
Riktad analys av genuttryck med genomkontrollerad RT-PCR

JAKOB STENMAN

I dag används en klassifikation baserad på vävnadspatologin tillsammans med kliniska kriterier och radiologiska undersökningar för att dela in cancerpatienter i prognostiskt åtskiljbara grupper. Inom dessa grupper sker dock stora variationer, och det är svårt att ge en prognos på individnivå med nuvarande diagnostiska metoder. Under de senaste åren har en ny typ av prognostiska tester s.k. "multigene predictors" (multigenetisk prediktoranalys) utvecklats för detta syfte (2–5). De här metoderna baserar sig på uttrycksanalys av flera olika gener i tumörvävnad som avlägsnats under operation eller med hjälp av en diagnostisk nål- eller borstbiopsi. Syftet är att karaktärisera tumörens egenskaper för att kunna skraddarsy behandling och uppföljning på det sätt som mest gynnar patienten (1).

Bakgrund

Med hjälp av DNA-arrayteknik har en stor mängd gener identifierats som potentiellt kunde användas för karaktärisering av tumörer på basen av mRNA-uttrycksmönster. Genom att kombinera flera gener i samma test och utnyttja statistiska verktyg för att analysera resultaten har man lyckats utveckla prognostiska tester för bl.a. bröstcancer. Denna nya typ av tester förväntas spela en avgörande roll för valet av behandlingsform samt uppföljningen av flera olika former av cancer. Redan under år 2008 gjordes över 40 000 multigenetiska prediktoranalyser på bröstcancerpatienter i USA. Flera kommersiella laboratorier som erbjuder centraliserad provanalys har dessutom etablerat sig.

För att främja utvecklingen och valideringen av den här typen av tester är det ytterst viktigt att man kan analysera arkiverade vävnadsprover från patienter för vilka det redan finns uppföljningsdata. Trots att tester med fördel kunde utföras på färsk vävnad,

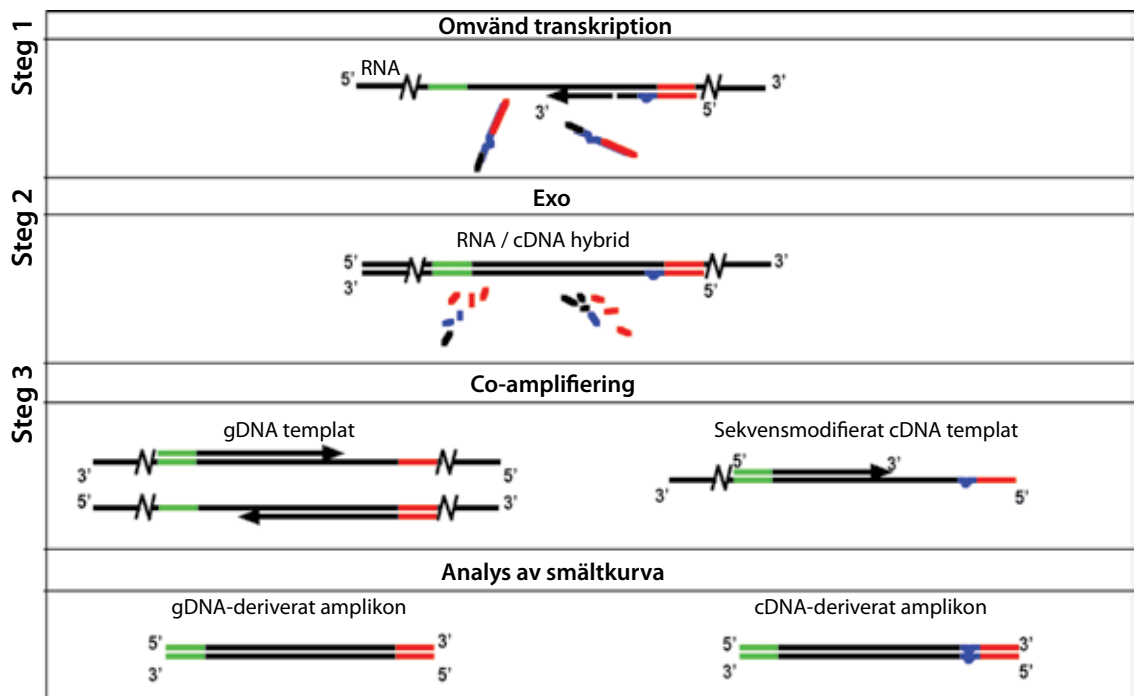
är så gott som allt arkivmaterial formalinfixerat och ingjutet i paraffin. Med nuvarande metoder är det svårt att mäta genuttrycket i formalinfixerade vävnadsprover på grund av att mRNA i proverna har spjälkats under fixeringen och lagringen (6, 7). För detta ändamål har vi utvecklat en ny metod: Genome Controlled RT-PCR som möjliggör exakt och reproducerbar genuttrycksanalys utgående från små cell- eller vävnadsprover samt från formalinfixerade vävnadsprover ingjutna i paraffin (8, 9). Med hjälp av denna metod kan prognostiska kandidatgener testas på stora arkivmaterial i syfte att utveckla en ny typ av cancerdiagnostiska analyser för riskbedömning samt olika vårdformers potentiella effektivitet på individnivå. Vi strävar efter att karaktärisera tumörer ur flera olika perspektiv genom att utveckla genpaneler för analys av regleringen av cellcykeln, tillväxt och lokal invasion, metastaseringspotential samt neo-vaskularisering. För att så effektivt som möjligt kunna tolka och utnyttja resultaten utvecklar vi statistiska multivariatmodeller för varje enskild genpanel.

