

ÖSTROGEN

får neuroblastomceller att mogna ut och **minskar tumörtillväxt**



Det kvinnliga könshormonet östrogen kan spela en viktig roll i barncancerformen neuroblastom. Laboratieförsök visar att östrogenbehandling och överuttryck av östrogenreceptorn får elakartade neuroblastomceller att mogna ut till mer normala, nervcellsliknande celler. Studien, som publiceras i PNAS, ger hopp om nya behandlingsmöjligheter. Ett viktigt fynd var att inte endast östrogenreceptorn, ER α , utan även flera andra NHR (kärnhormonreceptorer), inklusive GR (glukokortikoidreceptorn), är kopplade till en gynnsam neuroblastomsjukdom, skriver professor **Marie Arsenian-Henriksson** och hennes medarbetare **Johanna Dzieran** och **Aida Rodriguez Garcia** vid Institutionen för mikrobiologi, tumör-och cellbiologi (MTC) vid Karolinska Institutet.

Det sympatiska nervsystemet är en del av det autonoma nervsystemet som reglerar kroppens och organens omedvetna funktioner (exempelvis hjärtfrekvens). Som en del i det perifera nervsystemet är sympatiska nervceller och ganglier lokaliserade utanför det centrala nervsystemet som består av hjärnan och ryggmärgen.

Neuroblastom (NB) är en tumörsjukdom som drabbar små barn och som utvecklas från prematura celler i det ännu outvecklade sympatiska nervsystemet. Denna form av cancer kan uppträda i många olika varianter, ifrån godartade tumörer (låg risk NB) med mycket goda överlevnadschanser, till väldigt aggressiv och spridd sjukdom (hög risk NB), där behandlingsmöjligheterna idag är begränsade.

MYCN-proteinet hör till MYC-familjen av proteiner som är viktiga för alla cellers förmåga att dela sig och som ofta förekommer i alltför höga nivåer i olika cancerformer. Omkring 25 procent av NB har fler än två kopior av *MYCN*-genen per cell – faktum är att de kan härbärgera 10 till 80 kopior. Detta fenomen kallas genamplifikation och amplifikation av *MYCN* är förknippad med aggressiva tumörer och dålig prognos för NB-patienter ¹(Matthay 2016).

FÖRHINDRAR SPECIALISERING

I ett nervsystem som ännu är under utveckling kan förhöjda nivåer av MYCN-proteinet förhindra utvecklingen av specialiserade nervceller (via en process som kallas neuronal differentiering) från omogna, mindre specialiserade och mer mobila prekursorceller ²(Knoepfler, 2002). Tillsammans med ytterligare gendefekter kan detta resultera i utveckling av högrisk NB. Vår forskargrupp har tidigare visat att MYCN med hjälp av en liten RNA-molekyl (miR-18a) orsakar reducerade nivåer av östrogenreceptor alfa-proteinet (ER α). Vidare fann vi att en ökning av ER α -nivån, eller en minskning av miR-18a-nivån, kan inducera en partiell utmognad av MYCN-amplifierade NB-celler till neuronliknande celler med en samtidig blockering av celldelning. Dessa resultat indikerar att ER α kan mediera en tumörhämmande effekt i NB ³(Loven et al, 2010). Detta är förvånande, då ER α är starkt associerad med tumörtillväxt (celldelning) i andra cancerformer, såsom bröstcancer ⁴(Munoz 2015).

Målet med den aktuella studien ⁵(Dzieran et al, 2018) var att förstå varför och hur ER α har en tumördämpande effekt i NB-celler. När vi tog oss an frågeställningen genomförde vi både *in vitro*-studier, det vill säga experiment under kontrollerade former utanför en levande organism, och dessutom *in vivo*-studier i möss. I vårt fall använde vi NB-cellinjer som isolerats från NB-patienters tumörer och som kan dela sig under lång tid i cellodlingar. Dessa experiment möjliggjorde att a) på artificiell väg (knockdown) sänka nivåerna av miR-18a eller öka (överuttrycka) nivåerna av ER α , och b) aktivera eller inhibera exempelvis östrogenreceptor alfa och de signalvägar som den i sin tur kontrollerar.

