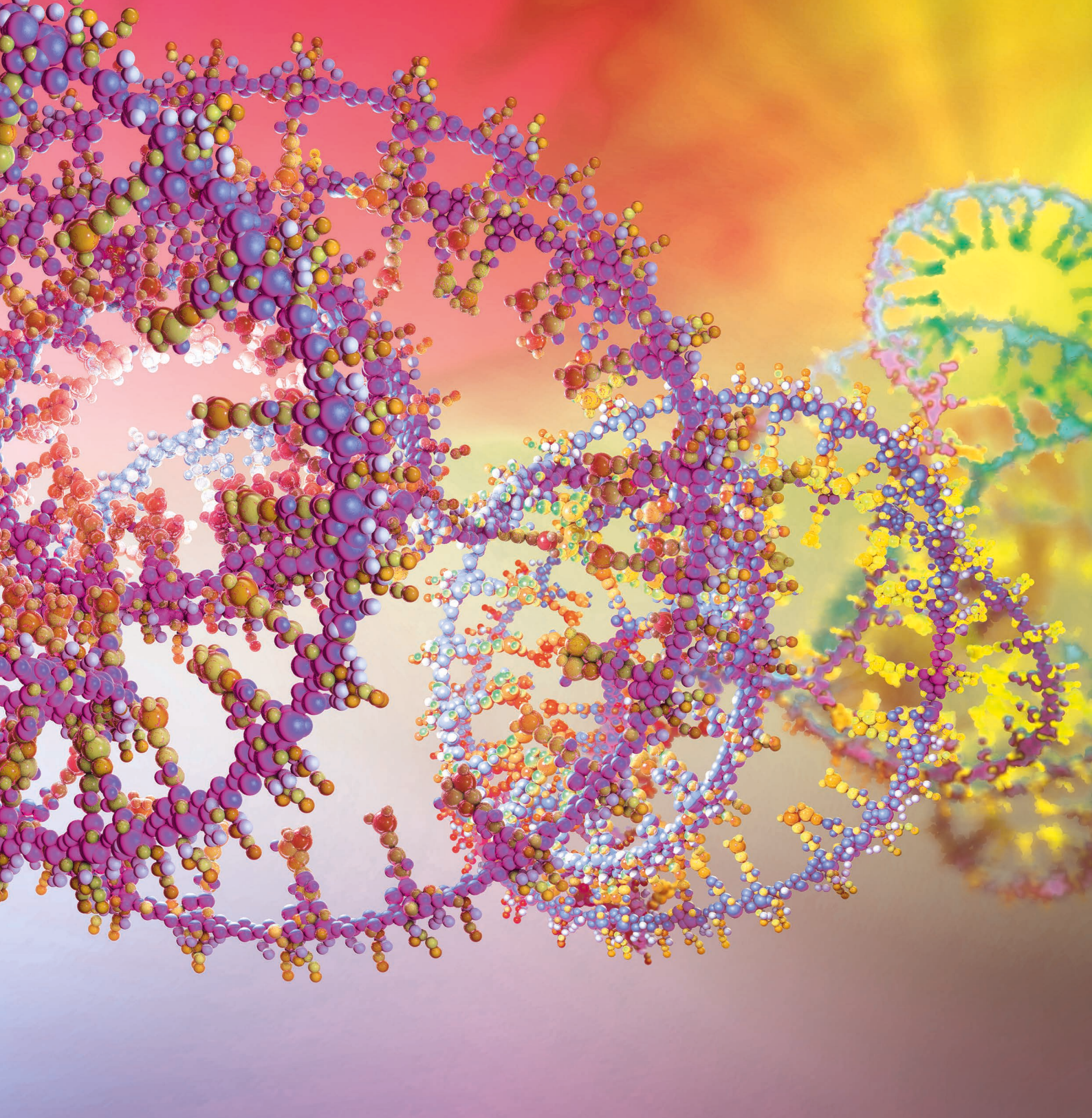


Ribosomen – en ny gammal måltavla inom kemoterapi

– nya rön om cancercellers tillväxt öppnar

För att en cell ska kunna växa och dela på sig behöver den tillverka nya proteiner. Detta gäller även för cancerceller. I en ny studie som publicerats i Science Advances har forskare vid Karolinska Institutet undersökt proteinet eIF4A3 och dess roll i cancercellers tillväxt. Studien visar att genom att blockera eller minska tillverkningen av detta protein, uppstår andra processer som gör att cancercellernas tillväxt och celledning upphör och att de så småningom dör. Här beskriver docent **Mikael Lindström** vad den nya kunskapen kan innebära för framtida möjliga cancerbehandlingar.



för framtida möjlighet i cancerbehandling

De senaste decennierna har gett oss en större insikt i hur olika cancersjukdomar utvecklar sig på molekylär nivå. Vi har också upplevt utvecklingen av nya terapiformer mot cancer som till exempel skräddarsydda små molekyler, antikroppar, samt andra former av immun-terapier. Tillkomsten av precisionsmedicin har inlett en ny era som implicerar högre behandlingsselektivitet med möjlighet till färre biverkningar. Cancerbehandling är dock fortfarande starkt beroende av de standardiserade behand-

lingsmetoderna inklusive konventionell kemoterapi som slår brett mot cancer men som visserligen ofta också kan komma med påtagliga biverkningar. Även inom detta fält fortgår forskningen. Ett område som har rönt uppmärksamhet inom pre-klinisk utveckling av cancerläkemedel är inhibitorer mot cancercellens energikrävande produktion av proteinfabriker, ribosomerna. Vi har i en tidigare studie utvärderat redan godkända läkemedel och deras påverkan på ribosombiogenesen. I vår senaste studie, publicerad i Science

