

# Genreglerande DNA-element – EN UTFORSKAD ORSAK TILL CANCER

Utvecklingen av cancer är starkt kopplad till uppkomsten av genetiska förändringar. Dessa förändringar omfattar allt från mutationer i individuella baspar, förlust eller amplifiering av kromosomsegment till translokationer där det genetiska materialet från olika kromosomer blandas. Ansamlingen av dessa genetiska förändringar kan efterhand som cellens normala funktioner sätts ur spel leda till uppkomsten av cancerceller och, senare under förloppet, sjukdomens progression och utveckling av terapiresistens.

## NÄSTA GENERATIONS SEKVENSERING

Under de senaste fem åren har stora framsteg gjorts i jakten på bakomliggande genetiska förändringar i olika cancersjukdomar. Mycket av detta tack vare utvecklingen av "nästa generations sekvensering" (next generation sequencing) som medfört möjligheten att snabbt kunna sekvensera hela eller delar av genomet för att identifiera genetiska förändringar.

För cancerforskningen har den nya tekniken medfört ett paradigmskifte där vi gått från sekvensering av enskilda gener med hjälp av PCR och Sangersekvensering till sekvensering av alla gener och hela genom i allt större patientmaterial.

Fokus har initialt framförallt varit sekvensering och analys av de proteinkodande delarna av genomet. Mycket på grund av de mycket lägre sekvenseringskostnaderna i jämförelse med helgenomsekvensering, men även för att det är enklare att identifiera effekten av en mutation i en proteinkodande region.

På kort tid har dessa studier bidragit till identifieringen av tusentals enskilda mutationer i kodande regioner som tillsammans utgör sjukdomsspecifika mutationsprofiler, det vill säga grupper av gener som återkommande är muterade i en specifik cancerform.

Med nästa generations sekvensering har förutsättningarna för att hitta mutationer i proteinkodande regioner på kromosomerna ökat dramatiskt. Men även fynd av mutationer i genreglerande element i icke-proteinkodande regioner kommer att öka. Sådana mutationer kan i lika hög grad vara orsak till att cellen omvandlas till en cancercell. På Centrum för hematologi och regenerativ medicin, Karolinska institutet i Huddinge forskar forskarassistent **Robert Månsson** på genreglerande element och deras betydelse för uppkomst av blodcancer.

