапия (Tremmel et al. 2009). В настоящето проучване установяваме нормално количество иРНК при всички пациенти с излучение на този с мутация 12ASP в *KRAS* гена, при който се наблюдава леко повишена регулация на гена.

Взаимодействието на матриксната металопроотеиназа MMP9 със CD44 върху клетъчната мембрана може да активира EGFR, което от своя страна води до активация на PI3K/AKT или MAPK/ERK – сигнални пътища, регулиращи клетъчната инвазия и миграция (Bauvois, 2012). При КПК са изследвани основно четири матриксни металопроотеинази – MMP2, MMP9, MMP 7, MMP8. Много автори докладват повишена експресия на MMP2, MMP7 и MMP9, която корелира с размера на тумора, метастази в лимфните съдове и далечни метастази (Langers et al. 2012). В противоречие с тези данни показваме слабо до умерено понижена експресия на MMP9 в изследваните от нас пациенти, като изглежда, че тези нива отново нямат отношение към *KRAS* мутационния профил.

Показано е, че високи експресионни нива на VEGF са асоциирани с по-лоша клинична прогноза. Изследвана е не само експресията на гена, но и различни мутации, които играят роля при метастазиранието на КПК (Bird et al. 2006). Около 50% от пациентите с метастази имат мутации в двата гена – *p53* и *VEGF* (Bird et al. 2006). Терапията с моноклонални антитела срещу VEGF (bevasizumab) се използва в комбинация с химиотерапия при пациенти с метастазирал КПК. При изследваните от нас пациенти нивата на този ген са нормални до леко понижени спрямо тези в нормалните тъкани (Фиг. 2, С).

SETD2 е хистонова метил-трансфераза – единственият ензим, който катализира преминаването на H3K36me2 към H3K36me3 – хистонова модификация, асоциирана с активно транскрибиращи се геномни региони (Schmidt and Jackson, 2013). SETD2 може да взаимодейства с *p53* и селективно да регулира неговата функция като транскрипционен фактор (Xie et al. 2008). Проучвания при рак на гърдата показват понижена експресия на гена и възможна туморно супресорна функция на протеина (Al Sarakbi et al. 2009). Още повече, при клетъчни линии от бъбречен карцином и лимфома на Бъркит, характеризирани се с микросателитна нестабилност (MSI), но без дефекти в гените за MMR (mismatch repair), се откриват мутации в гена за SETD2 (Li et al. 2013). В туморната тъкан на трима от

пациентите, включени в нашето проучване (Фиг. 2, А, В, С), се наблюдава понижена експресия на гена. Този ген не е проучван при КРК, но получените от нас данни предполагат потенциалната роля на SETD2 в патогенезата му.

Заклучение

Представени са резултатите от пилотния анализ на експресионното ниво на гени, асоциирани с ключови процеси в патогенезата на КРК в съпоставка с *KRAS* статуса на пациентите. Изследваните гени показват диференцирана експресия, което налага разширяване на експресионния панел в търсене на кандидат-гени, корелиращи с *KRAS* статуса.

Благодарности: Проучването е финансирано по проект НО – 02/2013 на МУ – Пловдив и частично по проект ДУНК 01/2 от 28.12.2009 на МОН.

Литература

1. Al Sarakbi W, Sasi W, Jiang WG et al. The mRNA expression of SETD2 in human breast cancer: correlation with clinico-pathological parameters. *BMC Cancer*. 2009; 9:290.
2. Al-SohailyS, BiankinA, LeongR et al. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012; 27(9):1423-31.
3. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1825(1):29-36.
4. Berg M, Soreide K. EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. *Discov Med*. 2012; 14(76):207-14.
5. Bird NC, Mangnall D, Majeed AW. Biology of colorectal liver metastases: A review. *J Surg Oncol*. 2006; 94(1):68-80.
6. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989; 49(17):4682-9.
7. Cappell MS. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008; 37(1):1-24.
8. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007; 50(1):113-30.
9. Langers AM, Verspaget HW, Hawinkels LJ et al. MMP-2 and MMP-9 in normal mucosa are independently associated with outcome of colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2012; 106(9):1495-8.
10. Li F, Mao G, Tong D et al. The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS α . *Cell*. 2013; 153(3):590-600.
11. Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA et al. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol*. 2008; 18(4):260-7.
12. Power DG, Glogowski E, Lipkin SM. Clinical genetics of hereditary colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010; 24(5):837-59.
13. Reimers MS, Zeestraten EC, Kuppen PJ et al. Biomarkers in precision therapy in colorectal cancer. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2013; 1(3):166-83.
14. Schmidt CK, Jackson SP. On your mark, get SET(D2), go! H3K36me3 primes DNA mismatch repair. *Cell*. 2013; 153(3):513-5
15. Schubert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(4):295-308.
16. Smith G, Carey FA, Beattie J et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(14):9433-8.

17. Tremmel M, Matzke A, Albrecht I et al. A CD44v6 peptide reveals a role of CD44 in VEGFR-2 signaling and angiogenesis. *Blood*. 2009; 114(25):5236-44.
18. Xie P, Tian C, An L et al. Histone methyltransferase protein SETD2 interacts with p53 and selectively regulates its downstream genes. *Cell Signal*. 2008; 20(9):1671-8.
19. Yokota T. Are KRAS/BRAF mutations potent prognostic and/or predictive biomarkers in colorectal cancers? *Anticancer Agents Med Chem*. 2012; 12(2):163-71.