

AVSPÄRRAT

FÖR REPARATION !

Nytt sätt att blockera förmåga att **reparera** vid **strålbehandling**

Hälften av alla cancerpatienter kommer att strålbehandlas någon gång under sin cancerbehandling. Ny forskning från Karolinska Institutet visar nu att det går att blockera cancercellernas förmåga att reparera sin arvs massa vid strålbehandling och därmed stoppa cancercellernas överlevnad.

Det skriver assisterande professor **Nina Gustafsson** i en sammanfattning av en ny studie som publicerats i Nature Communications. Hon och hennes forskarlag hoppas att upptäckten kan ligga till grund för nya sätt att behandla cancer i framtiden.



cancercellens arvsmassan

Vår arvsmassa utgörs av deoxiribonukleinsyra, DNA, som består av två DNA-strängar lindade runt varandra som en spiral och innehåller den genetiska information som man kan se som programkoden som krävs för att vi ska kunna växa, utvecklas och fungera. Eftersom vårt DNA innehåller en enormt viktig information har våra celler utvecklat en rad eleganta system för att upptäcka och reparera för cellen farliga skador på DNA:t. Varje dag sker det i varje cell i vår kropp ungefär 50 så kallade dubbelsträngsbrott i vårt DNA, det dubbelsträngade DNA:t bryts helt av. När dubbelsträngsbrott sker stannar cellen i sin tillväxt och celledelning för att reparera sitt DNA, detta sker omedelbart genom en signalkaskad av proteiner som aktiveras i tur och ordning för att markera var skadan skett, reparera den och stanna celledelningen så länge som behövs för att reparationen ska bli fullständig. Detta system är till för att säkerställa cellens överlevnad och för att säkerställa att dottercellerna ska ha varsin korrekt och intakt kopia av

arvsmassan, om skadan är för stor för att reparera så genomgår cellen programmerad celldöd. Forskning har visat att så mycket som ett oreparerat dubbelsträngsbrott räcker för att en cell ska dö, med andra ord är det livsviktigt för cellen att ha en fungerande DNA-reparation.

ORSAKAR DUBBELSTRÄNGSBROTT

Att våra celler är så känsliga för skador på sitt DNA är något man utnyttjar vid cancerbehandling. Idag får de flesta cancerpatienter DNA-skadande mediciner såsom cytostatika och strålbehandling. Strålningsterapi verkar genom att orsaka dubbelsträngsbrott i DNA:t och anses efter operation vara den mest botande behandlingen vid cancer. Ungefär hälften av alla cancerpatienter genomgår strålningsterapi någon gång under sin cancerbehandling. Vid behandlingen koncentreras strålningen mot området där canceren är lokaliserad. Men hur påverkas normalvävnaden kring tumören vid strålbehandling?

••• strålbehandling

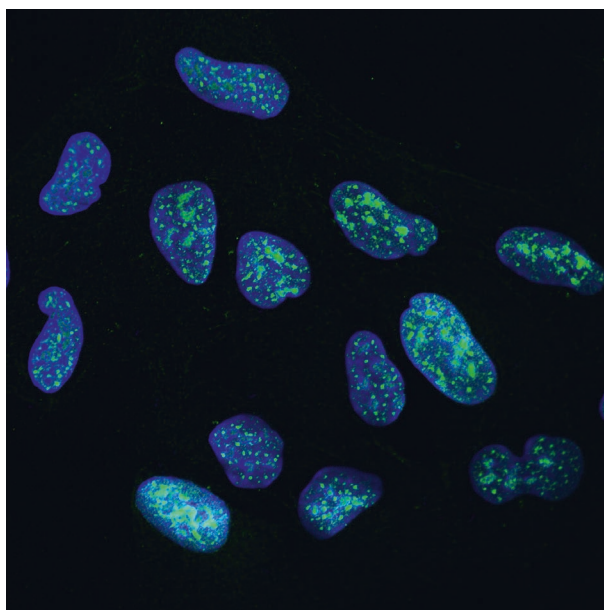
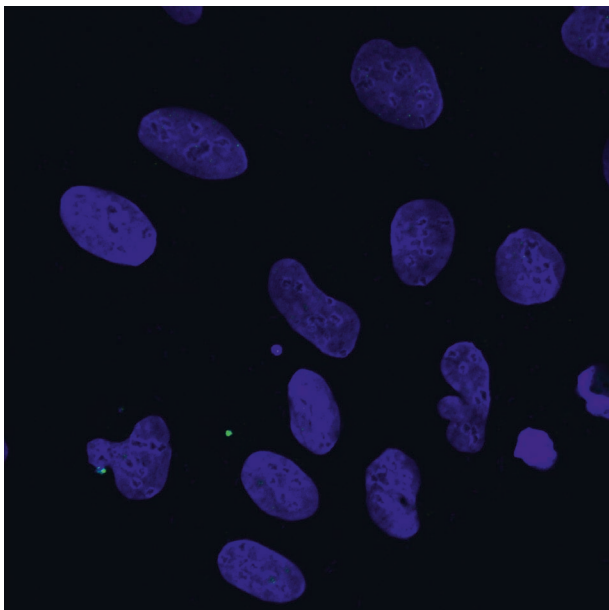


