

ABSCHLUSSBERICHT

Projekt 1/14: Etablierung einer genetischen Signatur als prognostischer und prädiktiver Marker für das Metastasierungspotential von kolorektalen Karzinomen

ROLAND-ERNST-STIFTUNG FÜR GESUNDHEITSWESSEN

Dresden, März 2018

Priv.-Doz. Dr. med. habil. Sebastian Schölch

Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus
Technische Universität Dresden

Zielsetzung des Projekts

Im beschriebenen Forschungsprojekt sollte eine Gruppe von Genen („Gensignatur“), deren differentielle Regulation beim kolorektalen Karzinom (CRC) das Ausstreuen von CTC in die Blutbahn und dadurch die Lebermetastasierung vorhersagen kann, entdeckt, definiert und validiert werden. Diese Gensignatur sollte es ermöglichen, anhand des Primärtumors (entweder an Biopsiegewebe im Rahmen einer präoperativen Koloskopie oder am Operationspräparat) diejenigen Patienten mit einem frühen kolorektalen Karzinom (UICC I-II) zu identifizieren, die eventuell von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren würden, weil ihr Tumor eine frühe metastatische Aktivität aufweist. Hierfür sollte zunächst aus Patientenproben mittels Next Generation Sequencing eine Gruppe von differentiell regulierten Genen identifiziert werden. Im nächsten Schritt sollten diese zunächst retrospektiv an eingelagertem Tumorgewebe und dann prospektiv in einer bizenstrischen Studie validiert werden. Zuletzt sollten diese Gene in Tumor-Organoiden aus Patiententumoren ausgeknockt oder überexprimiert werden und das Tumorstachstum dieser Organoiden *in vivo* charakterisiert werden.

Ergebnisse

Identifikation von Kandidatengenem aus Patientenproben

Zunächst wurden aus unserer Datenbank Patienten mit einem CRC in einem frühen, nodal-negativen Tumorstadium (UICC I-II) identifiziert und mittels CellSearch System die Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) als Surrogatmarker für eine systemische Metastasierungsaktivität im Blut dieser Patienten bestimmt. Es konnten fünf Patienten mit einem Nachweis von CTCs in der Zirkulation identifiziert werden, was aufgrund der extremen Seltenheit von CTCs im UICC-Stadium I-II im Bereich der Erwartungen lag. Nachfolgend wurden passende Kontrollpatienten ohne CTC-Nachweis identifiziert, das Matching wurde Anhand von Alter, Geschlecht, Tumorstadium und Histologie durchgeführt. So konnten fünf Patientenpaare selektiert werden. Von diesen Patienten wurde RNA aus Tumorgewebe und korrespondierender gesunder Kolon-schleimhaut extrahiert und auf ihre Qualität überprüft. Bei zwei CTC-positiven Patienten konnte keine RNA in ausreichender Qualität gewonnen werden, sodass schließlich drei CTC-positive und 3 passende, CTC-negative Patienten mit sehr guter RNA-Qualität sowohl im Tumorgewebe als auch im Kontrollgewebe vorlagen.

Die RNA-Proben wurden daraufhin in der Genomics und Proteomics Core Facility des Deutschen Krebsforschungszentrums mittels RNA-Sequencing analysiert und die Gesamtheit der RNA-Transkripte quantifiziert. So konnte ein detailliertes Expressionsprofil aller Proben gewonnen werden. Die bioinformatische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung Bioinformatik des DKFZ durchgeführt. Die im Tumor differentiell exprimierten Gene wurden durch Abgleich der Tumorexpressionsprofile mit den Expressionsprofilen des korrespondierenden Normalgewebes identifiziert, und diese im Tumor differentiell exprimierten Gene wurden zwischen CTC-positiven und -negativen Tumoren verglichen. Durch die Benjamini-Hochberg-Prozedur wurde für multiples Testen adjustiert, die false detection rate (FDR) wurde auf 0.1 begrenzt.

Es konnten insgesamt 15 differentiell regulierte Gene identifiziert werden (Tab. 1).

Tabelle 1. Liste der im Tumor differentiell exprimierten Gene (nach Abgleich mit dem korrespondierenden Normalgewebe) zwischen CTC-positiven und -negativen Patienten.

#	Symbol	logFC	logCPM	LR	p value	FDR
1	POU6F2	6.215	3.1574	32.752	1.05E-08	0.0001468
2	LIPC	5.143	1.9161	22.351	2.27E-06	0.0159257
3	NXPH1	4.593	1.5561	21.458	3.62E-06	0.0169046
4	FRMD5	3.135	4.2816	20.593	5.68E-06	0.0199074
5	PVT1	2.251	5.9681	17.567	2.77E-05	0.0665214
6	GRIK4	4.339	1.7204	17.092	3.56E-05	0.0665214
7	SPINK4	-4.252	4.4967	16.849	4.05E-05	0.0665214
8	HCAR3	6.542	4.0761	16.776	4.21E-05	0.0665214
9	IL8	6.86	8.3289	16.748	4.27E-05	0.0665214
10	SHISA6	4.499	2.7608	16.522	4.81E-05	0.0674344
11	AQP9	5.496	4.8223	16.048	6.18E-05	0.0702946
12	LGR5	3.163	4.8428	16.009	6.30E-05	0.0702946
13	LOC646324	4.67	3.6793	15.946	6.52E-05	0.0702946
14	KIAA1199	3.784	6.3268	15.608	7.79E-05	0.0780582
15	PABPC1L	2.912	2.8564	15.27	9.32E-05	0.087115

Hierunter fanden sich einige bereits im CRC als relevant bekannten Gene (z.B. LGR5, IL8) als auch neue Kandidaten (z.B. POU6F2) oder Genloci mit bislang unbekannter Funktion (z.B. LOC646324).