••• cancercellers tillväxt

Läkemedel	Principiell mekanism	Påverkan på ribosombiogenesen
Actinomycin D	DNA-interkalation Transkriptionsinhibitor	Interkalering i rDNA, förhindrar rDNA-transkription
Mitoxantrone	DNA-interkalation Hämmar topoisomeras II	Interkalering i rDNA, förhindrar rDNA-transkription
Doxorubicin	DNA-interkalation Hämmar topoisomeras II	Interkalering i rDNA, hämmar rDNA-transkription
Mitomycin C	DNA-interkalation, alkylerare	Alkylerar rDNA, hämmar rDNA-transkription
Cisplatin	Platinumförening, alkylerare Inhibering av DNA-replikation	Tvärbindning av rDNA hämmar transkription
Oxaliplatin	Platinumförening, alkylerare Inhibering av DNA-replikation	Hämmar rDNA-transkription och rRNA-processning
5-Fluorouracil	Pyrimidinanalog, inhiberar tymidylatsyntas	Stör rRNA syntes och rDNA-transkription
Metotrexat	Folsyraantagonist, hämmar dihydrofolatreduktas	Inhiberar rDNA-transkription
Camptothecin	Hämmar topoisomeras I	Partiell inhibering av rDNA-transkription
Etoposide	Hämmar topoisomeras II	Partiell inhibering av rDNA-transkription
Topotecan	Hämmar topoisomeras I	Hämmar rDNA-transkription
Homoharringtonine	Förhindrar mRNA-translation	Negativ påverkan på ribosomsammansättning
Everolimus	Hämmar mTOR-beroende processer	Dämpar rDNA-transkription och andra RiBi steg
Bortezomib	Proteasomhämmare	Stör bildning och omsättning av ribosomer

Tabell 1. Exempel på olika cytostatika som negativt påverkar ribosomsyntesen.

Advances, presenterar vi data som visar på en ny möjlighet, en ny inkörsport, att i framtiden mer effektivt angripa cancercellens produktion av ribosomer samtidigt som vi aktiverar p53 på olika sätt.

VARFÖR RIBOSOMEN?