Vår cellmodell var den så kallade SK-N-BE(2)-cellinjen som etablerats från en metastas hos en tvåårig pojke med malign *MYCN*-amplifierad NB. SK-N-BE(2) celler har en immatur (omogen) fenotyp (utseende) men kan fås att bilda neuronalliknande nätverk med hjälp av vissa behandlingar, exempelvis retinolsyra.

INITIERAR SPECIFIKA PROCESSER

Med våra inledande *in vitro*-experiment bekräftade vi våra tidigare fynd att en knockdown av miR-18a resulterar i en uttalad induktion av neuronal differentiering och ett ökat uttryck av ER α ⁵(Dzieran et al 2018). (Gener förmedlar sin information med hjälp av budbärarmolekyler, så kallade mRNA. Transkriptionen av en gen till mRNA kallas genuttryck. Därefter translateras mRNA:t till ett protein). Därutöver förhöjdes uttrycket av cellytereceptorerna TrkA och p75^{NTR} i SK-N-BE(2)-celler med reducerade nivåer av miR-18a ⁵(Dzieran et al. 2018) vilket ytterligare understryker att

MYCN hindrar neuronal differentiering via miR-18a. Både TrkA och p75^{NTR} medierar signaler från nervtillväxtfaktorn NGF och initierar därigenom specifika processer i cellerna. NGF inducerar neuronal differentiering på ett kraftfullt sätt och NB-patienter med relativt sett högre nivåer av NGF eller dess receptorer p75^{NTR} och TrkA har förbättrade chanser till överlevnad jämfört med patienter som har lägre nivåer av dessa proteiner ⁶(Westermark, 2011).

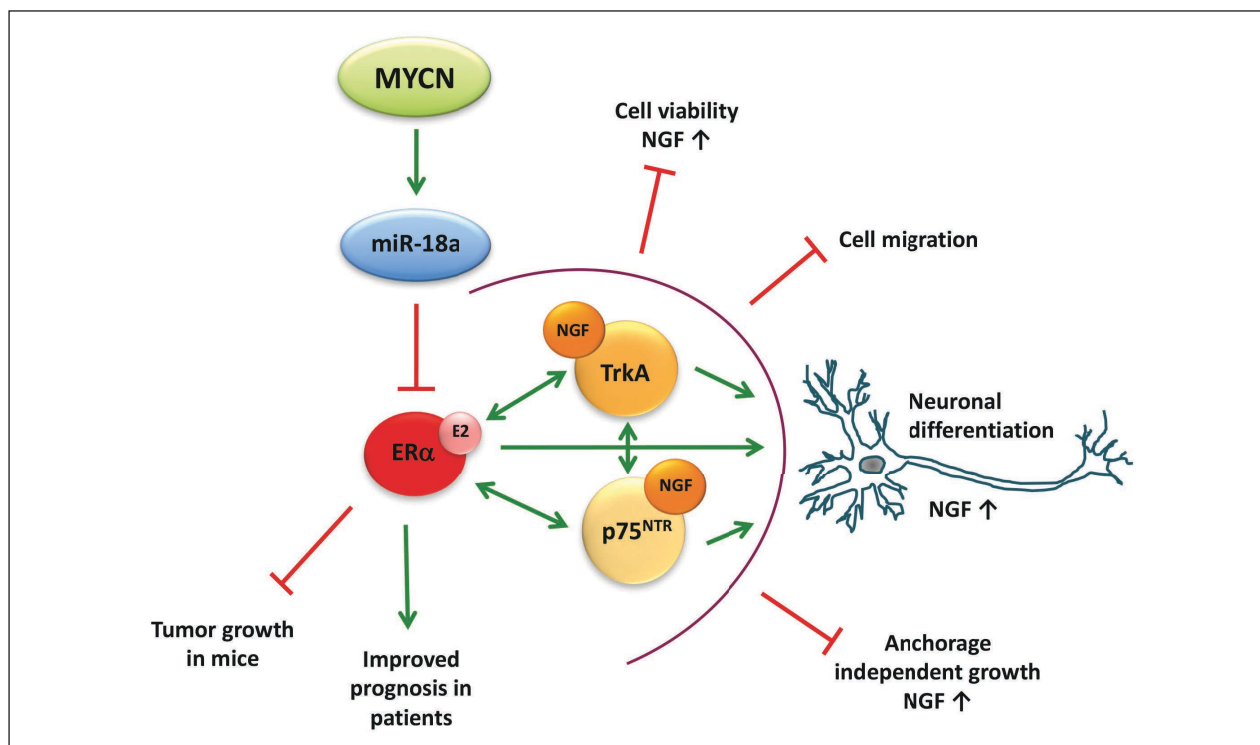
På grund av det ökade uttrycket av ER α och NGF-receptorerna behandlade vi cellerna med östrogen (E2), vilket binder till och aktiverar ER α . Denna behandling ledde inte till någon ytterligare förändring i uttrycket av TrkA eller p75^{NTR}, men ökade i ännu större utsträckning den neuronala differentieringen i SK-N-BE(2) celler med en miR-18a-knockdown ⁵(Dzieran et al 2018). Därefter introducerade vi ER α -DNA i SK-N-BE(2)-celler för att permanent öka uttrycket av ER α (härefter kallade BE(2) ESR1) och analyserade förändringar i cellernas morfologi (utseende). Om än inte lika imponerande som i celler med miR-18a knockdown observerades en induktion av neuronal differentiering även i BE(2) ESR1-celler som inte skedde i kontrollceller. Intressant att notera var att mRNA-nivåerna av *TrkA* och, efter behandling med E2, p75^{NTR} ökade i celler med höga ER α -nivåer. I linje med detta inducerades neuritutväxt ytterligare genom behandling med NGF i BE(2) ESR1-celler, medan kontrollcellerna inte svarade på NGF ⁵(Dzieran et al 2018). Differentierade celler är högt specialiserade och uppfyller specifika funktioner i kroppen. I en vuxen organism är dessa differentierade cellers antal strikt kontrollerat och celldelning sker som regel endast i syfte att kompensera för celler som dör.

