

Möjligt att förutse risken för svåra

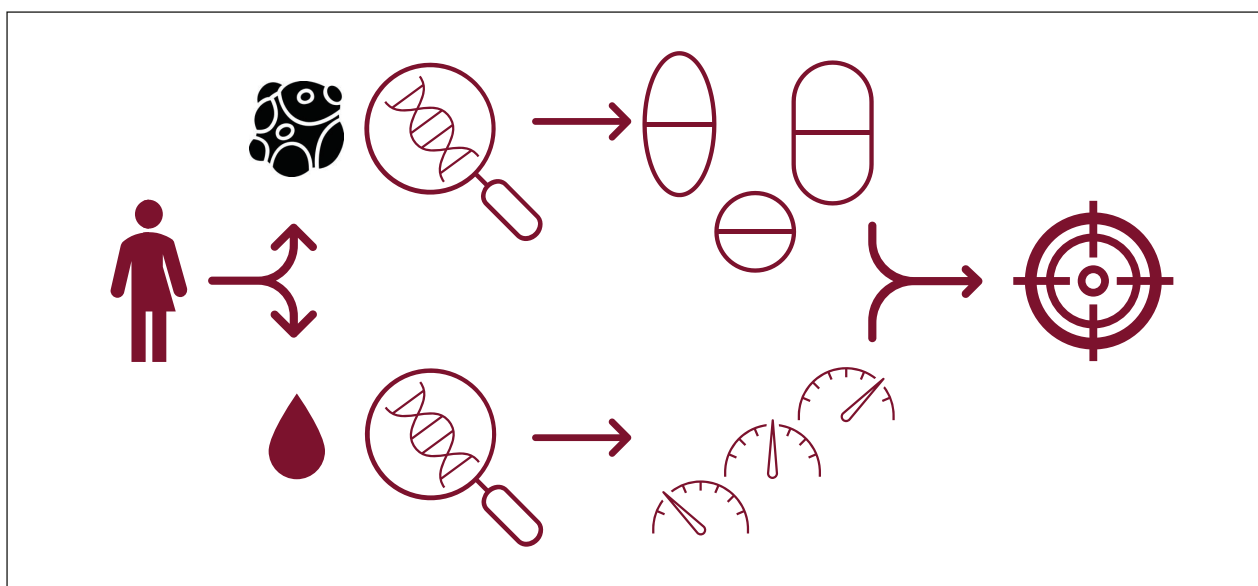
Risken för att patienters blodstatus och benmärg ska påverkas kraftigt (så kallad benmärgssuppression) vid kemoterapibehandling är ett stort kliniskt problem. Forskare vid Linköpings Universitet kunde med en prediktionsmodell klassificera patienter med hög eller låg risk för benmärgssuppression. På sikt kan det bli möjligt att identifiera patienter med hög eller låg risk för benmärgssuppression genom analys av arvsmassan och baserat på det dosjustera behandlingar innan de påbörjas. Forskningen, som här beskrivs närmare av **Niclas Björn** och **Henrik Gréen**, har publicerats i npj Systems Biology and Applications.