FÖRFATTAREN

MD **Jakob Stenman** är barnkirurg på enheten för transplantation och leverkirurgi vid Kirurgiska sjukhuset, HNS och forskar både vid Haartmaninstitutet och Minerva.

Metoden genomkontrollerad RT-PCR i ett nötskal

Den kvantitativa analysen av RNA-uttrycket i cell- eller vävnadsprover består av en tudelad process: cDNA-syntes och behandling med exonukleas samt PCR-amplifiering med kvan-



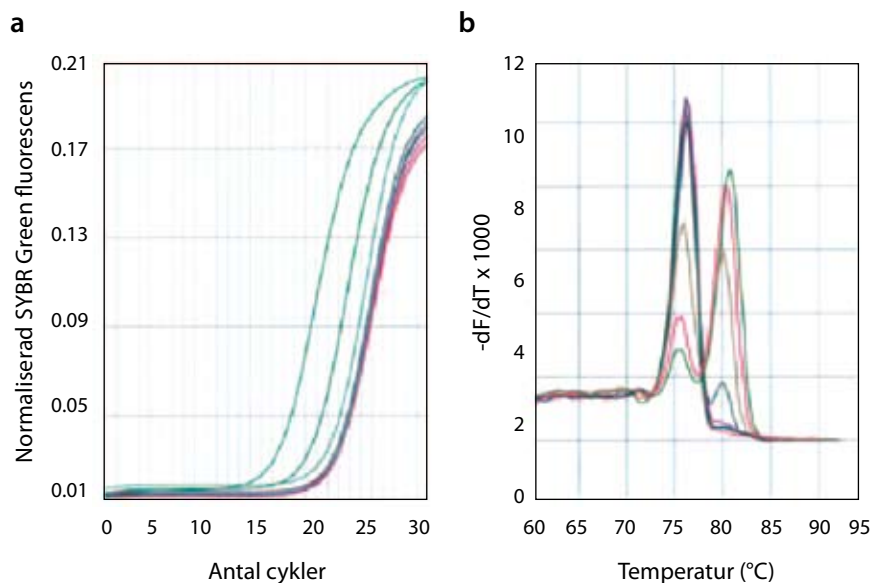
Figur 1. Schematisk överblick över metoden genomkontrollerat RT-PCR. Sekvensmodifierade primrar används i steg 1 för att åstadkomma en märkning av det syntetiserade cDNA:t. Dessa primrar avlägsnas genom behandling med exonukleas före amplifieringsfasen. Genomiskt DNA tillsätts varje prov som sedan uppdelas i separata genspecifika amplifieringsreaktioner. Kvantitativ mätning av PCR-produkter som härstammar från cDNA- och genomiskt DNA görs efter amplifieringen med analys av smältkurvan.