Fokus för forskargruppens verksamhet, som startade 2015 i och med rekrytering av professor Jiri Bartek till Karolinska Institutet och SciLifeLab är bland annat att förstå vad som sker i cellen när fel uppstår i tillverkningen av ribosomer samt att mer i detalj undersöka verkningsmekanismer för läkemedel som blockerar denna process i cancerceller. Vi inriktar oss på förståelsen för produktion av ribosomalt RNA (rRNA) och sammansättningen av ribosomer. Varför fokus på just ribosombiogenesen (hädanefter förkortat RiBi) snarare än translation av mRNA? Det finns tre huvudsakliga motiv. 1) RiBi är en process som ofta är uppreglerad i cancerceller jämfört med normala celler. 2) Flera välkända cytostatika påverkar RiBi negativt. 3) Blockering av RiBi-processen är en mycket stark signal för att aktivera

cellens skyddsprotein p53. Utvecklat mer i detalj, det första motivet är att steget från att vara en normal cell till att bli en cancercell kräver nya egenskaper samt förlust av olika cellulära skyddsmekanismer. Då cancerceller rent generellt anses ha en obegränsad delningspotential, och ofta en högre frekvens av celledelning, ses även en högre metabol aktivitet och biosyntes för att möjliggöra detta. Syntes av proteiner kan cellen styra på lite olika sätt, principiellt genom transkription av DNA till olika mRNA med hjälp av RNA Polymeras II eller rRNA (RNA Polymeras I), samt aktiviteten i själva translationen. En förstörad nukleol struktur i cellkärnan och högre nivåer av ribosomer ses ofta i cancerceller jämfört med normala celler från motsvarande vävnad. Detta indikerar att en förhöjd translation från den befintliga ribosompoolen inte är tillräckligt för cancercellen, utan även en ökad produktion av ribosomer är nödvändigt.

Det andra motivet är att flera traditionella cytostatika direkt inhiberar RiBi (Burger K et al., 2010). Bland dessa hittar vi alkylerare, anti-metaboliter (5-FU), ”antibiotika”, alkaloider, samt hämmare av enzymer som kallas topoiso-

meraser (några exempel ges i Tabell 1). Även andra föreningar har påtagligt negativ indirekt effekt på RiBi, till exempel hämmare av mTOR, proteasomen, eller translation av mRNA. I detta sammanhang bör nämnas den nya generationens RNA Pol I-inhibitorer som till exempel CX-5461 som är under fortsatt experimentell och klinisk prövning (Bywater MJ., et al., 2012), samt akridinderivatet BMH-21 (Peltonen K, et al, 2014). Även flera kinasinhibitorer orsakar problem i rRNA-produktionen (till exempel flavopiridol, DRB och roscovitine som slår mot CDK9-kinaset). Att RiBi är en så känslig process beror bland annat på att ribosomalt DNA har ett rikt GC-innehåll. Detta innebär att många föreningar rent strukturellt företrädesvis interkalerar i rDNA. Dessutom är topoisomeraser mycket aktiva i anslutning till rDNA och transkriptionen till rRNA. Det har nyligen visats att CX-5461 har egenskaper som en topoisomeras II-hämmare, vilket leder till påtaglig DNA-skada utöver inhibering av RiBi, vilket vi också noterat (Espinoza JA, et al., 2020). RiBi är en otroligt komplex process som förutom RNA pol I, också kräver en insats av RNA pol II och RNA pol III, samt funktionella system för korrekt splitsning och modifikation av RNA.