Validierung der Kandidatengene im Patientenmaterial

Die Expression aller 15 Gene wurde nachfolgend mittels qPCR in einer Kohorte aus insgesamt 60 Patienten validiert. Aufgrund der extremen Seltenheit von CTCs in Patienten der UICC-

Stadien I und II wurden CTCs als Surrogatmarker für die Metastasierung verlassen und stattdessen Patienten, die im weiteren Krankheitsverlauf Fernmetastasen entwickelten, mit solchen verglichen, die rezidivfrei blieben. Auch hier wurden die Kontrollen genau gematched. Die RNA-Extraktion erfolgte auch in dieser Kohorte sowohl aus Tumor- als auch korrespondierendem Normalgewebe, sodass interindividuelle Unterschiede herausgerechnet werden konnten.

Leider konnte an diesem Punkt kein einziges der Kandidatengene im Patienten validiert werden. Dies lag zum einen an dem Umstand, dass Proben von Patienten, die initial in einem frühen Tumorstadium operiert wurden und später Metastasen entwickelten, zu diesem Zeitpunkt oft bereits jahrelang gelagert worden waren und die RNA-Qualität daher suboptimal war. Zum anderen war die Heterogenität der Expression der Kandidatengene in der Validierungskohorte überraschend groß, sodass eine deutlich größere Patientenkohorte hätte untersucht werden müssen, um Tendenzen zeigen zu können. Dies hätte eine enorme Steigerung des zeitlichen und finanziellen Aufwands des Projekts bedeutet. Aus diesem Grund musste die Strategie zur Identifikation von Metastasierungs-initiiierenden Genen geändert werden.

Adaptation eines genetisch induzierten Mausmodells des kolorektalen Karzinoms

Offenbar ist die Identifikation zukünftig metastasierender Tumoren mittels CTC-Quantifikation nicht zuverlässig; die retrospektive Identifikation dieser Tumoren ist limitiert durch die eingeschränkte RNA-Qualität der z.T. jahrelang eingelagerten Proben. Darüber hinaus ist die Expression der Kandidatengene in der untersuchten Validierungskohorte wie oben beschrieben extrem heterogen, was den Aufwand für einen Nachweis der prognostischen Signifikanz der Kandidatengene in Patientenmaterial extrem gesteigert hätte. Aus diesem Grund fiel die Entscheidung, zunächst einen Schritt zurück ins Mausmodell zu gehen, um dort die Metastasierungskaskade auf molekularer Ebene genauer untersuchen zu können.

In der Vergangenheit in klassischen, Zelllinien-basierten Mausmodellen des CRC erprobte Wirkstoffe scheiterten in der großen Mehrheit in der Klinik, was den schlechten prädiktiven Wert klassischer Mausmodelle unterstreicht (1). Dies ist dem Umstand geschuldet, dass die verwendeten Zelllinien z.T. seit Jahrzehnten in Kultur gehalten werden und daher die Ausgangskrankheit nicht mehr unbedingt realistisch repräsentieren können (2). Darüber hinaus werden meist humane Zelllinien verwendet, was zur Verhinderung einer Abstoßung nur in immundefizienten Mäusen geschehen kann. Durch Defekte oder gar das weitgehende Fehlen eines Immunsystems ist die Repräsentativität solcher Modelle für die humane Erkrankung fraglich.

Aus diesem Grund entschieden wir uns dazu, ein genetisch induziertes Mausmodell (genetically engineered mouse model, GEMM) zu entwickeln. In GEMMs werden tumor-spezifische

Mutationen (im Falle des CRC z.B. APC, KRAS, TP53) in exakt dem Gewebe, das den Tumor entwickeln soll, induziert. Die Tiere entwickeln daraufhin Tumoren, die denen im Menschen stark ähneln. Wie beim Menschen auch entstehen zunächst frühe Vorläuferläsionen, die sich über die Zeit durch die spontane Akkumulation weiterer Mutationen zu invasiven und z.T. metastasierenden Karzinomen entwickeln.

Ein derartiges Modell des CRC war zu diesem Zeitpunkt bereits publiziert (3). In diesem Modell wurden in die Keimbahn der Tiere konditionelle („gefloxt“) Mutationen eingebracht, die mittels eines endoluminal applizierten Adenovirus (Adeno-Cre) selektiv in der Kolonschleimhaut induziert werden können. Dies geschieht in einem chirurgischen Eingriff, bei dem ein kurzes Kolonsegment ausgeklemmt und mit dem die Mutationen aktivierenden Virus infiziert wurde. Nur in diesem Segment entstehen im Verlauf Tumoren, die mittels Koloskopie diagnostiziert und in der Entwicklung verfolgt werden können. Die Tiere entwickeln in diesem Modell jedoch nur sehr selten Metastasen, was die Untersuchung der Metastasierung erschwert. Da in unserem Projekt außerdem ein Schwerpunkt auf CTCs gelegt werden sollte, gab es zusätzlich das Problem, dass aktuell kein geeigneter Marker für murine CTCs des CRC bekannt ist. Daher entschieden wir uns, das Modell von Hung et al. (3) zu adaptieren und dann zunächst genau zu charakterisieren.

