Dietary factors and K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer

Summary

Current epidemiological evidence for associations between dietary factors with overall colorectal cancer (CRC) risk is weak or inconsistent. This could be due to methodological factors such as study design, selection bias and information bias. It could also be due to the heterogeneity of the cancer endpoint that is studied. Subtypes of colorectal cancer patients could be distinguished by the absence or presence of alterations in genes involved in the development of colorectal cancer. Therefore, more insight in the aetiology of colorectal cancer can be obtained by studying the associations between dietary factors and alterations in genes involved in the early development of cancer. The majority (95%) of colorectal cancer is non-hereditary, i.e sporadic, and develops from small adenomatous polyps through a well-defined sequence of cytological changes and this development is associated with the accumulation of alterations in tumour suppressor genes and oncogenes regulating cell division and growth. Among the early alterations that occur in 40% of the colorectal carcinomas are somatic mutations in the *K-ras* oncogene. Approximately 90% of the activating mutations in this gene is found in codons 12 and 13 of exon 1 and around 5% in codon 61 located in exon 2. The most prevalent point mutations in exon 1 are the G>A transitions, the G>T transversions and the G>C transversions. The aim of this molecular epidemiological study was to obtain more insight in the associations between dietary factors and the risk of colorectal tumours with or without specific point mutations in exon 1 of the *K-ras* oncogene.

The studies described in this thesis are embedded in The Netherlands Cohort Study on diet and cancer (NLCS). The NLCS was initiated in 1986 and includes 58,279 men and 62,573 women (55-69 years of age) who originated from 204 Dutch municipalities with computerized population registries and who completed a self-administered questionnaire on diet, family history of cancer and other risk factors for cancer. The entire cohort is monitored for cancer occurrence by annual linkage to The Netherlands Cancer Registry (NCR) and to PALGA, a nationwide network and registry of histo- and cytopathology. Accumulation of person-time in the cohort has been estimated through biennial vital status follow-up of a subcohort of 3,500 men and women who were randomly selected after baseline exposure measurement. After 7.3 years of follow-up and with the exclusion of the first 2.3 years, 929 incident cases with histologically confirmed CRC were observed of whom 819 could also be linked to a PALGA report of the lesion. The tumour tissue samples of these 819 cases were distributed over 54 pathology laboratories throughout The Netherlands. After approval of the Medical Ethical committees, PALGA, the pathologists and the NCR the tissue blocks were made available for this study. Of the 819 tumour tissue samples that were identified, 775 (95%) could be traced and for 737 of these (95% of the available blocks), the *K-ras* mutation status of exon 1 (including exons 12 and 13) could be determined.

In **chapter 1** an overview is presented of the associations between dietary factors and colorectal cancer, and of the (genetic) development of colorectal cancer with special attention for the *K-ras* oncogene. Although much research is performed on diet and colorectal cancer so far, there are still only few studies available on the associations between dietary factors and *K-ras* oncogene mutations in colorectal cancer.

The frequency of *K-ras* oncogene mutations in tumours of incident colorectal cancer patients from the NLCS is described in **chapter 2**. Moreover, the method of mutation detection used in the current study, i.e. direct sequencing of amplified and purified *K-ras* gene fragments, was validated by the confirmation of reported *K-ras* mutation status in CRC cell lines and by a good correlation between fresh-frozen and routinely-fixed, paraffin-embedded tissue The detection limit of mutated DNA was 5%. The reported frequency of *K-ras* mutations was observed to be 37% among 737 incident colorectal cancer patients, with codons 12 and 13 as the most frequently affected codons (94%). The G>A transition and the G>T and G>C transversions were the most frequently observed point mutations, with the G>T transversion primarily confined to codon 12. Rectal tumours were found to have the

highest frequency of G>T transversions, as compared to colon or rectosigmoid tumours. Stratification by gender revealed that this difference was confined to the female patients. No significant differences between tumours with or without specific *K-ras* mutations were observed for Dukes' stage or tumour differentiation grade.