Det tredje motivet, men av central betydelse inom detta forskningsområde, är den koppling som finns mellan RiBi och p53. Jag tar nu ett steg tillbaka för att förklara hur det hänger ihop. Celltillväxt (storleksökning) och celldelning är olika processer vilket illustreras i fallet med leverceller där dessa celler dels kan dela på sig, men också växa till i storlek, en princip som gäller för några andra celltyper i kroppen. För mer än 20 år sedan visades att leverceller, som inte kan producera nya ribosomer på grund av tillfällig inaktivering av ett ribosomalt protein, inte kan dela på sig på grund av aktivering av en checkpoint i cellen. Däremot kunde levercellerna öka i storlek och göra nya proteiner då det redan finns pre-existerande funktionella ribosomer (Volaric S et al., 2000). Ribosomer är relativt stabila och långlivade strukturer. Det visade sig att p53 spelar en betydande roll och aktiveras av ett komplex relaterat till ribosomen kallat 5S RNP, när RiBi inte fungerar normalt. Forskningen har under de senaste 15 åren i detalj visat att många olika former av intracellulär stress aktiverar p53 via 5S RNP som binder upp proteinet MDM2. Detta protein, MDM2, är den principiellt viktiga negativa regulatorn och som ser till att nivåerna av p53 i cellen under normala förhållanden är låga (Lindström MS et al., 2018).

DNA-SKADA ELLER RIBOSOMINHIBERING?

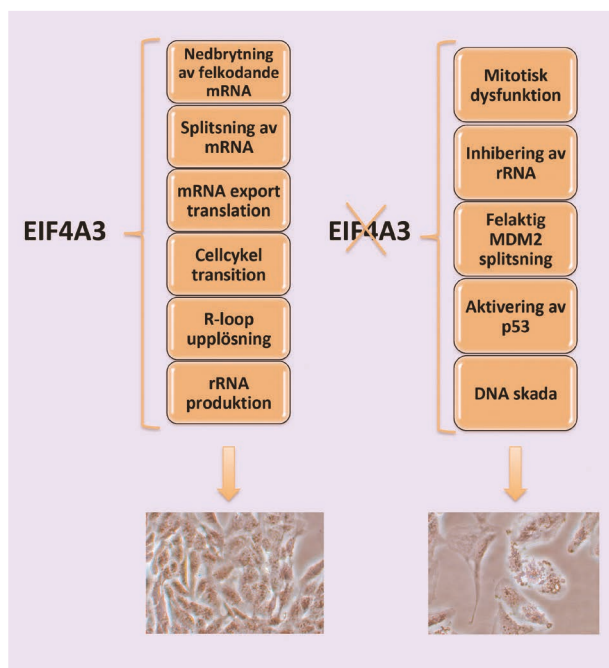
Att olika cancerläkemedel ofta slår mot RiBi som är en mycket aktiv process i en hel del cancerformer, samt att p53 i så stor utsträckning är kopplat till denna process utgör sålunda bakgrunden till vår forskningslinje. Det ska sägas att i många tumörer är p53 inaktiverat genom mutation eller på andra sätt, till exempel genom reducerad aktivitet i 5S RNP. Men, blockering av RiBi leder även i p53-defekta celler till en avstannad celldelning. Notera att effekten av de cytostatika som listas i tabell 1 inte är specifik för RiBi men huruvida man ska betrakta den som en renodlad off-target eller indirekt effekt kan alltid diskuteras. Huruvida blockering

av RiBi bidrar till den cytotoxiska påverkan som får cancer att gå tillbaka är en viktig fråga och bör alltså utvärderas för varje förening. Ett exempel är oxaliplatin, en platinumförening som används i behandling av kolorektalcancer. Bruno och medarbetare presenterade data som indikerar att oxaliplatin effektivt blockerar RiBi snarare än att orsaka DNA-skada som cisplatin (Bruno PM et al., 2017). Det kan också noteras att biverkningsprofilen för oxaliplatin är annorlunda än den för cisplatin. Oxaliplatin stör både transkription av rDNA till rRNA och vidare bearbetning av rRNA samt att det har en akut nedreglerande påverkan på mRNA-translation. Ett andra exempel är 5-FU, denna pyrimidinanalog byggs in i både RNA och DNA och orsakar betydande problem i nysyntes av rRNA utöver den skadliga effekten på DNA-syntes. Intressant nog ingår både oxaliplatin och 5-FU i FOLFOX-behandlingen för kolorektalcancer. Det är möjligt att den relativt effektfulla kombinationen orsakas av RiBi-inhibering, nedreglering av proteinsyntes och viss DNA-skada.