biverkningar av cancerbehandling

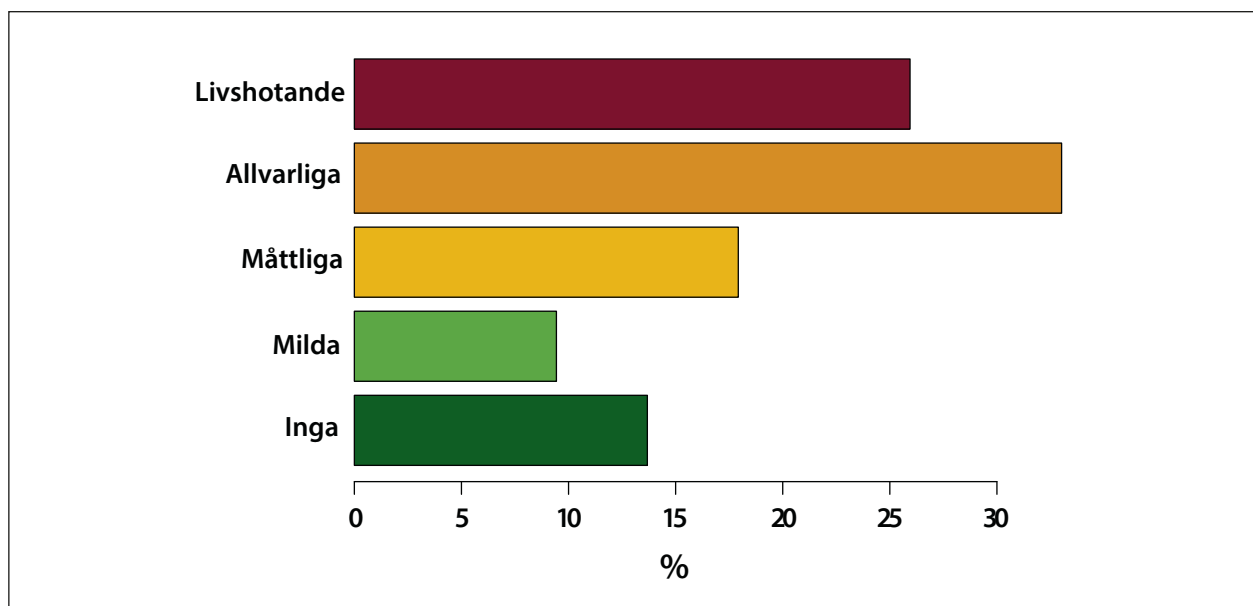
Precisionsmedicin och mer individanpassade behandlingsmetoder har länge varit en eftersökt förbättring av läkemedelsanvändning. Inte bara för att öka och förbättra läkemedels terapeutiska effekter utan också för att minimera oönskade biverkningar. När det kommer till användandet av kemoterapier och cellgifter blir behovet av precisionsmedicin än större^{1,2}, dels för att cancer ofta är en allvarlig och heterogen sjukdom, dels för att behandlingarna är starka och har många oönskade bieffekter som påverkar patientens livskvalitet. Allvarliga biverkningar leder

också till att cancerbehandlingar behöver justeras, skjutas upp, avbrytas eller bytas vilket inte är optimalt och ger cancer en chans att återhämta sig. Samtidigt blir ekvationen där man vill maximera terapeutisk effekt på samma gång som man minimerar biverkningar alltmer komplex då dessa till viss del går hand i hand. Vi tror att framgång med individanpassad precisionsmedicin för cancerbehandling med hjälp av genetik bygger på två hörnstenar (Figur 1):

Att välja de mest effektiva läkemedlen baserat på mutationer i tumörcellerna.



Figur 1. Precisionsmedicin för cancerbehandlingar bygger på två hörnstenar. Valet av rätt behandling baserat på cancers specifika genetiska variation (sekvensering av tumörceller) samt valet av rätt dos baserat på patientens konstitutionella genetiska variation (sekvensering av blodprov) och tolerans för läkemedlet.



Figur 2. Fördelningen av högsta registrerade benmärgssuppression hos 215 patienter med icke-småcellig lungcancer under första cykeln av gemcitabin/karboplatin-behandling. Baserat på CTCAE-skalan för blodplättar, leukocyter och neutrofiler.

Att välja rätt läkemedelsdos baserat på patienters konstitutionella genotyper.

Vår forskning fokuserar på det senare, att hitta normal genetisk variation hos patienterna som gör dem mer, eller mindre, känsliga för kemoterapeutiska läkemedelsbiverkningar. Genetisk variation som sedan i modeller kan förutse vilka patienter som har hög eller låg risk för allvarliga biverkningar och som kan användas för att dosjustera behandlingar redan före behandlingsstart.