Subsequently, associations between several dietary factors and the risk of colon or rectal tumours with or without *K-ras* gene mutations were studied. The choice of dietary factors evaluated in the current thesis was based on biological mechanisms underlying the development of specific *K-ras* mutations in colorectal cancer. Differences in the *K-ras* mutation pattern at various subsites in the colorectal tract and in the aetiology of colon and rectal cancer have been reported, and therefore, summarised results from the NLCS are presented separately for colon and rectal cancer (chapters 3 through 5). Patients with a rectosigmoid tumour (n=85) were excluded due to the criterion for classifying rectosigmoid tumours and due to the small number of patients for adequate stratified analyses regarding the *K-ras* mutation status.

It was hypothesized that high levels of heterocyclic aromatic amines (HAA), generated by high temperature cooking of meat proteins, and polycyclic aromatic amines (PAH) originating from grilling and smoking of meat contribute to the occurrence of *K-ras* point mutations. In **chapter 3**, associations between the intake of (several types of) meat, meat products and fish, and the risk of colon or rectal tumours with or without a *K-ras* mutation. Significant associations were mainly observed between meat and meat products and tumours with a wild type *K-ras* gene. A high consumption of beef and meat products was associated with an increased risk of wild type *K-ras* tumours in the colon, but not in the rectum. A high consumption of pork was inversely related with wild type *K-ras* tumours in both colon and rectum. Based on these results, it was concluded that high consumption of (several types of) meat and meat products may be relevant for the aetiology of colon and rectal cancer.

Based on experimental results, it was hypothesized that ω-6 polyunsaturated fat (PUFA) peroxidation leads to the formation and accumulation of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. These by-products could form DNA-adducts with guanine bases which finally may result in G>A transitions or G>T transversions. Is a high ω-6 PUFA intake associated with an increased risk of G>A transitions or G>T transversions in the *K-ras* gene of colon and rectal cancer patients? This was the aim of **chapter 4**. Null findings were observed for the intakes of total fat, saturated fat, monounsaturated fat and ω-3 PUFA, and colon and rectal cancer, overall and also after the *K-ras* mutation status was taken into account. Intake of dietary PUFA (total intake of ω-3 and ω-6 fatty acids) and specifically linoleic acid (as the main source of ω-6 fatty acids) was associated with an increased risk of mutated *K-ras* colon tumours. Similar associations were observed for the specific *K-ras* point mutations, i.e. the G>A transitions, G>T and G>C transversions, in colon tumours. For rectal cancer, however, no associations were observed with overall risk or with *K-ras* mutation status. Possibly, intake of PUFA, especially the ω-6 PUFA, is associated with an increased risk of colon tumours with a *K-ras* gene mutation.

Folate plays an important role in one-carbon metabolism, in DNA synthesis and in methylation of DNA and proteins. Deficient folate intake may generate genomic instability through reduced availability of thymine for DNA synthesis and through increased incorporation of uracil, which may lead to more DNA strand breaks. In addition, global genome hypomethylation and regional hypermethylation in gene promoters could occur as another result of deficient folate intake. In **chapter 5** the relation between folate and *K-ras* mutation status in colon or rectal cancer patients was studied. For men, folate appears to be inversely associated with the overall risk of rectal cancer, and this association was confined to mutated *K-ras* tumours. For women, however, an increased association was observed between high folate intake and the risk of overall rectal cancer. With respect to the *K-ras*

mutation status, the increased association remained for both wild type and mutated *K-ras* tumours. Moreover, this increased association was confined to rectal tumours harbouring G>T and G>C transversions, whereas a significant inverse association was observed with rectal tumours harbouring a G>A transition. Folate seems to play a role in the aetiology of rectal cancer through the involvement of the *K-ras* oncogenes. Results from this study indicate that future molecular epidemiological research on folate intake need to account for sex differences.

In **chapter 6**, the most important findings of our study are summarized and compared with the findings of other relevant molecular epidemiological studies. Overall, our results suggest that meat, fat and folate appear to be of less importance for the risk of colon and rectal tumours with specific point mutations in the *K-ras* gene than was attributed to these factors at the start of the study. However, these factors may be of aetiological importance for the risk of colon or rectal tumours with a wild type *K-ras* gene. In addition, the possibilities and pitfalls of molecular epidemiological studies are discussed in this chapter. Moreover, other genetic factors are pointed out which can be studied in future molecular epidemiological research. This study shows that incorporating molecular endpoints in classical epidemiological studies of diet and cancer is a relevant approach the aetiology of colon and rectal cancer.