titativ analys av smältkurvan (melting curve). Metoden baserar sig på relativ kvantifiering av modifierat cDNA jämfört med genomiskt DNA. Normalt genomiskt DNA tillsätts i varje prov och används som en universell intern standard för människans alla gener. Under cDNA-syntesen modifieras sekvensen i cDNA jämfört med RNA-templetet med hjälp av primrar där några nukleotider bytts ut. På det här sättet kommer den modifierade cDNA-sekvensen att inkorporeras i motsvarande PCR-produkter i amplifieringsfasen där cDNA och genomiskt DNA amplifieras kompetitivt i samma rör och med samma primersekvenser. Eftersom varje gen är lika representerad i genomet i normalt DNA, återspeglar den relativa nivån av modifierat cDNA jämfört med genomiskt DNA den ursprungliga mängden cDNA. Dessa relativa cDNA-/DNA-värden kan sedan användas för att jämföra uttrycket av mRNA från olika gener i det ursprungliga provet. Efter cDNA-syntesen avlägsnas resterande modifierade primersekvenser med exonukleasbehandling för att hin-

dra en fortsatt modifiering av PCR-produkter under amplifieringsfasen (Figur 1). Efter att amplifieringsreaktionen har avslutats, värms proverna långsamt upp under fyra minuter i en analys av smältkurvan. I det här skedet mäter man minskningen i fluorescens då de dubbelsträngade PCR-produkterna smälter. Modifierat cDNA och genomiskt DNA smälter vid olika temperaturer med en skillnad på ca 2–3 °C (Figur 2). Mängden smältande DNA kan noggrant mätas genom integrering av de toppar som uppstår efter negativ derivivering av spektret för smältkurvan.

Provhantering och analys

RNA har isolerats från över 2 000 formalinfixerade vävnadsprover ingjutna i paraffin som arkiverats och förvarats i upp till 30 år. Från de här blocken stansas en till två cylindriska provbitar men en diameter på 1 mm. Provbitarna kokas i 30 minuter i en kaotrop lösning av guanidin-tiocyanat som effektivt inaktiverar RNA:s enzymer. Från detta ho-



Figur 2. Panel a: PCR-amplifiering och analys av smältkurvan av en 10:1 utspädningsserie av cDNA syntetiserat från 10^{10} kopior trypsinogen-1 cRNA. cDNA motsvarande $10 \cdot 10^8$ kopior cRNA amplifierades kompetitivt mot 20 ng genomiskt DNA. Panel b: Analysen av smältkurvan särskiljer de två komponenterna i PCR-produkten på basis av en skillnad i smälttemperatur.

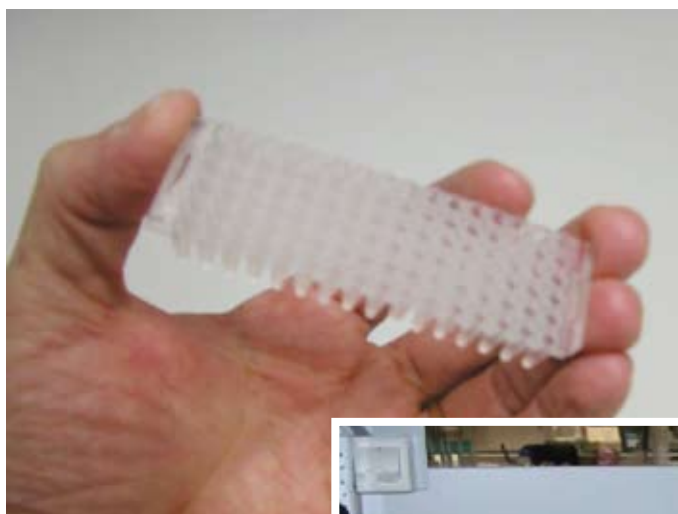
mogenat isoleras RNA med en modifierad version av Chomczynskis och Sacchis klassiska fenolextraktionsmetod. Det kristalliserade RNA löses i renat vatten och förvaras i -80°C fram till analysen. För varje prov görs cDNA-syntesen särskilt i 20 μl reaktioner. Dessa behandlas med exonukleas, genomiskt DNA tillsätts och provet fördelas i separata 10 μl PCR-reaktioner. Vid en typisk analys av 16 gener fördelas varje prov i 48 separata PCR reaktioner. Pipetteringen görs med hjälp av en liten pipetteringsrobot i 384-format som på ca 40 min. fyller fyra 96-gropars PCR-plattor. PCR-amplifieringen görs i 35 cykler under ca 40 min med en avslutande analys av smältkurvan på 4 min. Med fyra stycken 96-gropars PCR-apparater klarar vi av att analysera ca 40 prover om dagen (Figur 3).