HOPP INFÖR FRAMTIDEN

Traditionellt sett har genetisk variation i gener inblandade i läkemedlens absorption, distribution, metabolism och exkretion (ADME-gener) undersökts för precisionsmedicin^{1,2}. Tyvärr har detta inte lett så långt som man hoppats för just cancerbehandlingar, i synnerhet när biverkningarna är vanliga. Även om det finns några undantag som TPMT och DPYD. Med skiftet från fokus på ADME-gener till storskaliga GWA-, panel-, helexom- eller helgenomsekvenseringsstudier hoppas vi att precisionsmedicin även för cancerbehandlingar och minimering av vanliga biverkningar ska kunna implementeras i framtiden.

Gemcitabin och karboplatin är just två sådana kemoterapeutiska läkemedel som vanligen inducerar allvarlig påverkan på patienters blodstatus och benmärg som leder till att patienters antal cirkulerande blodplättar, leukocyter och neutrofiler drastiskt sjunker i antal. Dessa typer av benmärgssuppression är väldigt vanliga. Bland patienter med icke-småcellig lungcancer som behandlats med en kombination av gemcitabin/karboplatin har redan efter en cykel cirka 50–60 procent allvarlig till livshotande benmärgssuppression. Detta graderat som 3–4 på Common Terminology Criteria for Adverse Events-skalan (CTCAE) där grad 0, 1, 2, 3 och 4 beskrivs som inga, milda, måttliga, allvarliga och

livshotande biverkningar baserat på antalet cirkulerande blodplättar, leukocyter eller neutrofiler. Vi har i våra studier tillgång till 215 patienter och deras maximala registrerade benmärgssuppression, enligt graderingen beskriven ovan, vilken kan ses i Figur 2.

GENETISK KOMPONENT BAKOM

De 215 patienterna med icke-småcellig lungcancer som har behandlats med gemcitabin/karboplatin har legat till grund för helexomsekvenseringsstudier där fokus har varit på extrem benmärgssuppression³, blodplättar⁴ och leukocyter/neutrofiler⁵. Sammantaget indikerar dessa studier att det finns en genetisk komponent bakom den stora inter-individuella spridningen i benmärgssuppression. Intressant nog är de viktigaste fynden inte i gener som skulle ha undersökts med ett tillvägagångssätt baserat på ADME-gener vilket styrker fältets övergång mot bredare genombaserade studier^{1,2}. Studierna tyder snarare på att genetisk variation i gener involverade i blodcellers och benmärgens proliferationshastighet påverkar hur känsliga patienter är för att få benmärgssuppression, speciellt där genen JMJD1C, som är involverad i signalvägen "Factors involved in megakaryocyte development and platelet production", var en av de mest inflytelserika generna associerad med lågt antal blodplättar. JMJD1C har vi sedan kunnat visa påverkar proliferation, viabilitet och gemcitabin/karboplatin-känslighet i myeloida cellinjer med knockdownförsök⁶.

Från dessa studiers indikationer om en genetisk komponent bakom risken för benmärgssuppression har vi gått vidare med att helgenomsekvensera 96 av patienterna⁷. Dessa patienter valdes ut så att vi skulle ha så många patienter som möjligt med blodplätts-, leukocyt- eller neutrofilantal av CTCAE grad 0–1 (inga eller milda) och 3–4 (allvarliga eller livshotande). Sekvenseringen genomfördes på Science for

Life Laboratories (Stockholm) HiSeq X Ten-plattform (Illumina) med NGS-bibliotek preparerade med TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation kit (Illumina). Från sekvenseringsdatan fick vi efter filtrering fram dryga 15 miljoner bi-alleliska genetiska varianter som användes för initiala associations tester mot de tre typerna av benmarggssuppression med Fishers exakta test. Från detta fick vi fram runt 5 000 nominellt signifikanta ($p \leq 0,001$) autosomala genetiska varianter för vardera typ av benmarggssuppression. Runt 15 procent av dessa var delade mellan minst två typer av benmarggssuppression. PCA visade sedan (se Figur 1 i⁷ för en visuell representation) att de genetiska varianterna delvis kunde separera patienterna baserat på deras grad av benmarggssuppression betydligt bättre än resterande genetiska varianter (se tilläggsfigur 2 i⁷). Bland de nominellt signifikanta genetiska varianterna sågs (se tilläggsfigur 3 i⁷), jämfört med bakgrunden, även en lätt anrikning av antalet genetiska varianter i regioner mellan gener långt från de kodande regionerna (så kallad distal intergenic).