## MUTATIONER I KODANDE REGIONER

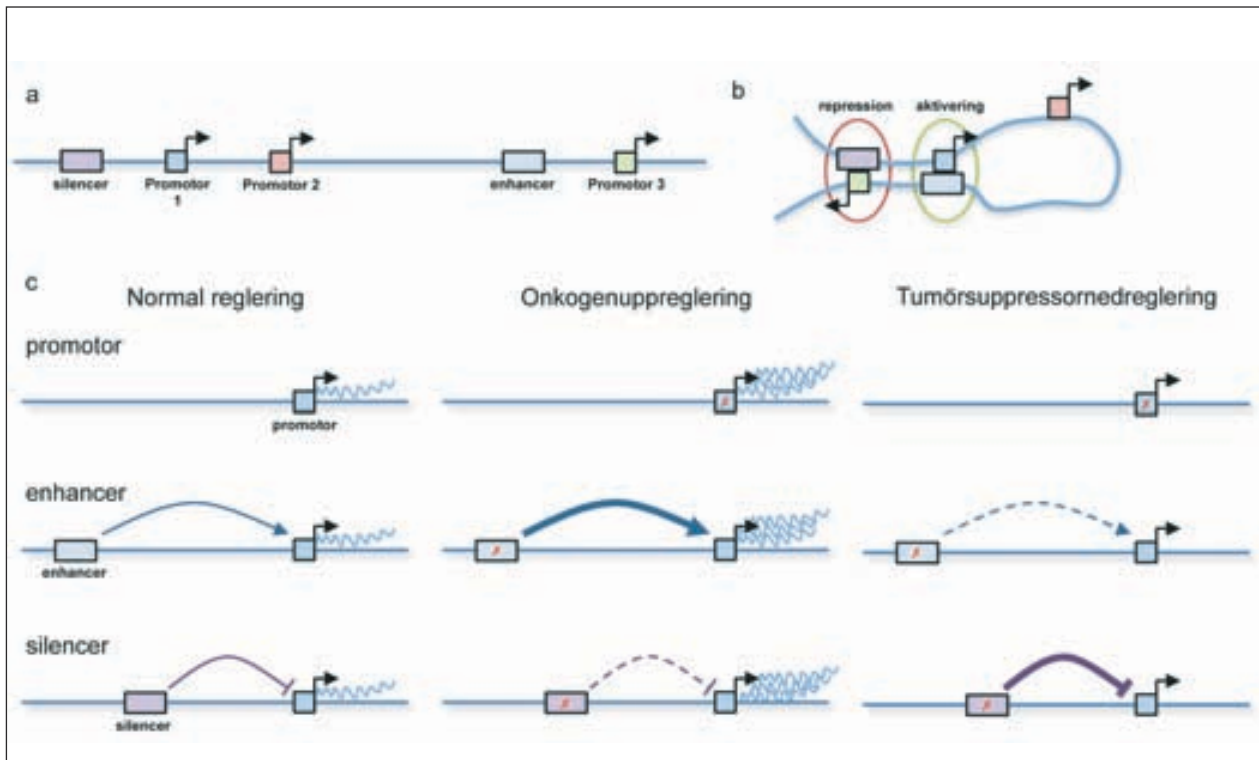
De funktionella effekterna av genetiska förändringar i kodande regioner är välstuderade för ett stort antal gener och kan genom förändrad eller förlorad proteinfunktion direkt kopplas till utveckling, progression och klinisk manifestation av olika former av cancer. Ett klassiskt exempel är mutationer eller deletioner i den prognostiskt viktiga tumörsuppressorgen *TP53* där även de funktionella effekterna av specifika mutationer i många fall är kända.

Andra väl karakteriserade exempel finns bland de fusionsproteiner som skapas genom frekvent förekommande translokationer som till exempel *TEL-AML1* där translokationen ger upphov till ett nytt protein med ny funktionalitet. Som sådant är det allmänt vedertaget att mutationer i proteinkodande regioner bidrar till utvecklingen av cancer.

## ICKE-KODANDE MUTATIONERS ROLL

Utöver de genetiska förändringar som direkt påverkar proteinkodande regioner, identifierar helgenomsekvensering signifikanta mängder av genetiska förändringar i icke-proteinko-

GENREGLERANDE ELEMENT OCH HUR DE KAN BIDRA TILL UPPKOMSTEN AV CANCER



Figur 1. Gener regleras av regulatoriska element. Promotorer är initieringspunkter för transkription medan enhancers och silencers modulerar transkription positivt respektive negativt.  
 a) Schematisk bild av ett kromosomsegment med promotorer och regulatoriska element.  
 b) Enhancers och silencers styr den transkriptionella aktiviteten av en promotor genom direkt fysisk interaktion. Det är inte alltid den närmaste promotorn som regleras, i stället kan en enhancer/silencer interagera med och reglera en genomiskt avlägsen promotor. Kontakten mellan avlägsna regulatoriska element sker genom att genomet organiseras i loopar vilket möjliggör att elementen kan komma i direkt kontakt med varandra. Denna typ av interaktioner har beskrivits för regulatoriska element som genomiskt är separerade med upp till en miljon baspar från varandra.  
 c) Mutationer (markerade med rött x) i regulatoriska element kan bidra till ökad eller minskad transkription av onkogener eller tumörsuppressorgener och därmed till utvecklingen av cancer.

dande delar av genomet som i princip tills nyligen varit outforskade. Kan då dessa icke-kodande mutationer vara bidragande orsaker till utvecklingen av cancer?

För att en gen ska fungera normalt krävs inte bara en intakt proteinkodande region. Genen måste dessutom uttryckas i rätt celler, vid rätt tidpunkt och i rätt mängd. För att detta ska ske krävs även att de genetiska element som styr genens uttryck är intakta och normalt fungerande. Även om det är mindre vedertaget, finns det för många gener ingen praktisk skillnad mellan en kodande mutation som reducerar ett proteins aktivitet till hälften och en regleringsdefekt som orsakar ett halverat uttryck.