” I studien har vi tillämpat både klassisk cellbiologisk och biokemisk metodik, till exempel elektronmikroskopi och isolering av ribosomer, men också kombinerat dessa med moderna omics-teknologier tillgängliga på SciLifeLab, i syfte att bättre förstå EIF4A3-proteinets funktion i cancercellen.

EIF4A3 – MULTIFUNKTIONELL MÅLTAVLA?

Vi har i en tidigare storskalig screening utvärderat FDA-godkända läkemedel och deras eventuella effekt på RiBi i cancerceller. Vi visade bland annat på att ett malarialäkemedel, amodiaquine, inhiberar RNA pol I samt att amodiaquine har vissa likheter med det experimentella akridinderivatet BMH-21 (Espinoza JA et al., 2020). Flera olika akridinderivat, samt amodiaquine, aktiverar p53 genom inhibering och nedbrytning av RNA pol I, och detta sker ibland i avsaknad av detekterbar DNA-skada, vilket trots allt inducerar apoptos i cancerceller. Engagemanget för vidareutveckling och *drug repurposing* är tyvärr svagt. Vi är dock fortsatt speciellt intresserade av proteiner inblandade, eller som kan antas vara inblandade i RiBi, och hur p53 proteinet beter sig när vi slår ut olika RiBi-komponenter. I vår senaste studie har vi tittat närmare på ett protein som agerar



Figur 1. Det multifunktionella EIF4A3-proteinet. Olika funktioner stöds av EIF4A3 i cancerceller, däribland korrekt splitsning och translation av mRNA, bearbetning av ribosomal RNA och förhindra uppkomst av skadliga DNA-RNA-hybrider (R-loops) vilket är goda nyheter för cancer-cellen som fortsätter att dela på sig effektivt. I avsaknad av EIF4A3 uppstår DNA-skador, MDM2 proteinet bildas inte som det ska, p53 aktiveras, och ribosomproduktionen avstannar. Detta leder till cancercelldöd och minskad tillväxt (till höger).

i gränslandet mellan flera olika processer i cellen. I korthet belyser den nya studien en betydande funktionell roll för proteinet EIF4A3 i intersektionen mellan RNA pol I- och RNA pol II-transkription (Kanellis et al 2021). EIF4A3 är nära besläktat med den funktionellt viktiga translationsfaktorn EIF4A1, som är en mer etablerad måltavla inom preklinisk cancerforskning med avseende på funktion i initiering av mRNA-translation.

I studien har vi tillämpat både klassisk cellbiologisk och biokemisk metodik, till exempel elektronmikroskopi och isolering av ribosomer, men också kombinerat dessa med moderna omics-teknologier tillgängliga på SciLifeLab, i syfte att bättre förstå EIF4A3-proteinets funktion i cancer-cellen. Teknikutveckling och kartläggning av det humana genomet gjorde det möjligt att på ett ganska enkelt sätt med hjälp av siRNA slå ut olika geners produkt på ett systematiskt sätt. Ett protein i de långa listorna med screeningdata som fångade vårt intresse var då EIF4A3. Vi kunde till en början inte förstå varför p53-nivåerna blev så höga i cellen när EIF4A3 slogs ut. Proteinets är en del av EJC-komplexet (engelska, exon-junction complex). Detta proteinkomplex markerar ut gränser mellan exoner som har splitsats ihop. EJC är av betydelse för translation av mRNA samt nedbrytning av felaktiga mRNA. Det fanns dock ingen uppenbar förklaring till det massiva p53-svaret. I olika databaser kunde vi även se att EIF4A3 uttrycket i cancerceller ofta var högre än i korresponderande normal vävnad