Steigerung der Metastasierungsrate im genetisch induzierten Mausmodell

Das von Hung et al publizierte Mausmodell beinhaltet zwei im CRC relevante Mutation, ein konditionelles Knockout des Apc-Gens („Apc floxed“) sowie eine konditionelle Hotspot-Mutation im Kras-Gen („LSL-Kras G12D“). Die Tiere entwickelten zwar invasive Tumoren, jedoch selten Fernmetastasen. Aus diesem Grund entschieden wir uns, weitere Mutationen im Tp53-Gen einzubringen, eine konditionelles Knockout („Tp53 floxed“) und eine konditionelle Hotspot-Mutation („LSL-Tp53 R172H“). Wir untersuchten Tiere mit konditionellen Mutationen in entweder lediglich Apc, in Apc + Kras („AK mouse“), Apc + Kras + Tp53 floxed („AKPfl“) oder Apc + Kras + LSL-Tp53 R172H („AKPr“).

Bei allen 4 Genotypen wurden sowohl die Histologie als auch das Überleben der Tiere untersucht. Aus dem entnommenen Tumorgewebe wurde DNA isoliert und das Mutationsspektrum mittels Exome Sequencing untersucht. Insgesamt wurden 144 Tiere operiert und die Tumorentwicklung untersucht. Die Tiere entwickelten wie erwartet kolorektale Adenokarzinome. Klinisch zeigte sich analog zur Patientensituation eine zunehmende Malignität über die Zeit. Die Tiere mit komplexeren Genotypen (AKPfl, AKPr) zeigten eine deutlich gesteigerte Wachstumsraten (Abb. 1). Das Überleben der Tiere mit Alterationen im Tp53-Gen war deutlich verkürzt (Abb. 2). Histologisch (Abb. 3) und immunhistochemisch (Abb. 4) waren die Tumoren dem humanen

CRC extrem ähnlich. Im Exome Sequencing konnten wir zeigen, dass die Tumoren im Mausmodell genau wie beim menschlichen CRC fortwährend neue Akkumulationen anhäufen, was die fortschreitende Entartung der Tumoren erklärt (Abb. 5). Die Metastasierungsrate konnte durch die Addition der Hotspot-Mutation in Tp53 (LSL-TP53 R172H) deutlich gesteigert werden (Tab. 2).