Komplexa genetiska sjukdomar som cancer kan därför sannolikt orsakas delvis av genetiska förändringar som sätter de element som reglerar en gens normala uttryck ur spel.

**DET FUNKTIONELLA GENOMET**

När, var och hur mycket en gen uttrycks styrs av ett komplext system av genreglerande element i genomet<sup>1</sup>. Bland de bättre karakteriserade regulatoriska elementen är promotorer, en-

hancers och silencers (figur 1a). Översiktligt agerar promotorer som initieringspunkter för transkription. Enhancers rekryterar transkriptionsfaktorer och kromatinmodifierande enzymer och modulerar transkription från promotorerna. Silencers fungerar på ett liknande sett som enhancers men har en negativt reglerande funktion.

Utöver dessa finns flertalet andra regulatoriska element som till exempel locus control regions (LCR) som styr transkription av kluster av gener och insulatorer som blockerar andra regulatoriska element från att interagera med promotorer.

I kölvattnet av sekvenseringen av det humana genomet har stora resurser lagts på att lokalisera funktionella element. Detta ledde redan i ett tidigt skede till identifieringen av en myriad av potentiella kontrollelement som vida överskrider antalet gener i antal. En av de intressantare och kanske mer oväntade slutsatserna av det omfattande mappningsprojektet ENCODE (Encyclopedia of DNA elements) är att den större delen av genomet (80 procent) har någon form av funktionalitet<sup>2,3</sup>.

Sett bara till regulatoriska element har mer än 20 procent av genomet en potentiellt reglerade funktion (i jämförelse utgör den proteinkodande delen cirka 1,5 procent).

Denna andel kommer troligen öka efterhand som fler celltyper studeras då många identifierade element är celltypspecifika. Den stora andelen regulatoriska och celltypspecifika element argumenterar starkt för en mekanism där alternativa regulatoriska element används för att uppnå celltypspecifika genuttrycksnivåer.

### REGULATORISKA ELEMENT OCH CANCER

Av de olika regulatoriska elementen är promotorer enklast att studera eftersom de på grund av sin funktion alltid är lokaliserade i direkt anslutning till den gen de reglerar. Med andra ord, kan eventuellt identifierade mutationer direkt länkas till uttrycket av den gen som promotorn reglerar.

Genetiska förändringar i promotorer skulle potentiellt kunna orsaka både under- och överuttryck genom mutationer som antingen förstör existerande eller ger upphov till nya bindningssites för transkriptionsfaktorer. På detta sätt skulle både sänkt uttryck av tumörsuppressorgener och överuttryck av onkogenet kunna orsakas (figur 1c).

Det sistnämnda rapporterades nyligen i en studie där mutationer i promotorn till det telomerlängdsreglerade proteinet TERT hittades i 71 procent av de analyserade fallen av melanom<sup>4</sup>. Detta gör det till den mest frekvent förekommande mutationen som identifierats i melanom. Intressant nog identifierades liknande genetiska förändringar även i nedärvd genetiskt predisponerad melanom<sup>5</sup> vilket styrker att TERT-promotormutationer är en av de drivande faktorerna bakom utvecklingen av melanom.

Då TERT är kritiskt för cellens delningsförmåga ger dessa mutationer också en direkt funktionell länk mellan reglering av transkription och den enorma nästintill oändliga förmåga till celledelning som cancercellerna uppvisar.

### STORA GENOMISKA AVSTÅND

Medan promotorer är lokaliserade i direkt anslutning till den gen de styr är enhancers och silencers vida utspridda över genomet. Många av dessa element är celltypspecifika (det vill säga de är inte aktiva i alla celltyper) vilket tros vara en kritisk mekanism för att skapa en celltyps unika genuttryck.