Bild tagen med konfokalmikroskop på en osteosarkomcell före strålbehandling (bild till vänster) och en halvtimme efter strålbehandling (bilden till höger). Cellkärnan syns i blått och PFKFB3 i grönt. Det man ser i bilden är den tydliga ansamlingen av PFKFB3 i nukleära punkter, så kallade foci, efter strålbehandling vilket är de ställen där det uppstått dubbelsträngsbrott på DNA:t.

Cancer präglas generellt sett av väldefinierade biologiska kännetecken, hit räknas okontrollerad celltillväxt. De kontrollmekanismer som normalt reglerar om och hur ofta celledelning ska ske är satta ur spel för att säkerställa kontinuerlig tillväxt av cancer. I celler som inte delar sig är DNA:t kompakt packat i cellkärnan tillsammans med proteiner i en struktur som kallas kromatin. När cellen förbereder sig att genomgå celledelning så blir DNA:t mindre packat för att göra det tillgängligt för att replikeras av DNA-polymeraser så att dottercellerna får varsin kopia av DNA:t. Ett öppet DNA är mer känsligt för strålbehandling än ett kompakt packat DNA, celler som aktivt växer och delar sig är alltså mer känsliga för strålbehandling. Av de > 200 olika slags celler som finns i kroppen finns det dock friska, vanliga celler som också delar sig snabbt som exempelvis vissa celltyper i benmärgen, hårsäcken och mag-tarmkanalen, och vissa immunceller. Dessa celler påverkas nästan omedelbart om de utsätts för strålning vilket resulterar i biverkningar hos patienten och begränsar mängden strålning man kan använda vid behandling. Det finns också celler som delar sig mer långsamt som i exempelvis bröst och hjärna, här uppkommer biverkningarna mycket senare i relation till de snabbt växande cellerna. Strålbehandling handlar alltså om en balans mellan att förstöra cancercellerna och minimera skador på den närliggande normalvävnaden, vilket begränsar mängden strålning som kan användas.

ÖKAD REPARATIONSKAPACITET

Behandlingsresistent cancer är ett utbrett problem inom cancerbehandling. När det gäller strålbehandling kan cancerceller ibland ha en ökad DNA-reparationskapacitet redan från början eller under behandlingen utveckla en sådan kapacitet. Detta bidrar till att cancercellerna blir resistenta och inte dör av strålbehandlingen, de har anpassat sig till

nya förhållanden för att kunna överleva och blivit mästare på att reparera sitt DNA. Men hur lyckas cancercellerna med detta?