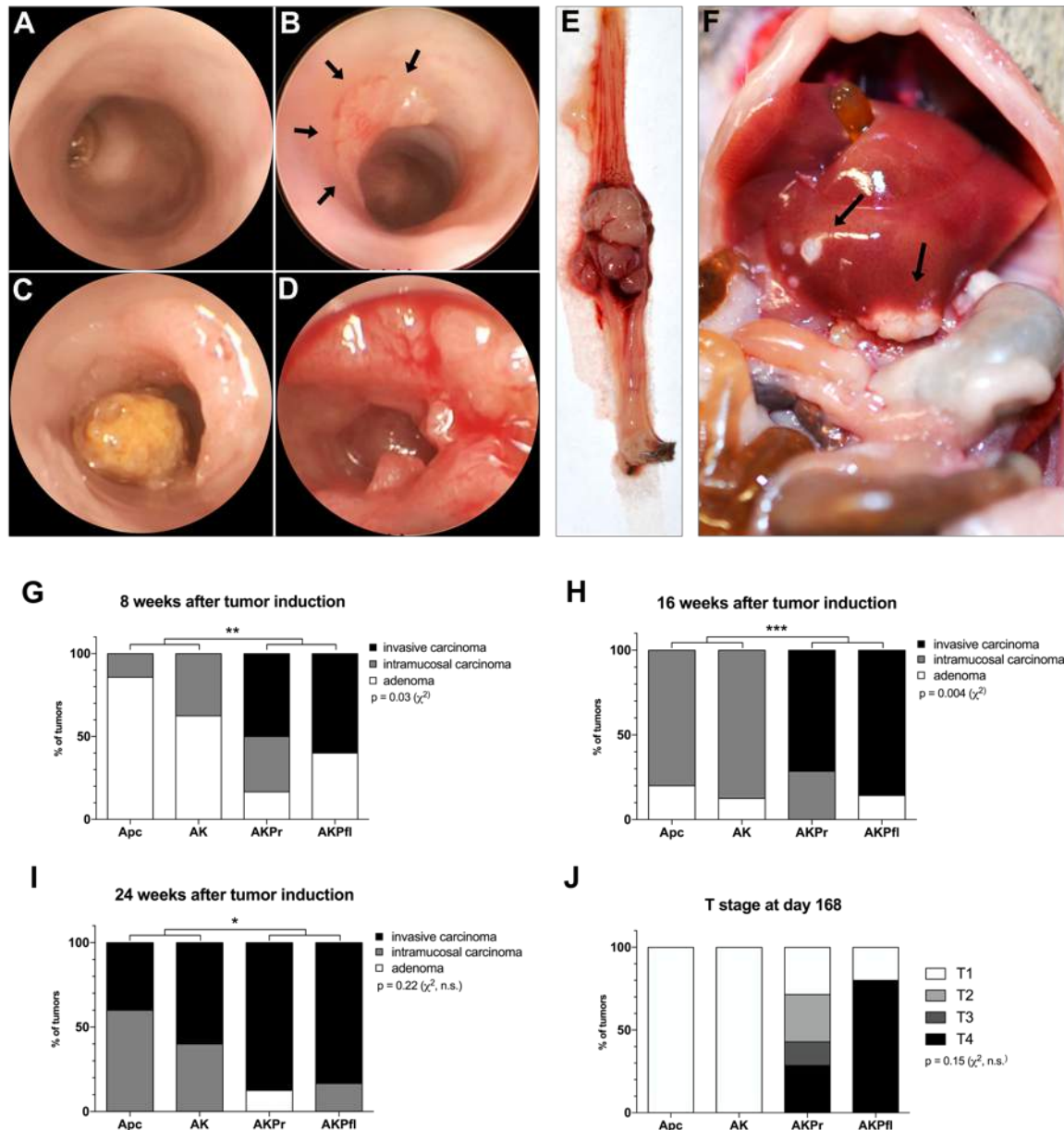


Abb. 1. A-D: Koloskopie. A. Normales Kolon. B. Frühes Adenom (Pfeile) in einer Apc-Maus. C. Intramukosales Karzinom in einer AK-Maus. D. Fortgeschrittenes Adenokarzinom in einer AKPr-Maus.

E & F: Disektion. E. Distales Kolon mit einem großen Tumor in einer AKPfl-Maus. F. Lebermetastasen in einer AKPr-Maus. **G-I:** Invasivität der Tumoren 8 (G), 16 (H) und 24 (I) Wochen nach der Tumorinduktion durch das Adeno-Cre-Virus. **J.** Lokales T-Stadium aller invasiven Tumoren 24 Wochen nach der Tumorinduktion.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Apc: $Apc^{fl/fl}$; AK: $Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+}$; AKPr: $Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{LSL-R172H/+}$; AKPfl: $Apc^{fl/fl} / Kras^{LSL-G12D/+} / Tp53^{fl/fl}$

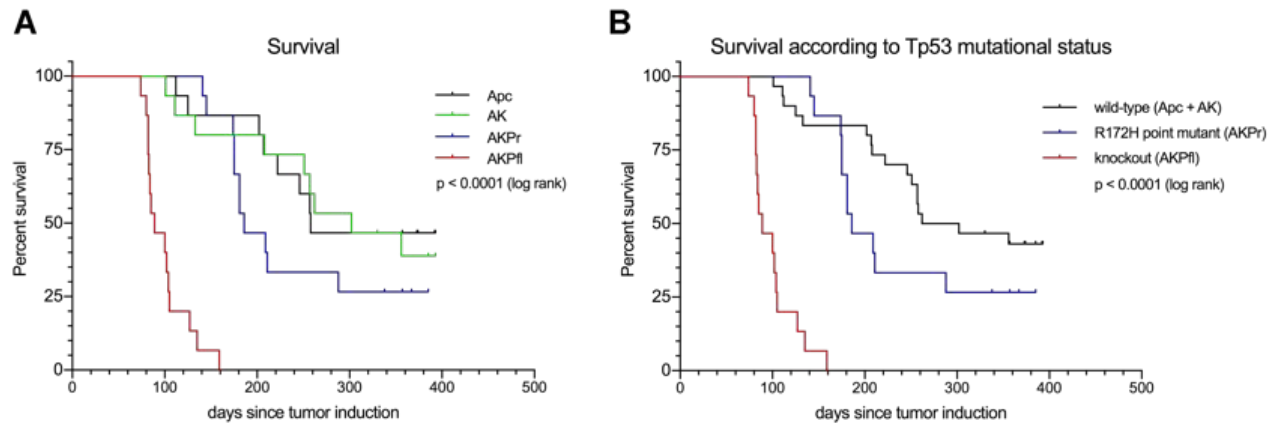


Abb. 2. A. Überleben der Tiere abhängig vom Genotyp. **B.** Einfluss von Tp53-Mutation auf das Überleben im GEMM.