Således karakteriseras cancer med en mer differentierad cellmorfologi normalt av långsammare tumörtillväxt och mindre aggressivt sjukdomsforlopp. Detta fick oss att studera effekten av ER α på olika cellulära processer som är kopplade till tumörutveckling och tumörinitiering ⁵(Dzieran et al 2018). De förändringar som en normal och frisk cell behöver genomgå för att bli en tumörcell kallas "cancerkännetecken" – Hallmarks of Cancer ⁷(Hanahan, 2011). Ett av de första stegen är att övervinna signaler som hindrar cellen från att föröka sig eller att inducera celldöd ⁷(Hanahan, 2011). Kombinationen av båda processerna kan bedömas i termer av cellviabilitet som tar det totala antalet livsdugliga celler i beaktande. Cellviabiliteten reducerades i BE(2) ESR1-celler jämfört med kontrollceller och ytterligare experiment visade på att minskad celldelning och ökad celldöd låg till grund för det minskade antalet celler. NGF kunde delvis återställa den observerade reduktionen i cellviabilitet medan kontrollcellerna inte visade något svar på behandlingen. Vår hypotes är att denna induktion av cellviabilitet med NGF i BE(2) ESR1-celler är baserad på den välkända neuronskyddande effekten av NGF ⁵(Westermark et al, 2011).

LOSSNA FRÅN SITT CELLNÄTVERK

För att tumörceller ska kunna bilda metastaser måste de förvärva förmågan att lossna från sitt cellnätverk och interagera med, förflytta sig längs och smälta ner den omgi-

••• neuroblastom



Mekanism för de tumorsupprimerande effekterna av ER-alfa vid neuroblastom: MYCN hämmar expression av ER α via induktion av miR-18a och stör på så vis östrogen- och NGF-signaleringsmedierad neuronal differentiering vilket främjar en mer aggressiv fenotyp i neuroblastom. Det senare blir uppenbart genom reducerad celllevabilitet, cellmigration och förankringsoberoende tillväxt *in vitro*. Dessutom kan höga ER α -nivåer kopplas till minskad tumörtillväxt hos möss *in vivo* och inte minst till förbättrad överlevnad hos NB-patienter.

Gröna pilar betecknar en induktion av en process eller ett protein och röda pilar betecknar en inhibering.