Samenvatting

Epidemiologische studies hebben tot nu toe zwakke of tegenstrijdige relaties laten zien tussen voedingsfactoren en het risico op kanker van de dikke darm (colorectum: colon, rectosigmoïd en rectum). Dit kan te maken hebben met methodologische factoren zoals de onderzoeksopzet, selectiebias en informatiebias. Een andere verklaring kan zijn dat dikke darmkanker te heterogeen is om beschouwd te kunnen worden als één ziektebeeld. Mogelijk zijn er meerdere subgroepen van patiënten te onderscheiden door ze in te delen op basis van de af- of aanwezigheid van afwijkingen in genen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van dikke darmkanker. Meer inzicht in het ontstaan van dikke darmkanker kan worden verkregen door de relaties te onderzoeken tussen voedingsfactoren en afwijkingen in genen die betrokken zijn bij de vroege ontwikkeling van kanker. Het merendeel (ongeveer 95%) van dikke darmkanker behoort tot de sporadische vorm, dat wil zeggen dat ze niet zijn ontstaan uit erfelijke genetische afwijkingen. Volgens het gangbare model voor de ontwikkeling van dikke darmkanker ontstaan de meeste tumoren uit adenomateuze poliepen in een stapsgewijs proces. Tijdens dit proces stapelen afwijkingen zich op in tumor-suppressor-genen en oncogenen die de groei en differentiatie van dikke darmcellen reguleren. Somatische mutaties in het *K-ras* gen behoren tot de vroege veranderingen die plaatsvinden in een aanzienlijk deel (40%) van tumoren in de dikke darm. De meeste mutaties in dit gen (90%) worden gevonden in codons 12 en 13 van exon 1 en een klein deel (5%) wordt gevonden in codon 61 in exon 2. De puntmutaties in exon 1 zijn vooral G>A transities, G>T transversies en G>C transversies. Het doel van dit moleculair-epidemiologisch onderzoek was om meer inzicht te krijgen in de relatie tussen verschillende voedingsfactoren en het risico op dikke darmkanker waarbij onderscheid is gemaakt tussen tumoren met en tumoren zonder specifieke mutaties in exon 1 van het *K-ras* gen.

De studies die in dit proefschrift beschreven staan, zijn uitgevoerd binnen het kader van de Nederlandse Cohort Studie naar voeding en kanker (NLCS). De NLCS is gestart in 1986 met ruim 120.000 mannen en vrouwen (55-69 jaar) in 204 Nederlandse gemeenten met een geautomatiseerd bevolkingsregister, verspreid over het land. Bij de aanvang hebben de deelnemers een lijst met vragen over voedingsgewoonten, kanker in de familie en andere risicofactoren voor kanker ingevuld. Vervolgens is het optreden van kanker bij de deelnemers nagegaan door middel van jaarlijkse koppelingen met de Nederlandse Kanker Registratie (NKR) en met het Pathologisch Anatomisch Landelijk Geautomatiseerd Archief (PALGA). Tevens is bij aanvang van de NLCS een aselect subcohort gekozen, bestaande uit 3500 mannen en vrouwen, waarmee de persoonstijd voor het totale cohort wordt geschat. Na 7,3 jaar follow-up, met uitzondering van de eerste 2,3 jaar, werden 929 patiënten met dikke darmkanker geïdentificeerd met behulp van koppeling met de NKR. Voor 819 van de 929 patiënten was ook een PALGA rapport beschikbaar. De paraffine-blokjes met het tumorweefsel van deze 819 patiënten waren opgeslagen in 54 pathologie laboratoria verspreid door heel Nederland. Na toestemming door de betrokken medisch-ethische commissies, PALGA, de pathologen en de NKR was het weefsel voor deze studie beschikbaar. In totaal kon voor 775 van de 819 patiënten (95%) het tumormateriaal worden teruggevonden. Voor 737 van hen (95% van de beschikbare weefselblokjes) kon de *K-ras* mutatie status van exon 1 (waarin codons 12 en 13 zijn gelocaliseerd) worden bepaald.