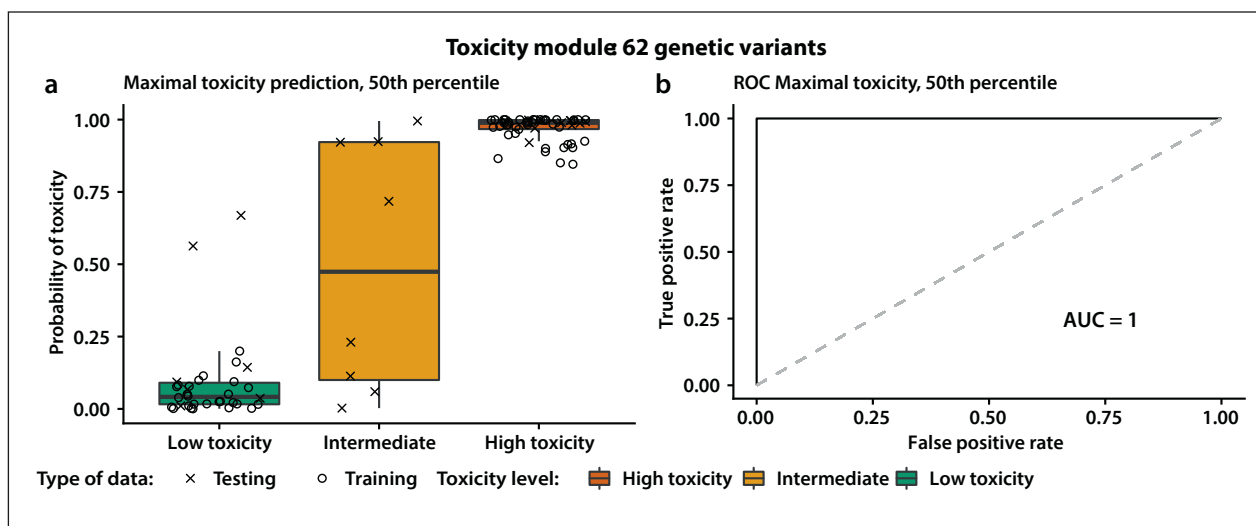
GENNÄTVERKSMODULER KONSTRUERADES

Sedan gick vi vidare med att konstruera en modell för benmarggssuppression, här finns problematik med överanpassning då vi utgår från fler genetiska varianter än patienter och för att motarbeta det gjorde vi flera saker. De genetiska varianterna mappades till sina närmaste gener och från det konstruerades tre gennätverksmoduler, en för varje typ av benmarggssuppression, med algoritmen MCODE⁸ ovanpå protein-protein-interaktionsnätverket String⁹. De 215 gener som överlappade de tre modulerna plockades sedan ut i en generell toxicitetsmodul som lade grunden till en modell för att generellt prediktera benmarggssuppression. Vi anser

det mer relevant och enklare att implementera en generell modell som kan förutspå risken för hög grad av benmarggssuppression än tre specifika modeller för vardera typ av benmarggssuppression. Toxicitetsmodulen var anrikad med gener som uttrycks i myeloida cellinjer och gener som tidigare visats vara differentiellt uttryckta i benmärg hos både råttor och människor efter behandling med gemcitabin/karboplatin. Därefter delades patienterna in i två grupper, en för träning och en för testning (80 procent respektive 20 procent av patienterna med benmarggssuppression av grad 0–1 och 3–4) av modellen. Prediktionsmodellen tränades med de nominellt signifikanta genetiska varianter tillhörande toxicitetsmodulen. Antalet genetiska varianter i modellen reducerades sedan genom 100 000 permutationer och random LASSO med en slumpmässig bestraffning av koefficienter.