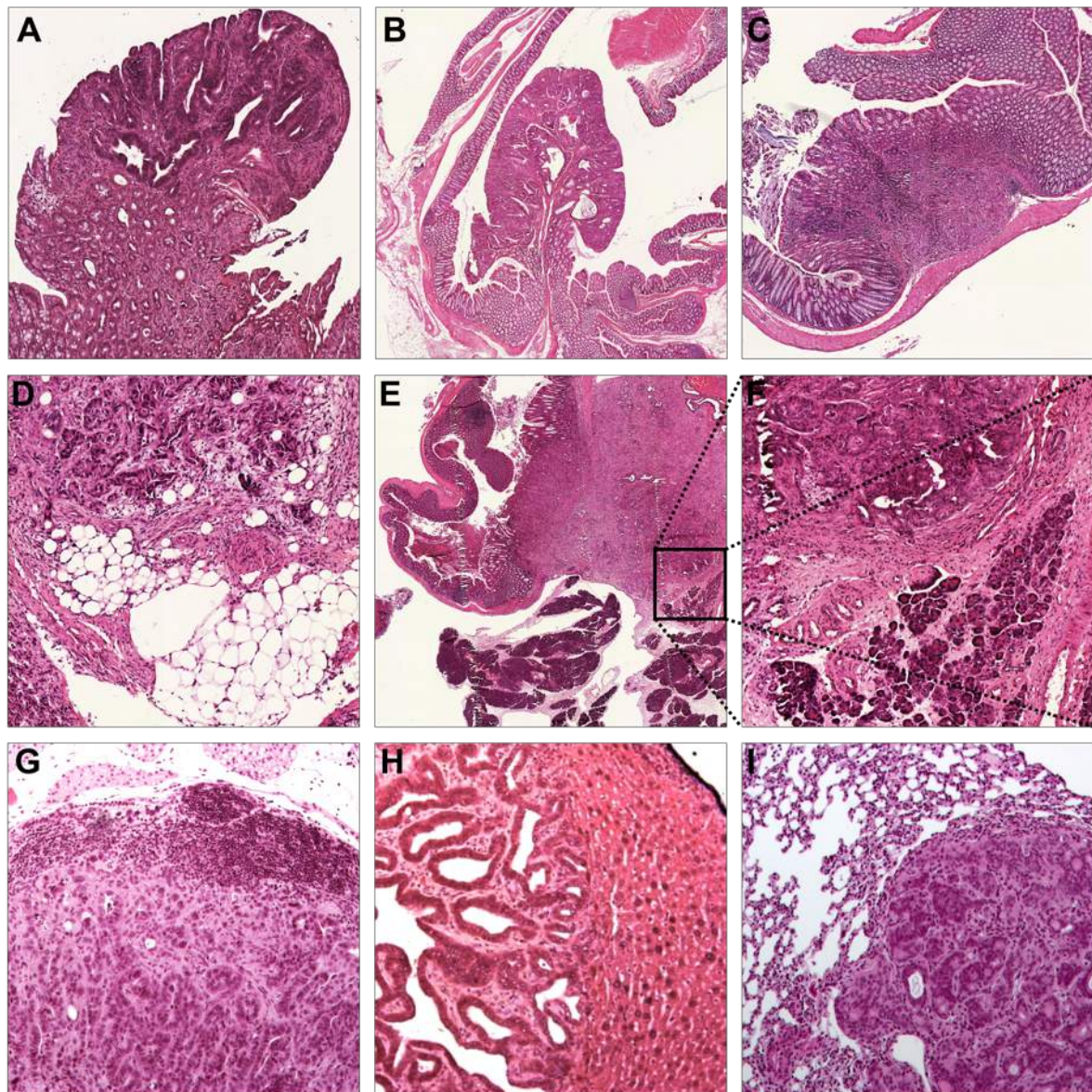


Abb. 3. H/E-Histologie. **A.** Villöses Adenom (Apc, 4x). **B.** Tubuläres Adenom (AK, 2x). **C.** Fokal invasives Adenokarzinom mit Infiltration der Submukosa (T1b SM3, AK, 4x). **D.** Szirrhöses Adenokarzinom mit Infiltration des perikolischen Fettgewebes (T4, AKPfl, 10x). **E.** Lokal fortgeschrittenes, szirrhöses Adenokarzinom mit Infiltration des Pankreas (T4, AKPfl, 2x). **F.** ...

Vergrößerung (10x) von *E*. **G.** Mesenteriale Lymphknotenmetastase (AKPr, 10x). **H.** Lebermetastase (AKPfl, 10x). **I.** Lungenmetastase (AKPr, 10x).

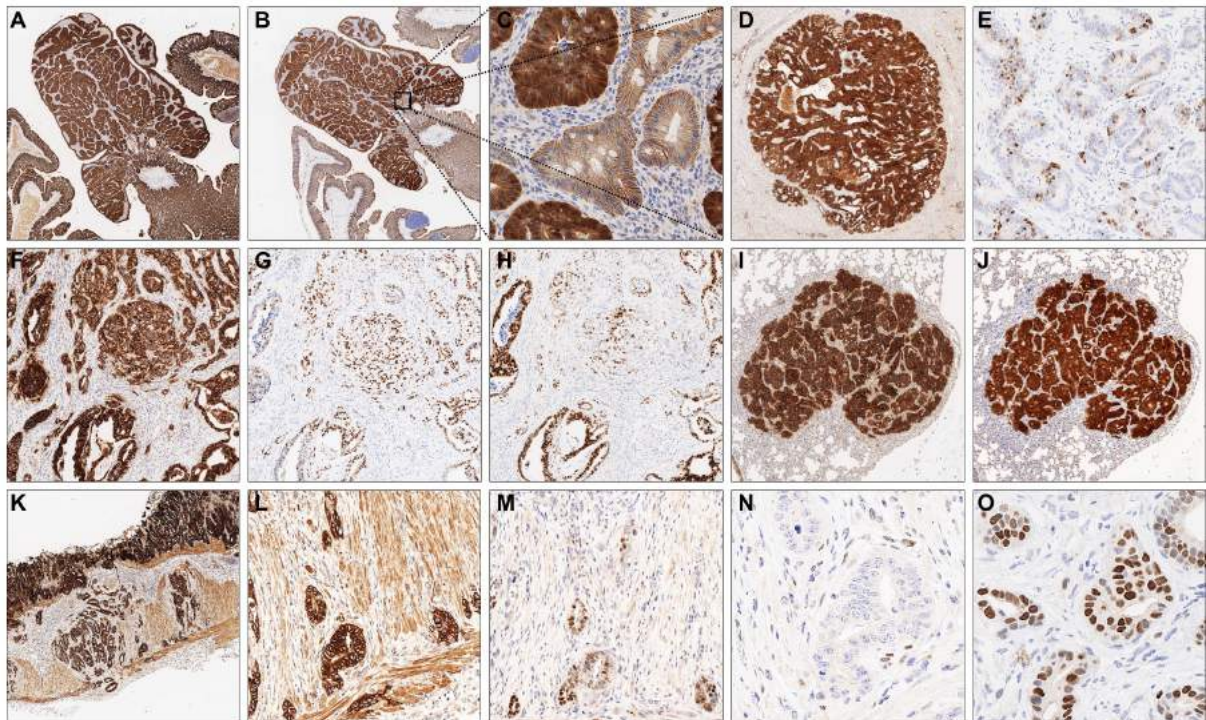


Abb. 4. Immunhistochemie.