In **hoofdstuk 1** wordt een literatuuroverzicht gegeven van de relaties tussen voeding en dikke darmkanker, en van de (genetische) ontwikkeling van dikke darmkanker met daarbij speciale aandacht voor het *K-ras* gen. Alhoewel veel onderzoek is verricht naar voeding en dikke darmkanker, zijn er maar weinig studies geweest naar de relatie tussen voeding en *K-ras* mutaties.

In **hoofdstuk 2** is de frequentie van *K-ras* mutaties in tumoren van de incidente dikke darmkanker patiënten uit de NLCS beschreven. Tevens werd de mutatiedetectie-techniek, namelijk het op directe wijze bepalen van de basenvolgorde van geamplificeerde en gezuiverde *K-ras* genfragmenten, op verschillende manieren gevalideerd. De detectielimiet

werd bepaald op 5% gemuteerd DNA. Er werd een goede correlatie gevonden tussen de bepaling van *K-ras* mutaties in gevroren tumorweefsel en in gefixeerd, paraffine-ingebed tumorweefsel. Tevens konden de *K-ras* gen mutaties die beschreven zijn in cellijnen afkomstig van dikke darmkanker met onze techniek worden bevestigd. Uiteindelijk werd bij 37% van de 737 patiënten een mutatie in het *K-ras* gen gevonden. De meest voorkomende types puntmutaties zijn G>A transities, en G>T en G>C transversies, waarbij G>T transversies voornamelijk in codon 12 werden gedetecteerd. Tevens werden G>T transversies vooral in rectum tumoren bij vrouwen gevonden. Er werden geen significante verschillen aangetoond voor Dukes' stadiëring of tumordifferentiatie tussen tumoren met of zonder specifieke *K-ras* mutaties.

Vervolgens werd onderzocht of bepaalde voedingsfactoren geassocieerd zijn met het risico op colon of rectum tumoren met of zonder een *K-ras* mutatie. De keuze van de bestudeerde voedingsfactoren in dit proefschrift is gebaseerd op de kennis van de biologische mechanismen die ten grondslag liggen aan deze *K-ras* mutaties. De resultaten in hoofdstukken 3 tot en met 5 zijn apart gepresenteerd voor colon en rectum kanker aangezien gerapporteerd is dat er verschillen bestaan tussen *K-ras* mutatiepatronen in de diverse sublokalisaties van de dikke darm, en dat colon- en rectumkanker mogelijk een verschillende etiologie hebben. Patiënten met een rectosigmoïd tumor werden uitgesloten voor verdere analyses, omdat 1) het classificeren van een tumor in het rectosigmoïd niet gebeurt volgens een duidelijk criterium en 2) het aantal patiënten met een rectosigmoïd tumor te klein was om adequate analyses te kunnen uitvoeren.

Er zijn vele studies die erop wijzen dat hoge concentraties van heterocyclische aromatische amines, die ontstaan als vlees op zeer hoge temperatuur wordt verhit, en van polycyclische aromatische amines, die gevormd worden door vlees te grillen of te roken, *K-ras* puntmutaties kunnen veroorzaken. In **hoofdstuk 3** worden associaties tussen de inname van (verschillende soorten) vlees, vleeswaren en vis en het risico op colon- of rectumtumoren met of zonder een *K-ras* mutatie beschreven. Een hoge consumptie van rundvlees en vleeswaren bleek significant geassocieerd te zijn met een verhoogd risico op tumoren met een wild type *K-ras* gen in het colon, maar niet in het rectum. Een hoge consumptie van varkensvlees was geassocieerd met een verlaagd risico op tumoren met een wild type *K-ras* gen in zowel het colon als het rectum. Op basis van de resultaten van deze studie werd geconcludeerd dat een hoge inname van (verschillende soorten) vlees en vleeswaren relevant kan zijn voor de etiologie van colon- en rectumkanker.