Syftet med vår studie var att identifiera hur cancerceller kan bli så bra på att reparera dubbelsträngsbrott på sitt DNA vid strålbehandling för att sedan kunna använda denna kunskap för att utveckla nya, effektivare läkemedel än de alternativ som finns idag. Genom att titta på genomikdata från cancerpatienter som svarar på eller är resistenta mot strålbehandling identifierade vi att de patienter som var resistenta mot strålbehandling hade högre uttrycksnivåer av det metabola proteinet PFKFB3. PFKFB3 utgör en regulatorisk roll i glykolysen som är en metabol process som sker i cellens cytosol där glukos bryts ned och energi i form av ATP bildas.

Det var känt att cancercellerna hos de strålningsresistenta patienterna kunde reparera dubbelsträngsbrott mer effektivt än cancercellerna från strålningskänsliga patienter. Cancerceller som reparerar sina dubbelsträngsbrott mer effektivt och därmed överlever har höga uttrycksnivåer av PFKFB3. Så vad har PFKFB3 som är ett enzym i glykolysen att göra med dubbelsträngsbrott?

Genom att utsätta cancerceller i laboriet för strålbehandling och sedan studera cancercellerna med ett konfokalmikroskop kunde vi se att PFKFB3 ansamlades vid dubbelsträngsbrotten i DNA:t i cellkärnan redan inom 30 minuter efter strålning. PFKFB3 lokaliserade till samma ställe i arvmassan som flera kända DNA-reparationsproteiner vid dubbelsträngsbrott, speciellt de reparationsproteiner som är inblandade i den reparationsväg som använder homolog rekombination. Homolog rekombination är en viktig DNA-reparationsväg där cellen använder den existerande kopian av det intakta DNA:t som mall för att korrekt laga DNA-sekvensen som skadats vid dubbelsträngsbrott. Den-

••• strålbehandling

na typ av DNA-reparation kan alltså endast ske efter att cellen har replikerat sitt DNA vilket gör att det finns en kopia av DNA:t tillgängligt. När vi tog bort PFKFB3-enzymet från cancercellerna med siRNA-teknik kunde inte reparationsproteinerna som krävs för fungerande homolog rekombination ansamlas vid dubbelsträngsbrotten efter strålning. Som konsekvens av detta hade cancercellerna som saknade PFKFB3 minskad DNA-reparationsaktivitet och endast fem procent av cancercellerna kunde överleva vid strålning jämfört med cirka 30 procent av de celler som har PFKFB3.

ÅSTADKOMMA STRÅLKÄNSLIGHET

Med dessa spännande resultat ville vi utveckla en läkemedelsmolekyl som blockerar PFKFB3 för att därmed kunna göra cancercellerna mer känsliga för strålning. För att kunna göra detta samarbetade vi med läkemedelsföretaget Kancera AB. Som en startpunkt undersökte vi hur 50 000 olika kemiska föreningar blockerade aktiviteten hos PFKFB3. Sedan valde vi ut de bästa som förfinades med medicinsk kemi och intensiva arbetsinsatser för att få fram den mest lovande läkemedelskandidaten. Genom ett flertal metoder kunde vi säkerställa att läkemedelsmolekylen interagerade med PFKFB3 och nu började det spännande, vad skulle hända när vi behandlade cancerceller i laboratoriet med läkemedelsmolekylen och strålbehandlade?

När vi blockerade aktiviteten hos PFKFB3 med vår läkemedelsmolekyl kunde reparationsproteinerna för homolog rekombination inte ansamlas vid dubbelsträngsbrotten och cancercellerna visade sig ha kvarstående höga nivåer av oreparerade dubbelsträngsbrott efter strålning. Vi kunde alltså upprepa våra tidigare resultat där vi hade tagit bort PFKFB3 från cancercellerna med siRNA-teknik och nu visste vi också att det är aktiviteten hos PFKFB3 som behövs för fungerande DNA-reparation. Vid kombination av olika doser av läkemedelsmolekylen och olika doser strålning fick vi samma effekt på cancercellers överlevnad med mindre mängd strålning. Cancercellerna var alltså beroende av aktiviteten hos PFKFB3 för att kunna reparera dubbelsträngsbrott och därmed överleva.

