

TARGET TRAN



Algoritmen hittade oväntade behandlingar mot **HÖGRISKNEUROBLASTOM**

Forskare vid Uppsala universitet har med hjälp av en datoralgoritm identifierat en ny lovande behandling mot sjukdomen neuroblastom, en nervcancer hos barn som kan vara livshotande. Upptäckten, som här beskrivs av **Elin Almstedt** som forskar vid Rudbecklaboratoriet i Uppsala, kan på längre sikt leda till en ny form av behandling för barn med svår eller framskriden sjukdom.

Istället för att använda traditionella metoder för läkemedelsutveckling har forskargruppen utvecklat en ny datoralgoritm som kan väga samman stora mängder genetisk och farmakologisk information från europeiska och amerikanska sjukhus och universitet. Algoritmen föreslog sedan nya behandlingar som skulle kunna påverka sjukdomens grundmekanismer.

SLATOR



Neuroblastom är en cancer i det sympatiska nervsystemet som drabbar ett tjugotal barn i Sverige varje år. Diagnosen är kliniskt heterogen, vissa barn uppvisar spontan tillbakagång av metastaserad sjukdom med minimal behandling, medan andra inte överlever trots intensiv behandling. Neuroblastom delas därför in i ett antal riskgrupper baserat på kliniska och molekylära riskfaktorer som styr valet av behandling'. Patienter med lokaliserade tumörer utan ytterligare riskfaktorer har god prognos och kan i vissa fall följas med observation utan att behandling behöver sättas in. Patienter med metastaserade tumörer och ytterligare riskfaktorer, till exempel ålder över 1,5 år, låg differentieringsgrad eller högt uttryck av onkogenen

MYCN, klassas som högriskpatienter. Sådana patienter får en omfattande behandling inklusive cytostatika, kirurgi, stamcellstransplantation, strålbehandling och behandling med retinolsyra som inducerar differentiering i tumör-cellerna. Trots detta överlever bara hälften av patienterna med högriskneuroblastom fem år efter diagnos. I sökandet efter nya specifika och målriktade terapier har forskningen fokuserat på att identifiera mutationer i onkogener som driver tumören. Tyvärr har DNA-sekvensering av neuroblastom och många andra pediatrika tumörer identifierat ett ganska litet antal gener med återkommande mutationer. Målriktade behandlingar har därför varit svåra att utveckla enbart baserat på DNA-sekvensering. Med undantag för

neuroblastompatienter med överaktiverat ALK (anaplastic lymphoma kinase) som kan behandlas med ALK-inhibitorer, har inga målriktade behandlingar visat någon klinisk effekt.

STORSKALIGA STUDIER KRÄVS

I de fall där onkogenen MYCN är amplifierad anses den vara en av de mest drivande faktorerna för cancersnartens överlevnad². MYCN är en transkriptionsfaktor som vanligen uttrycks under den embryonala utvecklingen och påverkar uttrycket av många gener, MYCNs så kallade transkriptionssignatur, och processer i cellen, bland annat celledning, cellmetabolism och differentiering. Trots mycket omfattande studier på MYCN och dess familjemedlemmar MYC och MYCL och hur det regleras

har inget läkemedel ännu lanserats med MYCN som direkt måltavla. En av anledningarna är att det är svårt att inaktivera transkriptionsfaktorer med små molekyler då de saknar specifik bindningsficka för en ligand. Flera alternativa strategier för att indirekt hämma MYCN utvärderas för närvarande, till exempel minskat uttryck av MYCN-genen, ökat nedbrytande av MYCN-proteinet och hämmande av essentiella gener som aktiveras av MYCN³. En alternativ strategi är att identifiera läkemedel som hämmar hela transkriptionssignaturen (det vill säga alla gener som kontrolleras av MYCN) istället för enskilda mål nedströms om MYCN. Denna hypotes har lagt grunden till vår studie: att identifiera nya behandlingar som inte baseras på en specifik mutation, utan som omprogrammerar hela cellens transkriptionssignatur och därmed cellens fenotyp till det bättre. Studier på patientdata har visat att inte bara MYCN-amplifiering utan även andra riskfaktorer för neuroblastom kan approximeras med en transkriptionssignatur⁴⁻⁶. För att kunna identifiera läkemedel som kan ändra en transkriptionssignatur krävs systematiska och storskaliga studier på vilka gener som ingår i signaturen och hur olika läkemedel eller gener påverkar signaturen.