Lokalisationen av dessa element är inte heller direkt knuten till generna de reglerar då deras regulatoriska funktion kan utövas över stora genomiska avstånd. Allt mer bevis pekar på att denna "avståndsreglering" sker genom att enhancers/silencers kommer i direkt kontakt med de promotorer de reglerar och att detta sker genom att mellanliggande DNA formar loopar<sup>6</sup> (figur 1b).

Även om få riktigt avlägsna regulatoriska element har beskrivits i detalj finns slående exempel, som Limb-enhancern<sup>7</sup>. Denna enhancer ligger inbäddad i en annan gens intron cirka en miljon baser från målgenen sonic hedgehog, *Shh*. Mutationer i denna region leder till att *Shh*-genen inte uttrycks på ett normalt sätt under embryonalutvecklingen med följden att till exempel polydaktyli utvecklas (individerna föds med övertaliga fingrar/tår).

Avståndseffekten av enhancers/silencers är en komplicerande faktor för studier av deras funktion då man inte kan förutsäga vilken gen/promotor de reglerar bara baserat på deras sekvens eller position i genomet. I stället måste deras interaktioner bestämmas experimentellt för att man ska kunna länka eventuella mutationer till förlust av normal transkriptionell reglering.

I likhet med promotorer, kan mutationer i enhancers/silencers som förstör eller ger upphov till nya sites för transkriptionsfaktorer bidra till både under- och överuttryck av kritiska gener (figur 1c). Även om mig veterligen inga somatiska enhancer-/silencer-mutationer i cancerceller funktionellt beskrivits ännu, finns det exempel på enhancers där nedärvda genetiska varianter predisponerar för utvecklingen av cancer.

Ett sådant exempel är Myc-enhancervarianter som är starkt kopplade till flera former av cancer inklusive koloncancer<sup>8</sup>. En intressant aspekt av studierna av Myc-enhancern är att avsaknad av den skyddar mot uppkomsten av cancer, vilket indikerar att varianter av enhancers inte bara kan predisponera för cancer men även medföra resistens mot att cancer utvecklas<sup>8</sup>.

### FRAMTIDA PERSPEKTIV

TERT-promotorn i melanom är det första rapporterade fallet av ett regulatoriskt element som återkommande är muterat i en specifik cancerform. Detta indikerar starkt att icke-kodande mutationer kan vara nyckelmekanismer bakom uppkomsten av vissa typer av cancer och att de kan fungera som "driver"-mutationer, det vill säga mutationer som leder till utvecklingen av en cancersjukdom.

I retrospektiv förklarar detta fynden att helgenomsekvenseringar av patientmaterial i vissa fall uppvisat tusentals mutationer i icke-kodande regioner men enbart ett fåtal i kodande regioner. Prediktionen är att allt fler sjukdomskritiska icke-kodande mutationer i regulatoriska element kommer att identifieras allteftersom fokus skiftar från djupare analys av enbart kodande regioner till hela cancergenom.

Precis som för nedärvda genetiska sjukdomar, där allt fler genetiska förändringar länkas till icke-kodande regioner<sup>3,9</sup>, är det mest troliga scenariot att cancer uppstår genom ett samspel mellan mutationer i både regulatoriska element och proteinkodande regioner.

Icke-kodande mutationer ser därmed ut att kunna vara ytterligare en viktig pusselbit i vår förståelse av den komplexa genetiska bakgrunden till cancer.

### REGULATORISKA ELEMENT I B-KLL

Nästa stora utmaning för vår förståelse av transkriptionell reglering är att identifiera vilka regulatoriska element som styr vilken promotor. Detta är inte bara viktigt för vår förståelse av normala celler och deras utveckling utan även, i förlängningen, för vår förståelse för de funktionella effekterna av mutationer och normal variation i regulatoriska element.

Vårt mål är att adressera denna frågeställning med hjälp av en kombination av helgenomsmappning av regulatoriska element och interaktioner dem emellan. Initialt siktar vi på att göra detta i normala och maligna B-celler från kronisk lymfatisk leukemi (B-KLL), som är en av de vanligaste formerna av leukemi bland vuxna. Därmed hoppas vi kunna

kartlägga skillnader mellan transkriptionell reglering och användningen av regulatoriska element i normala B-celler och B-KLL-celler.