SÅ BEHÖVER KONTROLLER GÖRAS

Detta ledde till en slutgiltig prediktionsmodell som använder sig av 62 genetiska varianter i en logistisk regressionsmodell som ger en sannolikhet för att en patient har hög grad (3–4) av benmarggssuppression. När modellen sedan används för att prediktera både tränings- och testpatienternas sannolikhet för benmarggssuppression (figur 3) fås fullgott resultat där båda grupperna kan separeras från varandra med en ROC AUC på 100 procent. Man ser dock på de åtta patienterna med intermediär toxicitet att de inte skulle predikteras rätt, de används heller inte i modellens utvärdering då denna tredje grupp inte kan göra sig själv riktigt rättvis i den binära logistiska regressionsmodellen som inte är tränad för att hantera patienter med intermediär toxicitet. Däremot indikerar de hur väl modellen skulle kunna fun-



Figur 3. Prediktionsmodell för maximal benmarggssuppression. Den slutgiltiga modellen använder sig av 62 genetiska varianter och ger en sannolikhet för hög grad av benmarggssuppression (CTCAE grad 3–4) genom logistisk regression. a) Visar modellens predikterade sannolikhet för benmarggssuppression för både tränings- (○) och testpatienter (×). Patienternas maximala registrerade benmarggssuppression kan också ses uppdelad på låg (inga och milda) i grönt, intermediär (måttliga) i gult och hög (allvarliga och livshotande) i rött. b) Visar en ROC-kurva som beskriver hur väl modellen överensstämmer med patienternas registrerade grad av benmarggssuppression. Notera att modellen som användes är binär och endast tränats för att klassificera låg och hög toxicitet (inte intermediär toxicitet) och gör detta till 100 procent (AUC = 1.0). De åtta patienterna med intermediär toxicitet skulle däremot inte predikteras 100 procent rätt, vilket ger en indikation på hur väl modellen skulle kunna fungera i uppföljningsstudier.

gera i en valideringsstudie där man inte kan förvänta sig att modellen skulle resultera i en ROC AUC på 100 procent. En potentiell förbättring av modellen skulle kunna vara att direkt även lägga till patientkaraktäristik såsom ålder, kön och vikt men även ingående blodstatus. Intressant nog var ingen av de 62 slutliga genetiska varianterna i modellen från exonregioner, utan 42 från intron, 16 från distal intergenic-regioner och 4 från promotor-regioner. Detta talar för att man behöver kontrollera utanför de kodande regionerna för att kunna börja förstå, förklara och förutse vanliga och komplexa fenotyper såsom benmargssuppression. Det här styrker sammantaget antagandet att det finns en betydande genetisk komponent bakom risken för kemoterapi-inducerad benmargssuppression och att denna troligen påverkar benmargens reglering och nybildning av mogna blodceller samt deras funktion.

Det här är en av de mest omfattande helgenomsekvenseringsstudierna med fokus på benmargssuppression. Den leder slutligen fram till en föreslagen toxicitetsmodul som kan användas för prediktion av benmargssuppression baserat på 62 genetiska varianter. Självklart behöver denna modell förfinas, utvärderas och valideras i kliniska studier för att fastställa dess reproducerbarhet, användbarhet och kliniska effekt. Förfiningsarbetet har vi redan påbörjat genom specifika studier på encellsnivå med RNA-sekvensering av gemcitabin/karboplatin-behandlade blodstamceller från benmärg¹⁰ för att bättre förstå vilka gener som påverkas vid/av behandlingen. Den presenterade studien⁷ visar på kapaciteten i att använda helgenomsekvenseringsdata tillsammans med ett gennätsbaserat tillvägagångssätt som ett verktyg för utveckling inom precisionsmedicin för förutsägelser av komplexa fenotyper, såsom toxicitet och biverkningar. Samtidigt visar den även på potentialen hos distal intergenisk variation.