Kliniska studier

Prognosbedömning vid tjocktarmscancer

Tjocktarmscancer är en av de vanligaste cancerformerna hos både män och kvinnor i utvecklade länder. Diagnosen kommer ofta sent i och med att sjukdomen sällan ger upphov till symptom förrän primärtumören redan är relativt stor. I detta skede genomgår patienterna i de flesta fall en operation där

man avlägsnar den del av tarmen där tumören finns, samt även lokala lymfkörtlar för att bedöma graden av eventuell spridning. Enligt Dukes klassifikation indelas tjocktarmscancer i stadier från A till D. I det vanligaste stadiet, Dukes B, har tumören vuxit genom tarmväggen men inte invaderat lokala lymfkörtlar. I denna patientgrupp är risken för att sjukdomen ska recidivera efter operationen ca 20 procent om ingen annan behandling ges. Cellgiftsbehandling minskar denna risk men medför samtidigt både morbiditet i form av biverkningar samt kostnader för även de ca 80 procent av patienterna som redan botats med operation och därmed inte har någon nytta av ytterligare behandling. Syftet med forskningsprojektet är att vid behandling av Dukes B koloncancer identifiera förändringar i genuttrycket som korrelerar med tumörens aggressivitet och med en förhöjd risk för återfall. Vi strävar efter att utveckla laborietester som kunde underlätta valet av behandlingsstrategi efter primäroperation av dessa patienter. Genom att jämföra RNA-uttrycksmönster i arkiverade vävnadsprover med motsvarande kliniska data hoppas vi kunna identifiera kliniskt relevanta gener samt kombinationer av gener för individuell riskbedömning.



Figur 3.
PCR-amplifiering och analys av smältkurvan görs i 10 μ l-reaktioner. Då 16 gener analyseras, fördelas varje prov i 48 gropar. Reaktionsvolymen är 10 μ l, och pipetteringen sker med robot för att eliminera fel och påskynda analysen.

Bröstcancer, bedömning av behandlingsstrategi och prognosbedömning

Bröstcancer är den vanligaste formen av cancer hos kvinnor i Finland i dag och drabbar en av åtta kvinnor i något skede av livet. Under de senaste decennierna har stora framsteg gjorts i behandlingen av bröstcancer i och med att flera nya specifika läkemedel har utvecklats. Dessutom har tidig diagnos på grund av sällning förbättrat behandlingsresultaten avsevärt. Trots detta utgör sjukdomen fortfarande ett stort problem i och med den höga incidensen. Projektet är indelat i två separata grenar. Målsättningen är dels att identifiera prognostiska modeller som baserar sig på individuell genuttrycksprofilering för patienter med tidigt diagnostiserad bröstcancer (pT1N0M0). I den andra grenen av forskningsprojektet är vi ute efter att utveckla ett diagnostiskt test som innefattar mål-molekyler för alla specifika cytostatika som för närvarande används. Genom att jämföra RNA-uttrycksmönster i

arkiverade vävnadsprover med kliniska data som insamlats i samband med olika kliniska studier och senare kompletterats, hoppas vi att kunna utveckla tester för att göra riskbedömningar men framför allt för att kunna skraddarsy den medicinska behandlingen av bröstcancer individuellt för varje patient.

Diagnostik av premaligna tillstånd i matstrupan

Barrets esofagus är en förändring av slemhinnan i nedre delen av matstrupan, s.k. intestinal metaplasi, som uppkommer vid långvarig gastroesofageal reflux. Denna förändring kan upptäckas kliniskt vid gastroskopi, och diagnosen fastställs histologiskt från biopsier tagna från det drabbade området. Barrets esofagus innebär en klart förhöjd cancerrisk, och dödligheten i matstrupscancer är mycket hög om sådan cancer utvecklas. Tidigare var partiell esofagektomi den enda möjligheten till definitiv behandling. Sedan några år till-

baka är det möjligt att genom ett relativt litet gastrokopiskt ingrepp skala bort den sjuka slemhinnan om den anses innebära en betydligt förhöjd cancerrisk. Målet med projektet är att analysera frysta biopsier från patienter med Barrets esofagus samt från kontrollpatienter för att utveckla ett test som bättre kunde förutspå en förhöjd cancerrisk än nuvarande histologiska metoder.