A-C. EPCAM- (**A**, 2x) und β -catenin-Expression (**B**, 2x) in einem tubulären Adenom (Apc). Man beachte die Akkumulation von β -catenin in den neoplastischen Drüsen im Vergleich zu den benachbarten, nicht-transformierten Drüsen (**C**). **D-E.** EPCAM- (**D**, 4x) und CDX2-Expression (**E**, 4x) belegen den kolorektalen Ursprung einer Lebermetastase (AK). **F-H.** Invasive Drüsenverbände in einer AKPr-Maus: EPCAM (**F**, 10x), P53 (**G**, 10x) und CDX2 (**H**, 10x). **I-J.** EPCAM- (**I**, 4x) und β -catenin-Positivität (**J**, 4x) bestätigen eine kolorektale Lungenmetastase (AK). **K-M.** Ein Tumor einer AKPfl-Maus infiltriert die Muscularis propria: EPCAM, (**K** (4x), **L** (20x)), CDX2 (**M**, 20x). **N-O.** Verlust der P53-Expression in AKPfl (**N**, 40x) und nukleäre Akkumulation von P53 in AKPr (**O**, 40x) im direkten Vergleich.

Tabelle 2. Übersicht über das Metastasierungsmuster der vier verschiedenen Genotypen (absolute Zahlen in Klammern). Leere Felder zeigen fehlende Daten bei nicht-invasiven Tumoren.

	Apc		AK		AKPfl		AKPr	
day	LN	liver	LN	liver	LN	liver	LN	liver
56					0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)
112					0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/5)	20% (1/5)
168	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/3)	33% (1/3)	0% (0/5)	0% (0/5)	28,6% (2/7)	28,6% (2/7)

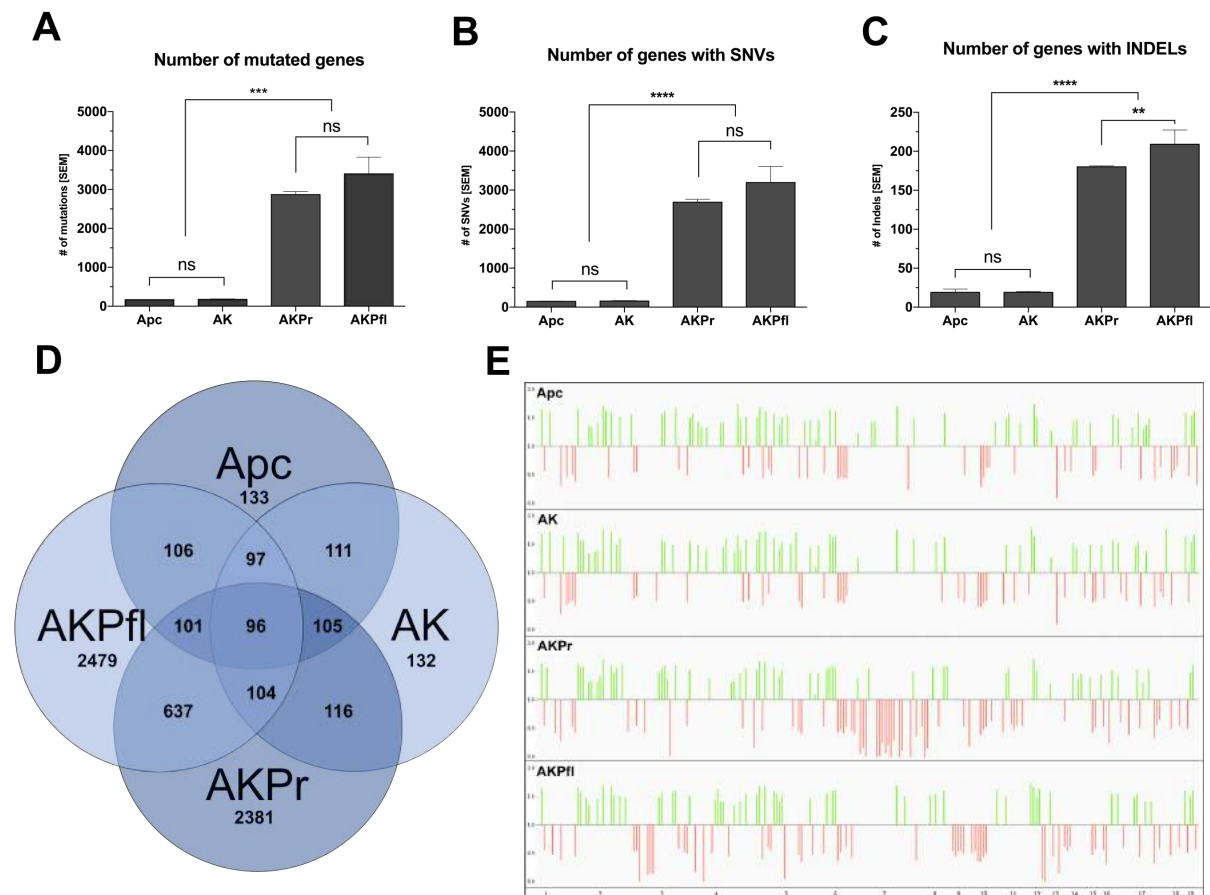


Abb. 5. Gesamtzahl mutierter Gene (**A**), Anzahl von Genen mit *single nucleotide variants* (SNVs, **B**) und von Genen mit *insertions/deletions* (INDELs, **C**) in Tumoren aller Genotypen. **D.** Gemeinsame Mutationen in allen Genotypen. **C.** *Copy number variations* in allen Genotypen.