Vår förhoppning är att detta arbete ska kunna förtjäna och stödja användningen av genetiska markörer för förutsägelse av gemcitabin/karboplatin-inducerad myelosuppression hos patienter med icke-småcellig lungcancer. Men tillvägagångssättet och resultaten behöver inte nödvändigtvis begränsas till toxiciteten, läkemedeln och sjukdomen som specifikt undersökts utan bör kunna anpassas och användas i och för betydligt fler konstellationer.



REFERENSER

1. Church D, Kerr R, Domingo E, Rosmarin D, Palles C, Maskell K, Tomlinson I, Kerr D: 'Toxgnostics': an unmet need in cancer medicine. *Nat Rev Cancer* 2014, 14(6):440-445.
2. Hertz DL, Rae J: Pharmacogenetics of cancer drugs. *Annual review of medicine* 2015, 66:65-81.
3. Green H, Hasmats J, Kupersmidt I, Edsgard D, de Petris L, Lewensohn R, Blackhall F, Vikingsson S, Besse B, Lindgren A et al: Using Whole-Exome Sequencing to Identify Genetic Markers for Carboplatin and Gemcitabine-Induced Toxicities. *Clin Cancer Res* 2015.
4. Bjorn N, Sigurgeirsson B, Svedberg A, Pradhananga S, Branden E, Koyi H, Lewensohn R, de Petris L, Apellaniz-Ruiz M, Rodriguez-Antona C et al: Genes and variants in hematopoiesis-related pathways are associated with gemcitabine/carboplatin-induced thrombocytopenia. *The pharmacogenomics journal* 2019.
5. Svedberg A, Bjorn N, Sigurgeirsson B, Pradhananga S, Branden E, Koyi H, Lewensohn R, De Petris L, Apellaniz-Ruiz M, Rodriguez-Antona C et al: Genetic association of gemcitabine/carboplatin-induced leukopenia and neutropenia in non-small cell lung cancer patients using whole-exome sequencing. *Lung Cancer* 2020, 147:106-114.
6. Schimek V, Bjorn N, Pelle L, Svedberg A, Green H: JMJD1C knock-down affects myeloid cell lines proliferation, viability, and gemcitabine/carboplatin-sensitivity. *Pharmacogenet Genomics* 2020.
7. Bjorn N, Badam TV, Spalinskas R, Branden E, Koyi H, Lewensohn R, De Petris L, Lubovac-Pilav Z, Sahlen P, Lundberg J et al: Whole-genome sequencing and gene network modules predict gemcitabine/carboplatin-induced myelosuppression in non-small cell lung cancer patients. *NPJ Syst Biol Appl* 2020, 6(1):25.
8. Bader GD, Hogue CW: An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics* 2003, 4:2.
9. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P et al: The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 2017, 45(D1):D362-D368.
10. Bjorn N, Jakobsen I, Lotfi K, Green H: Single-Cell RNA Sequencing of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Treated with Gemcitabine and Carboplatin. *Genes (Basel)* 2020, 11(5).

NICLAS BJÖRN, PHD, AVDELNINGEN FÖR LÄKEMEDELSFORSKNING, INSTITUTIONEN FÖR BIOMEDICINSKA OCH KLINISKA VETENSKAPER, LINKÖPINGS UNIVERSITET. NICLAS.BJORN@LIU.SE



HENRIK GRÉN, PROFESSOR, AVDELNINGEN FÖR LÄKEMEDELSFORSKNING, INSTITUTIONEN FÖR BIOMEDICINSKA OCH KLINISKA VETENSKAPER, LINKÖPINGS UNIVERSITET. HENRIK.GREEN@LIU.SE