Diagnostik av förändringar i gallvägarna

Primär skleroserande kolangit (PSC) är en sjukdom som orsakar inflammation och förträngningar i gallvägarna. Sjukdomen förekommer ofta i samband men ulcerativ kolit. PSC innebär en förhöjd risk för gallvägscancer. Denna form av cancer är i de flesta fall en obotlig sjukdom, och den enda kurerande åtgärden är förebyggande levertransplantation. För tillfället finns inga pålitliga markörer för en förhöjd cancerrisk hos PSC-patienter. Vi strävar efter att utveckla undersökningar av genuttrycket i celler tagna som ett borstprov i samband med en ERCP-undersökning. Syftet är att utveckla en metod för bedömning av den optimala tidpunkten för levertransplantation.

Prognosbedömning vid prostatacancer

Prostatacancer är i dag den vanligaste formen av cancer hos män. I och med omfattande användning av PSA-tester har antalet fall av upptäckt prostatacancer ökat dramatiskt under de senaste tio åren. Det finns flera olika vårdformer för prostatacancer, och därtill används aktiv uppföljning som ett alternativ till behandling i många fall. Till de alternativa vårdformerna hör operation, strålbehandling och hormonbehandling. De kan användas var för sig eller i olika kombinationer beroende på patientens ålder och allmäntillstånd samt sjukdomens stadium. Vi undersöker genuttrycksmönster i operationspreparat från arkiverade vävnadsprover och jämför dessa med motsvarande kliniska data. Målet är att hitta genkombinationer vars uttryck korrelerar med tumörens beteende på lång sikt samt med responsen på olika vårdformer.

Konklusion

I och med utvecklingen av ett stort antal nya specifika läkemedel har betydelsen av att kunna rikta olika vårdformer ökat med hänsyn till både behandlingsresultat och kostnader. Genom att bestämma mRNA-uttrycksprofiler på grupper av prognostiskt signifikanta gener i vävnads- eller cellprover strävar vi efter att förbättra den prognostiska precisionen och underlätta valet av behandlingsstrategi på individnivå. Vi försöker bygga upp en omfattande repertoar av genpaneler för undersökning av centrala cellfunktioner med tanke på diagnos och monitorering av olika cancerformer samt premaligna sjukdomstillstånd. Etiska lov har beviljats för alla delprojekt och studierna genomförs i nära samarbete med de kliniker som har ansvaret för insamlingen av uppföljningsdata. Forskningsprojektet har stötts finansiellt av Tekes, Finska Läkaresällskapet och Minervastiftelsen. Metoden Genome controlled RT-PCR utvecklas i samarbete med Finnzymes Oy.

MD Jakob Stenman
Medicinska Forskningsinstitutet Minerva
Biomedicum 2U
Stockholmsgatan 8
00290 Helsingfors
jakob.stenman@helsinki.fi

Referenser

1. Alizadeh AA, Ross DT, Perou CM, van de Rijn M. *J Pathol.* 2001 Sep;195(1):41–52.
2. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. *N Engl J Med.* 2004 Dec 30;351(27):2817–26.
3. O'Shaughnessy JA. *N Engl J Med.* 2006 Aug 10;355(6):615–617.
4. Potti A, Mukherjee S, Petersen R, Dressman HK, Bild A, Koontz J, Kratzke R, Watson MA, Kelley M, Ginsburg GS, West M, Harpole DH Jr, Nevins JR. *N Engl J Med.* 2006 Aug 10;355(6):570–580.
5. Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DS, Nobel AB, van't Veer LJ, Perou CM. *N Engl J Med.* 2006 Aug 10;355(6):560–569.
6. Stenman J, Finne P, Ståhls A, Grénman R, Stenman UH, Palotie A, Orpana A. *Nat Biotechnol.* 1999 Jul;17(7):720–722.
7. Stenman J, and Orpana, A. *Nat Biotechnol.* 2001 Nov;19(11):1011–2.
8. Stenman J, Paju A, Rissanen O and Orpana A. *European Patent Register; WO2005116248A1, pending*
9. Stenman J, Paju A, Rissanen O, Tenkanen T, Haglund C, Räsänen J, Salo J, Stenman UH, Orpana A. *Clin Chem.* 2006 Nov;52(11):1988–96.