Een hoge inname van vetten lijkt ook een rol te spelen bij het ontstaan van colon- en rectumkanker. Uit experimentele studies blijkt dat peroxidatie van ω-6 poly-onverzadigd vet, dat via de voeding wordt opgenomen, leidt tot vorming van malonaldehyde en 4-hydroxy-nonenal. In dierexperimenteel onderzoek is aangetoond dat deze producten leiden tot DNA-adducten aan guanine basen, welke uiteindelijk worden omgezet in G>A transities en G>T transversies. Is een hoge inname van ω-6 poly-onverzadigd vet geassocieerd met een verhoogd risico op G>A transities dan wel G>T transversies in het *K-ras* gen in patiënten met colon of rectum kanker? Deze vraag komt aan de orde in **hoofdstuk 4**. Er zijn geen significante associaties gevonden tussen de inname van totaal vet, verzadigd vet en mono-onverzadigd vet enerzijds en het risico op colon en rectum kanker anderzijds, ook niet nadat rekening is gehouden met de *K-ras* mutatiestatus. Een hoge inname van poly-onverzadigd vet (de totale inname van ω-3 en ω-6 poly-onverzadigde vetzuren) en meer specifiek van linolzuur (een hoofdbron van ω-6 poly-onverzadigd vet) zijn wel geassocieerd met een verhoogd risico op colontumoren met een *K-ras* mutatie en deze associatie blijkt onafhankelijk van het type mutatie in de tumor. Voor rectumkanker werden deze relaties echter niet gevonden. Dus, een hoge inname van poly-onverzadigd vet blijkt relevant voor de ontstaanswijze van colon tumoren met een *K-ras* mutatie.

Foliumzuur speelt een belangrijke rol in het koolstofmetabolisme, in de synthese van DNA en in de methylering van DNA en eiwitten. Te weinig inname van foliumzuur kan leiden tot instabiliteit van het genoom; breuken in DNA-ketens kunnen ontstaan doordat thymine onvoldoende voor de DNA-synthese beschikbaar is en doordat er een verhoogde inbouw van uracil plaatsvindt. Tevens kan globale hypomethylering van het hele genoom en regionale hypermethylering in de promotorregio's van genen optreden door een deficiënte foliumzuurinname. In **hoofdstuk 5** wordt de relatie tussen foliumzuurinname en *K-ras* mutaties in patiënten met colon- of rectum kanker beschreven. In deze studie werden verschillen gevonden voor mannen en vrouwen. Een hoge foliumzuurinname blijkt geassocieerd te zijn met een verlaagd risico op rectumtumoren bij mannen, ongeacht de *K-ras* mutatiestatus. Echter, bij vrouwen werd een verhoogd risico op rectumtumoren gevonden. Dit verhoogd risico werd gevonden voor tumoren met *K-ras* mutaties, maar ook voor tumoren met een wild type *K-ras* gen. Interessant is dat een hoge inname van foliumzuur bij vrouwelijke patiënten met een *K-ras* gemuteerde tumor een sterk beschermend effect blijkt te hebben voor G>A transities. Foliumzuur lijkt een duidelijke rol te spelen in de ontwikkeling van rectumkanker, en het *K-ras* gen lijkt hierbij betrokken te zijn. Deze studie toont ook aan dat in toekomstig moleculair epidemiologisch onderzoek naar foliumzuur de man-vrouw verschillen moeten worden meegenomen.

In **hoofdstuk 6** wordt een slotbeschouwing gegeven waarin de belangrijkste bevindingen van onze studie worden samengevat en vergeleken met andere moleculair epidemiologische studies. De resultaten suggereren dat een hoge inname van vlees en vet en een lage inname van foliumzuur van minder groot belang zijn op het risico van die colon of rectum tumoren met puntmutaties in het *K-ras* gen dan was verondersteld. Echter, deze factoren kunnen van etiologisch belang zijn voor het risico op colon of rectum tumoren met een wild type *K-ras* gen. Tevens worden de mogelijkheden en beperkingen van moleculair epidemiologische studies besproken. Ook wordt in dit hoofdstuk aangegeven welke andere genetische factoren in toekomstig moleculair epidemiologisch onderzoek kunnen worden bestudeerd. Deze studie laat zien dat het inbouwen van moleculaire eindpunten in de klassieke epidemiologische onderzoeken naar voeding en kanker een relevante aanpak is om de etiologie van colon- en rectumkanker gedeeltelijk op te helderen.