Forskningen sker som ett samarbete mellan min grupp på Centrum för hematologi och regenerativ medicin (HERM) på Karolinska institutet och Hematologikliniken på Karolinska universitetssjukhuset.

#### REFERENSER

1. Maston GA, Evans SK, Green MR. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006;7:29-59. PMID: 16719718
2. Ecker JR, Bickmore WA, Barroso I, Pritchard JK, Gilad Y, Segal E. Genomics: ENCODE explained. *Nature.* 2012 Sep 6;489(7414):52-5. PMID: 22955614
3. ENCODE Project Consortium, An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012 Sep 6;489(7414):57-74. PMID: 22955616
4. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science.* 2013 Feb 22;339(6122):957-9. PMID: 23348506
5. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Moll I, Nagore E, Hemminki K, Schadendorf D, Kumar R. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science.* 2013 Feb 22;339(6122):959-61. PMID: 23348503
6. Splinter E, de Laat W. The complex transcription regulatory landscape of our genome: control in three dimensions. *EMBO J.* 2011 Sep 27;30(21):4345-55. PMID: 21952046
7. Visel A, Rubin EM, Pennacchio LA. Genomic views of distant-acting enhancers. *Nature.* 2009 Sep 10;461(7261):199-205. PMID: 19741700
8. Sur IK, Hallikas O, Vähärautio A, Yan J, Turunen M, Enge M, Taipale M, Karhu A, Aaltonen LA, Taipale J. Mice lacking a Myc enhancer that includes human SNP rs6983267 are resistant to intestinal tumors. *Science.* 2012 Dec 7;338(6112):1360-3. PMID: 23118011
9. Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, Cheng Y, Schaub MA, Kasowski M, Karczewski KJ, Park J, Hitz BC, Weng S, Cherry JM, Snyder M. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res.* 2012 Sep;22(9):1790-7. PMID: 22955989

ROBERT MÅNSSON, FORSKARASSISTENT, CENTRUM FÖR HEMATOLOGI OCH REGENERATIV MEDICIN, KAROLINSKA INSTITUTET, HUDDINGE, ROBERT.MANSSON@KI.SE



*Rune har mCRPC\* och har progredierat efter docetaxelbehandling. Idag finns många fortsatta behandlingsalternativ.*

**JEVTANA®**  
(cabazitaxel)

Välj **JEVTANA®** vid:

- **Aggressiv sjukdom<sup>1</sup>**
- **Taxankänslig sjukdom<sup>1,2</sup>**
- **Mindre hormonkänslig sjukdom<sup>1</sup>**

**SANOFI ONCOLOGY**

Tel. 08-634 50 00 | [www.sanofi.se](http://www.sanofi.se)

\* mCRPC = Metastaserande kastrationsresistent prostatacancer. Referenser: 1. Oudard S et al. Poster 933P (ESMO 2012) 2. de Bono JS, et al. *Lancet.* 2010; 376(9747): 1147-54.

JEVTANA® (CABAZITAXEL), Rx, EF, cytostatikum som ges intravenöst. Indikation: JEV-TANA® i kombination med prednison eller prednisolon är indicerat för behandling av patienter med hormonrefraktär metastaserande prostatacancer som tidigare behandlats med docetaxel. Dosering: Den rekommenderade dosen av JEV-TANA® är 25 mg/m<sup>2</sup> administrerat som en 1-timmes intravenös infusion var tredje vecka i kombination med oralt givet prednison eller prednisolon 10 mg dagligen under hela behandlingen. Styrkor och förpackningar: JEV-TANA® 60 mg koncentrat och vätska till infusionsvätska, lösning. Datum för senaste översyn: 13-05-30.

▼ Detta läkemedel är föremål för utökad övervakning. Varningar och försiktighet: samt ytterligare information se SPC för JEV-TANA®. Vid frågor om våra läkemedel kontakta: [infoavd@sanofi-aventis.com](mailto:infoavd@sanofi-aventis.com).