Zusammengefasst ist es gelungen, die Metastasierungsrate im von Hung et al. entwickelten Modell durch die Addition einer Punktmutation im Tp53-Gen deutlich zu steigern und so die Verwendbarkeit des Modells in der Metastasierungsforschung entscheidend zu verbessern. Das Modell wurde umfassend charakterisiert, die Daten sind aktuell in Begutachtung.

Intrinsische Markierung von CTCs im GEMM

Eine immer wiederkehrende Hürde in der CTC-Forschung ist die Variabilität von CTCs, die die Definition und damit auch die Identifikation von CTCs extrem erschweren. So gibt es keinen Oberflächenmarker, der zuverlässig alle CTCs anfärbt und so eine Isolation und Charakterisierung ermöglichen würde. Dieses Problem existiert gleichermaßen beim Patienten wie auch bei Mausmodellen.

Um diese Hürde zu überwinden, brachten wir in AKPr-Mäuse durch umfangreiche Kreuzungen ein Reporterallel (R26-ZSGreen1) ein. Dieses Allel enthält ein grünes Fluoreszenzprotein, dessen Expression durch das Adeno-Cre-Virus aktiviert wird. Auf diese Weise sind alle

Tumorzellen grün fluoreszent markiert, umgekehrt muss jede grün fluoreszente Zelle eine Tumorzelle sein, da die onkogenen Mutationen gemeinsam mit dem Fluoreszenzprotein aktiviert werden.

Die Expression des Fluoreszenzproteins ist in diesen Tieren so stark, dass die Tumoren selbst bei Tageslicht grünlich erscheinen (Abb. 6).

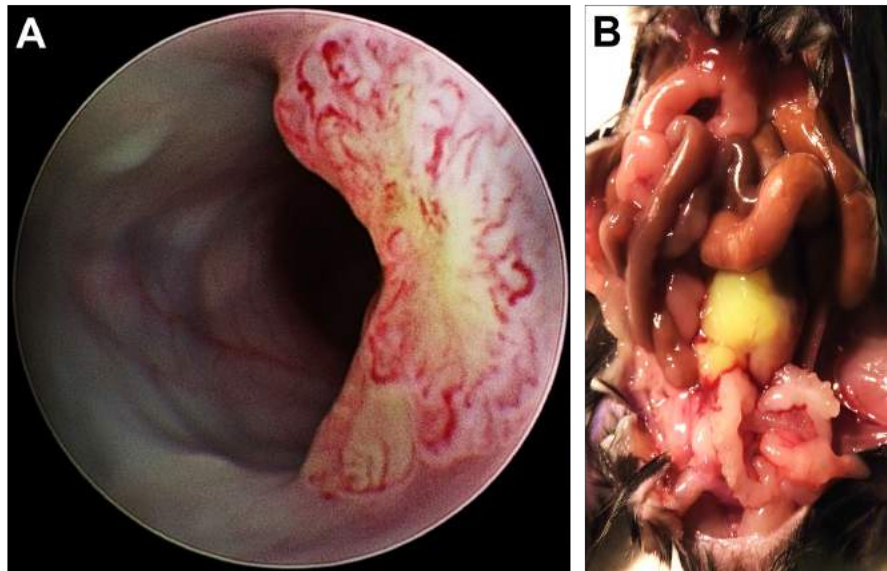


Abb. 6. Koloskopie (A) und makroskopisches Bild (B) eines durch das R26-ZSGreen1-Reporterallel grün fluoreszenten Tumors.

In diesen Tieren ist es möglich, zirkulierende Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms unabhängig von heterogen exprimierten Oberflächen markern zu identifizieren und zu isolieren.

Erste Untersuchung im neuen Mausmodell zeigen regelhaft zirkulierende Tumorzellen in deutlich höherer Zahl und Frequenz als in anderen Mausmodellen oder der humanen Situation. Da bisher vor allem EpCAM als Oberflächenmarker zur Detektion von CTCs verwendet wurde, und dieses seit einiger Zeit im Verdacht steht, von CTCs abreguliert zu werden, färbten wir die in diesem Modell detektierten CTCs gegen EpCAM (Abb. 7). Überraschenderweise zeigte sich, dass die Mehrzahl der CTCs EpCAM-negativ war. Damit ist erstmalig der Nachweis gelungen, dass EpCAM-negative CTCs existieren, gleichzeitig haben wir ein ideales Modell, um diese EpCAM-negativen CTCs genau zu charakterisieren.