ER α = östrogenreceptor alfa, NGF = nervtillväxtfaktor, NGFR = NGF-receptor, TrkA = Tropomyosinreceptorkinas, E2 = östrogen, miR-18a = mikroRNA 18a.

vande extracellulära matrisen (ECM). Dessa processer, kallade cellmigration och -invasion, är avgörande under embryonal utveckling och även för vissa celler i den vuxna organismen, såsom makrofager. I en cancerkontext krävs dessa två processer för spridning, metastasering⁷ (Hanahan, 2011). En cells förflyttning kallas migration medan cellinvasion behövs för att ta sig in i en vävnad eller ett organ. Celler kan analyseras med avseende på förmågan att inducera dessa två processer *in vitro* i cellkultur. Vi fann att båda processerna var mindre effektiva i NB-celler med förhöjda ER α -nivåer jämfört med kontrollceller⁵ (Dzieran et al 2018).

Slutligen bedömde vi också förankringsoberoende tillväxt. Normala celler är beroende av kontakt med andra celler eller med ECM medan cancerceller kan växa utan denna kontakt. För den förankringsoberoende tillväxtanalysen placeras enskilda celler i ett halvfäst agaroskikt som förhindrar direkt och indirekt kontakt med andra celler eller ytor som de kan fästa vid och de följs för förmåga till celledelning. Denna analys ger vanligen en bra indikation om tumörbildningsförmågan hos celler i en levande organism *in vivo*⁸ (Mori 2009). Vi fann att den förankringsoberoende tillväxten var signifikant försämrad i BE (2) ESR1-celler och att behandling med NGF endast resulterade i en partiell förbättring av denna hämning. Sammantaget talade våra *in vitro*-experiment för att en ökning av ER α -nivåer är tillräcklig för att störa och hindra processer som är direkt kopplade

till tumörbildning och progression i MYCN-amplifierade NB-celler. Det är av vikt att vi kunde bekräfta våra avgörande fynd även i en annan BE (2) ESR1-cellklon samt även i en ytterligare MYCN-amplifierad NB-celllinje kallad IMR32⁵ (Dzieran et al 2018).

Cellinjer i kultur fungerar som ett viktigt och bra första verktyg för att studera biomedicinska fenomen i ett väl kontrollerbart och enkelt system. Förhållandena i en levande organism är emellertid mycket mer komplexa med olika direkta och indirekta stimuli från andra celltyper och ECM som påverkar responsen hos studerade celler eller sjukdomar. Därför ansåg vi att det var viktigt att validera våra resultat från *in vitro*-experimenten i *in vivo*-försök.

För detta ändamål injicerades BE (2) ESR1 eller kontrollceller i flanken på möss med en immunosuppression (för att undvika en avstöttningsreaktion) och tumörtillväxt övervakades under två veckor. Våra resultat visade att tumörer från BE (2) ESR1-celler var signifikant mindre jämfört med kontrolltumörerna. Ytterligare analys visade att BE (2) ESR1-tumörerna hade förhöjda nivåer av TH och NPY⁵ (Dzieran et al 2018), två markörer för neuronal differentiering.

STOR MÄNGD PATIENTDATA

Våra *in vivo*-experiment underströk vidare våra initiala upptäckter, att ER α i viss utsträckning inducerar neuronal differentiering och minskar den tumörbildande förmågan hos MYCN-amplifierade NB-celler. Vi analyserade därför en

stor mängd patientdata innehållande information om nivåerna av tusentals gener och kliniska data från 498 NB-patienter (Tumor Neuroblastoma - SEQC - 498 - RPM - seqcnb1, placerad på R2-plattformen (<https://hgserver1.amc.nl/>)). Denna information gör det möjligt att med korrelationsanalys jämföra uttryck av olika gener med varandra eller med kliniska data såsom överlevnad. I linje med våra *in vitro*-data fann vi att NB-patienter med högt *MYCN*-uttryck eller *MYCN*-amplifiering hade relativt låga mRNA-nivåer av *ERα*. Vidare var nivåerna av *ERα* och *p75^{NTR}* generellt höga i de tumörer som hade låga nivåer av *MYCN*-mRNA. Dessa data indikerar att *ERα*-uttryck kan kopplas till mindre aggressiva och mer differentierade NB-tumörer. I linje med detta fann vi att överlevnadschanserna för NB-patienter förbättrades med ökat *ERα*-uttryck i tumören⁵ (Dzieran et al 2018).