Vår nästa fråga var sedan hur vanliga, friska celler påverkas när vi strålbehandlar och blockerar PFKFB3 samtidigt? Vi ville inte att de friska cellerna skulle likt cancercellerna bli mer känsliga för strålbehandling. För att undersöka detta använde vi i laborieförsök vanliga celler och dessas motsvarande cancerform, cellerna behandlades med olika doser av vår läkemedelsmolekyl för att sedan utsättas för strålning. Vi följde hur cellerna överlevde och kunde se att överlevnaden av de vanliga cellerna inte påverkades vid de doser av läkemedelsmolekylen som resulterade i avsevärt sämre överlevnad hos cancercellerna. Vanliga celler blev alltså inte mer strålningskänsliga när man blockerade PFKFB3 med en läkemedelsmolekyl, de verkar inte behöva PFKFB3 för fungerande DNA-reparation.

Det har länge varit känt att PFKFB3 som utgör en regulatorisk roll i glykolysen finns, i relation till vanliga, friska celler, i ovanligt stora mängder i cancerceller. Glykolysen är en metabol process som sker i cellens cytosol där glukos bryts ned och energi i form av ATP bildas. Redan för nästan 100 år sedan upptäckte Dr Otto Warburg att cancerceller har en ökad mängd glykolys och denna kunskap används idag vid diagnos och behandlingsuppföljning genom att man ger patienter fluorodeoxyglukos som tas upp av tumören och kan detekteras med en PET-kamera. Eftersom ökad glykolys är ett känt fenomen för många olika cancer typer och PFKFB3 är ett regulatoriskt enzym i glykolysen med högt uttryckt i cancer finns det ett starkt intresse för att utveckla läkemedelsmolekyler som kan blockera PFKFB3 och därmed strypa glykolysen och cancercellens tillväxt. Men till stor förvåning har man upptäckt att PFKFB3 kan driva tillväxt av cancerceller utan att påverka glykolysen och att enzymet befinner sig nästan uteslutande i cellkärnan, medan glykolysen är en process som sker i cellens cytosol. Varför PFKFB3 återfinns i cellkärnan och vad det gör där har länge varit en obesvarad fråga. Därför kändes det otroligt spännande när vi kunde se att PFKFB3 lokaliserar till dubbelsträngsbrott i mikroskopet och att PFKFB3 har en så stor inverkan på DNA-reparation vid strålning, vilket var tidigare helt okänt. Att få fram en läkemedelsmolekyl var också en häftig känsla som kunde ske tack vare fantastiska samarbeten.

Denna oväntade länk mellan PFKFB3 och DNA-reparation ger ett nytt perspektiv på hur cancerceller kan bli så bra på att reparera DNA-skador och för mitt forskarteam har det öppnat upp många nya, spännande frågor. Just nu håller vi på och testar vår läkemedelsmolekyl i laborieförsök på prover från patienter och sjukdomsmodeller för att utvärdera den kombination av strålning och blockering av proteinet som ger bäst effekt. I laboriet håller vi också på och utvärderar kombinationsbehandling med DNA-skadande cytostatika. Vår förhoppning är att våra resultat kan ligga till grund för en framtida mer effektiv cancerbehandling med ökad överlevnad och mindre biverkningar.

REFERENSER

Gustafsson, N. M. S. et al. Targeting PFKFB3 radiosensitizes cancer cells and suppresses homologous recombination. *Nat Commun* 9, 3872, doi:10.1038/s41467-018-06287-x (2018).

Shi, L., Pan, H., Liu, Z., Xie, J. & Han, W. Roles of PFKFB3 in cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2, 17044, doi:10.1038/sigtrans.2017.44 (2017).

NINA GUSTAFSSON, ASSISTERANDE PROFESSOR OCH TEAMLEDARE TRANSLATIONELL MEDICINE, HELLEDAY LABORATORIET, SCIENCE FOR LIFE LABORATORY, INSTITUTIONEN FÖR ONKOLOGI-PATOLOGI, KAROLINSKA INSTITUTET, NINA.GUSTAFSSON@SCILIFELAB.SE