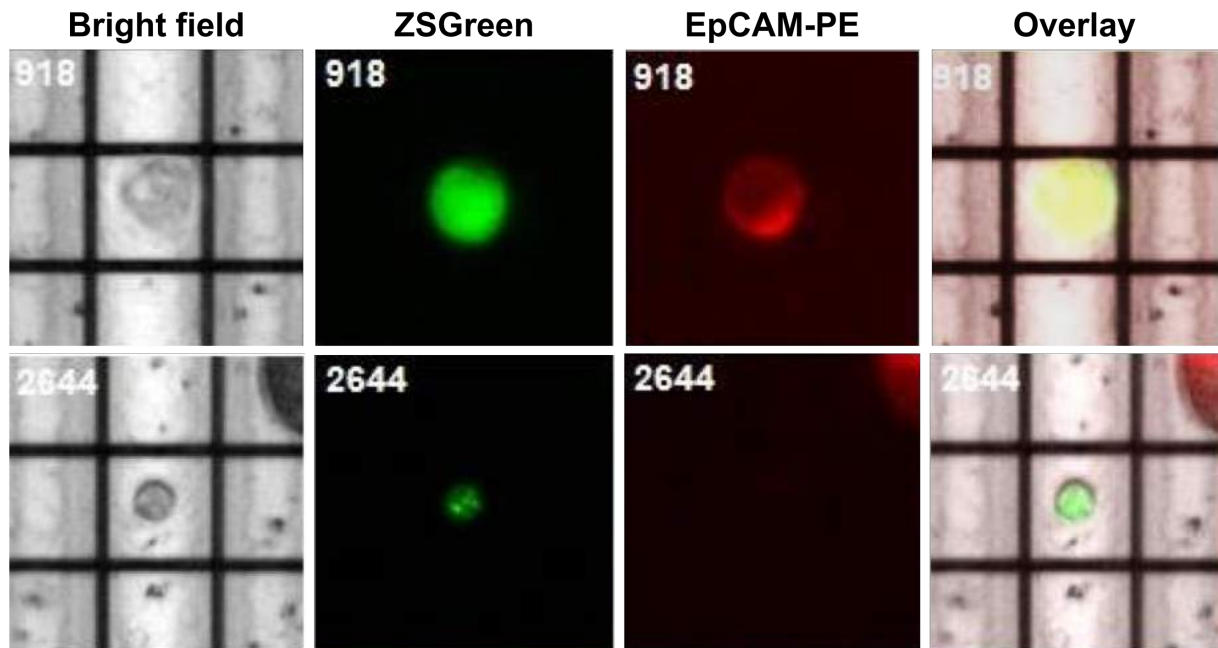


Abb. 7. Mikroskopische Aufnahmen von CTCs im neuen AKPr-ZSGreen1-Mausmodell. Obere Zeile: Klassische EpCAM-positive CTC, als Tumorzelle identifiziert durch grüne Fluoreszenz (Spalte 2), in Spalte 3 ist die Färbung gegen EpCAM (rot) sichtbar. Untere Zeile: EpCAM-negative CTC: Fluoreszenz im grünen Kanal (Spalte 2), im roten Kanal (Spalte 3) ist keine Fluoreszenz sichtbar.

Zusammenfassung

Das eigentliche Ziel, die Etablierung und Validierung einer Gensignatur, die die Stratifizierung von CRC-Patienten früher Stadien in Risikogruppen bez. des Metastasierungsrisikos erlaubt, wäre aufgrund technischer und biologischer Hürden nur mit unverhältnismäßig größerem finanziellem und zeitlichem Aufwand möglich gewesen. Erschwerend kamen unerwartete Personalwechsel und -ausfälle während der Projektlaufzeit hinzu, die ohnehin schon eine deutliche Verlängerung der Projektlaufzeit notwendig machten. Im Verlauf des Projektes zeigte sich, dass vor weiteren Untersuchungen auf Patientenebene insbesondere in der Metastasierungsforschung noch erhebliche grundlagenwissenschaftliche Studien notwendig sind. Aus diesem Grund wurde zunächst ein Mausmodell entwickelt, dass das metastasierende kolorektale Karzinom adäquat simulieren kann. Dies ist gelungen, es wurde ein sowohl klinisch als auch molekularbiologisch extrem realistisches Modell entwickelt und umfangreich charakterisiert. Die daraus resultierende Publikation ist derzeit in Begutachtung. Darüber hinaus wurde das Modell weiterentwickelt, um die Forschung an CTCs marker-unabhängig zu machen, was durch Einkreuzen des R26-ZSGreen1-Reporterallel ermöglicht wurde. Hiermit ist es uns erstmals gelungen, EpCAM-negative CTCs nachzuweisen, die aktuell auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Insgesamt hat das Projekt also trotz der Änderung der Zielsetzung zu einem erheblichen wissenschaftlichen Fortschritt im Bereich der Metastasierung des kolorektalen Karzinoms geführt und kann daher

als erfolgreich abgeschlossen betrachtet werden. Das resultierende, neuartige Mausmodell wird die CTC-Forschung über Jahre hinweg begleiten und ermöglicht Studien, die bisher weder am Patienten noch am Mausmodell möglich gewesen waren.

Dresden, 15. März 2018



Sebastian Schölch

Referenzen

1. Sharpless NE, Depinho RA (2006) The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 5(9):741-754.
2. Roper J, Hung KE (2012) Priceless GEMMs: genetically engineered mouse models for colorectal cancer drug development. *Trends Pharmacol Sci* 33(8):449-455.
3. Hung KE, et al. (2010) Development of a mouse model for sporadic and metastatic colon tumors and its use in assessing drug treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(4):1565-1570.