Tillsammans visar våra *in vitro*-, *in vivo*- och patientdata-analyser att *MYCN* reducerar uttrycket av *ERα* för att kunna upprätthålla ett mindre differentierat tillstånd som karaktäriseras av ett lägre antal neuronliknande celler och ett mer aggressivt beteende. *ERα* tillhör familjen av kärnhormon-receptorer (NHR) som består av 48 medlemmar, däribland även retinolsyra-receptorn och glukokortikoidreceptorn (GR)⁹ (Maglich 2001). Vår grupp har tidigare funnit att GR, i likhet med *ERα*, också kan främja en mer differentierad fenotyp i NB-celler¹⁰ (Ribeiro et al 2016). Emellertid var den observerade induktionen av neuronal differentiering inte fullständig i något av fallen. Detta ledde oss till hypotesen att en uppsättning av flera NHR skulle kunna fungera i samverkan för att främja neuronal differentiering. Detta skulle i sin tur betyda att andra NHR också kan vara kopplade till en mindre aggressiv sjukdom. Vi använde därför samma patientdata för att analysera hela NHR-familjen och fann att majoriteten av NHR-familjens gener kan kopplas till kliniska markörer för en gynnsam NB-sjukdom⁵ (Dzieran et al 2018).

Sammanfattningsvis tyder våra data på en mekanism som bidrar till en odifferentierad fenotyp i *MYCN*-amplifierade NB-celler: *MYCN*-inducerad miR-18a orsakar reducerade *ERα*-nivåer och därmed förhindras östrogen- och NGF-stimulerad neuronal differentiering. Vi upptäckte att överuttryck av *ERα* är tillräckligt för att övervinna den aggressiva fenotyp som är associerad med höga nivåer av *MYCN*, både *in vitro* och *in vivo*. Dessutom ökar *ERα* uttrycket av NGF-receptorerna TrkA och, efter aktivering, *p75^{NTR}* som båda är avgörande för NGF-inducerad differentiering. Ett viktigt fynd var att inte bara *ERα*, utan även flera andra NHR inklusive GR är kopplade till en gynnsam NB-sjukdom. Sammantagna talar våra data för att *MYCN*

nedreglerar flera NHR i samverkan för att undertrycka dessas kumulativa effekt på neuronal differentiering. Som stöd identifierade vi en stor grupp NHR, inklusive *ERα* och GR, med potentiell prognostisk relevans.

Denna studie ger insikter i dialogen mellan *ERα* och NGF och talar för att aktivering av *ERα*- och/eller NGF-receptorer kan vara en framtida strategi för behandling av vissa former av NB.

REFERENSER

1. Matthay, K. K., Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, Weiss WA. Neuroblastoma. Nat. Rev. Dis. Prim. 2, (2016).
2. Knoepfler, P. S., Cheng, P. F. & Eisenman, R. N. N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. Genes Dev. 16, 2699–2712 (2002).
3. Loven, J. et al. MYCN-regulated microRNAs repress estrogen receptor- (ESR1) expression and neuronal differentiation in human neuroblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 1553–1558 (2010).
4. J. Munoz & J. Wheler & R. Kurzrock. Expression of estrogen and progesterone receptors across human malignancies: new therapeutic opportunities. Cancer Metastasis Rev (2015) 34:547–561
5. Dzieran, J. et al. MYCN-amplified neuroblastoma maintains an aggressive and undifferentiated phenotype by deregulation of estrogen and NGF signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 115(6):E1229-E1238 (2018).
6. Westermark, U. K., Wilhelm, M., Frenzel, A. & Henriksson, M. A. The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma. Seminars in Cancer Biology 21, 256–266 (2011).
7. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2011 Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646–74 (2011).
8. Mori S, et al. Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential. Oncogene 28, 2796–2805 (2009).
9. Maglich, J. M. et al. Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. Genome Biol. 2, RESEARCH0029 (2001).
10. Ribeiro, D. et al. Regulation of Nuclear Hormone Receptors by MYCN-Driven miRNAs Impacts Neural Differentiation and Survival in Neuroblastoma Patients. Cell Rep. 16, 979–993 (2016).

JOHANNA DZIERAN, PHD,
JOHANNA.DZIERAN@KI.SE



AIDA RODRIGUEZ GARCIA, PHD,
AIDA.RODRIGUEZ.GARCIA@KI.SE



MARIE ARSENIAN-HENRIKSSON, PROFESSOR, INSTITUTIONEN FÖR MIKROBIOLOGI,
TUMÖR- OCH CELLBIOLOGI (MTC) VID KAROLINSKA INSTITUTET,
MARIE.ARSENIAN.HENRIKSSON@KI.SE