INTEGRERING AV DATA KAN IDENTIFIERA NYA MEKANISMER

Under det senaste decenniet har en rad olika typer av storskalig data samlats in för att karakterisera molekyllära förändringar i cancerceller. Utöver genomikdata från patienter har man systematiskt kartlagt effekten av olika läkemedel eller genmodifikationer på celler. Nyligen integrerades flera olika databaser i the dependency map-projektet (depmap.org)⁷, där cellers molekyllära profil (till exempel mutationer, genuttryck eller genkopior) kan länkas till känslighet mot ett visst läkemedel eller genmanipulering med hjälp av siRNA (knockdown) eller CRISPR/Cas9 (knockout). Känsligheten avgörs både av cellens ursprung, till exempel om den kommer från en bröstcancer eller prostatacancer, men också av specifika förändringar i den cellinjen, exempelvis överuttryck av en viss gen. Andra

omfattande studier, till exempel LINCS-L1000 från Broad Institute, har analyserat hur mer än 19 000 läkemedel förändrar cellers genuttryck⁸.

Tyvärr blir den enorma mängd data som samlas in snabbt överskådlig och det krävs bättre verktyg för att koppla samman och tolka olika typer av data. Målet för vår studie är att förstå hur olika datatyper kan integreras för att generera nya hypoteser för specifika patientgrupper och därmed hitta nya behandlingar. Vi fokuserar på data kopplat till patienter med högriskneuroblastom och framförallt att hitta läkemedel som ändrar transkriptionssignaturen för MYCN-amplifierad neuroblastom till det bättre.



**” Målet för
vår studie
är att förstå hur
olika datatyper
kan integreras
för att generera
nya hypoteser för
specifika patient-
grupper och där-
med hitta nya
behandlingar.**

I vår studie har vi utvecklat en algoritm, TargetTranslator⁹, som kan användas som ett forskningsverktyg för att identifiera nya läkemedelsmål för grupper av cancerpatienter, till exempel högriskneuroblastom. I korthet matchar TargetTranslator transkriptionsprofiler från patienter med databaser över hur läkemedel påverkar transkriptomet i cellerna. Mer än 19 000 läkemedel poängsätts och rankas baserat på hur bra de inverterar en transkriptionssignatur (till exempel MYCN). Eftersom det rör sig om många läkemedel är det också av intresse att förstå om ett specifikt läkemedelsmål (exempelvis ett visst protein) oftare får högre poäng än andra läkemedel. TargetTranslator letar därför efter gemensamma målmolekyler för högt rankade läkemedel. Totalt väver TargetTranslator samman tre typer av data: patientdata med kliniska och molekyllära annoteringar, databaser över hur läkemedel ändrar cellens transkriptom och databaser över läkemedel och deras målmolekyler.

I vår studie har vi utvärderat om denna typ av beräkningsbiologi kan användas för att identifiera nya läkemedelsmål mot högriskneuroblastom. TargetTranslator applicerades på totalt 833 patienter från tre olika studier. Varje patient stratifierades baserat på 10 olika högriskfaktorer, bland annat MYCN-amplifiering, tumörens stadium eller grad av differentiering. Endast de högriskfaktorer som genererade en transkriptionsprofil med hög korrelation mellan de olika patientkohorterna analyserades vidare. I nästa steg identifierades läkemedel och målmolekyler som ändrade transkriptionssignaturen till en mer fördelaktig signatur. Totalt identifierades 88 läkemedelsmål för någon av de analyserade högrisksignaturerna, både mer etablerade som bland annat *MTOR*, *PI3K* och *CASP3*, men även mindre kända mål som cannabinoid receptor 2 (*CNR2*) eller mitogen activated protein kinase 8 (*MAPK8*, även kallat *JNK1*).

På förslag av algoritmen screenade vi 11 olika läkemedel i patient-deriverade celler för att identifiera lovande substanser mot högriskneuroblastom. I olika grad kunde vi bekräfta att läkemedlen ändrade gensignaturen posi-

tivt, hämmade cellviabiliteten och inducerade apoptos. I sju av fallen lyckades vi nedreglera MYCN-proteinet och kunde även inducera utväxt av neuriter, vilket indikerar att cellerna börjat differentiera. Flera av läkemedlen visade dock på hög toxicitet i zebrafiskembryon, vilket tyder på att även normala celler påverkas av substanserna.

Av de undersökta läkemedlen hade två låg toxicitetsprofil vid neuroblastomhämmande doser och är relativt okända som målmolekyler i neuroblastom: GW405833, en cannabinoid receptor 2-aktiverare, samt AS601245, en MAPK/JNK-inhibitor. Vi undersökte om dessa även kunde hämma neuroblastom *in vivo*. För att screena effekten av dessa läkemedel *in vivo* introducerades grönt fluorescerande protein (GFP) i patient-deriverade neuroblastomceller som sedan injicerades i transparanta zebrafiskembryon. Redan efter tre dagars behandling var de behandlade tumörerna mindre än de obehandlade. I en uppföljande musstudie kunde den tumörhämmande effekten bekräftas. Sammanfattningsvis kunde vi använda vår nya algoritm, TargetTranslator, för att identifiera risksocierade transkriptionssignaturer och matcha dem med läkemedel för att identifiera nya målriktade läkemedel med *in vivo*-effekt mot högriskneuroblastom.

DISKUSSION OCH FRAMTIDSUTSIKTER

I takt med den ökade mängden storskalig data som genereras världen över kommer framtida forskning att behöva nya och förfinade modeller för att kunna integrera, visualisera och tolka den data som genereras. I vår studie kunde en ny algoritm, TargetTranslator, användas som ett hypotesgenererande verktyg för att identifiera nya läkemedel mot en specifik typ av cancer; högriskneuroblastom. De identifierade substanserna hade cancerhämmande effekt både i odlade patient-deriverade celler, zebrafisk- och musxenografter. Denna studie styrker användandet av beräkningsbiologi och integrering av



” Denna studie styrker användandet av beräkningsbiologi och integrering av storskalig data för att hitta nya mekanismer och behandlingar mot cancer.

storskalig data för att hitta nya mekanismer och behandlingar mot cancer. För att förstå om TargetTranslator också är användbar för andra specifika frågeställningar inom onkologi bad vi algoritmen identifiera läkemedel mot HER2-överuttryckande bröstcancer, som då föreslår HER2 som läkemedelsmål. Detta uppmuntrar fortsatt användning av TargetTranslator för att förstå och tolka data genererad från patientmaterial. För att förenkla användandet för mer experimentellt inriktade forskare har vi gjort vår algoritm tillgänglig som en webapplikation via targettranslator.org.

REFERENSER

1. Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. *J Clin Oncol*. 2009;27(2):289-297. doi:10.1200/JCO.2008.16.6785
2. Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J*. 1997;16(11):2985-2995. doi:10.1093/emboj/16.11.2985
3. Johnsen JI, Dyberg C, Fransson S, Wickström M. Molecular mechanisms and therapeutic targets in neuroblastoma. *Pharmacol Res*. 2018;131:164-176. doi:10.1016/j.phrs.2018.02.023
4. De Preter K, Vermeulen J, Brors B, et al. Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent data sets using a multigene signature. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2010;16(5):1532-1541. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2607
5. White PS, Thompson PM, Gotoh T, et al. Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene*. 2005;24(16):2684-2694. doi:10.1038/sj.onc.1208306
6. van Groningen T, Koster J, Valentijn LJ, et al. Neuroblastoma is composed of two super-enhancer-associated differentiation states. *Nat Genet*. 2017;49(8):1261-1266. doi:10.1038/ng.3899
7. Tsherniak A, Vazquez F, Montgomery PG, et al. Defining a Cancer Dependency Map. *Cell*. 2017;170(3):564-576.e16. doi:10.1016/j.cell.2017.06.010
8. Subramanian A, Narayan R, Corsello SM, et al. A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles. *Cell*. 2017;171(6):1437-1452.e17. doi:10.1016/j.cell.2017.10.049
9. Almstedt E, Elgendy R, Hekmati N, et al. Integrative discovery of treatments for high-risk neuroblastoma. *Nat Commun*. 2020;11(1):1-15. doi:10.1038/s41467-019-13817-8

ELIN ALMSTEDT, POST-DOC VID INSTITUTIONEN FÖR IMMUNOLOGI, GENETIK OCH PATOLOGI, UPPSALA UNIVERSITET, ELIN.ALMSTEDT@IGP.UU.SE