Med olika omics-teknologier, bland annat sekvensering av RNA och analys av det totala proteomet ville vi kart-

lägga effekterna av EIF4A3-förlust i cancerceller. Vi jämförde också RNA bundet till olika ribosomfraktioner före och efter EIF4A3-blockad. Det visade sig att förlust eller inhibering av proteinet hämmade RiBi, aktiverade p53, och dämpade proteinsyntesen (Kanellis et al 2020). Cellerna slutade dela sig och gick i apoptos. Men vissa interaktioner inom 5S RNP-MDM2 såg annorlunda ut än de brukade göra, vilket indikerade att förlust av EIF4A3 medförde ytterligare konsekvenser. Vi tittade närmare på MDM2 och observerade då en lång rad förändringar. Olika mindre former av MDM2 mRNA kunde detekteras och även på proteinnivå fanns en mängd nya mindre MDM2-varianter. Dessa varianter förlorar ofta förmågan att antingen korrekt binda till eller bryta ned p53. Förlust eller inhibering av EIF4A3 orsakade stopp i G1- och G2-faserna i cellcykeln. Vi fick nu förklaringen till de höga p53-nivåerna. Celler som saknar EIF4A3 engagerar p53 på flera olika sätt, först och främst genom RiBi-blockad, men även genom uppkomsten av DNA-skada vilket leder till aktiverande modifikationer på p53-proteinet. p53 bibehålls på hög nivå och förstärks i cellen genom att MDM2 inte produceras normalt (Figur 1). Förmodligen är situationen i cellen än mer komplex då vissa nybildade MDM2-varianter ej kan binda 5S RNP.

Trots att EIF4A3-proteinet är klassat som ett essentiellt protein (även RiBi är en essentiell process), och celler dör om man knockar ut genen helt, finns det ett antal intressanta omständigheter som gör att vi ändå bedömer EIF4A3 som en intressant måltavla i likhet med den mer populära familjemedlemmen EIF4A1. Funktionellt tycks proteinet ha ett antal egenskaper som gör nytta för cancer-cellen (Figur 1). Inhibering av EIF4A3 däremot leder till en dämpad proteinsyntes, induktion av DNA-skada, samtidigt som p53 aktiveras. Utöver detta har vi då den intressanta dubbeleffekten då MDM2-proteinet förhindras att effektivt reglera p53. Vi ser också att cellerna iscensätter flera specifika program för celldöd. Små inhibitorer, bland annat mot proteinets ATP-pocket har redan utvecklats och en fortsatt testning av dessa små molekyler i olika cancermodeller är av betydelse för att bringa mer klarhet. Experimentella data visar att additiva eller synergistiska effekter kan uppstå med olika cancerläkemedel, till exempel Actinomycin D. Då nivåerna av EIF4A3-proteinet är betydligt högre i cancer-celler och det är ett vanligt förekommande protein kan det terapeutiska fönstret vara brett. Tumörer drivna av onkogenen c-Myc som driver RiBi-programmet, eller tumörer med amplifikation av MDM2-genen kan tänkas vara mest känsliga.

TÄNKBARA FRAMTIDSUTSIKTER

Läkemedelsutveckling inom cancerområdet har betydande svårigheter och det finns ofta flera hinder på vägen. Bakslaget när MDM2-inhibitorn idasanutlin drogs tillbaka i klinisk prövning av Roche 2020 var en besvikelse för forskare inom området (Mullard 2020). Vi ser dock nya möjligheter i framtiden. Alternativ splitsning av MDM2 har nyligen uppmärksammats som ett möjligt nytt och effektivt sätt att aktivera p53 (Comiskey DF Jr et al., 2020). Vi vet nu från vår studie samt andras arbeten att ett fungerande EJC-kom-

” En del forskare pratar idag om en andra generationens antibiotika mot cancerceller på samma sätt som vi använder antibiotika mot bakterier. Dessa föreningar är ibland påtagligt giftiga, men man undersöker nu cancercellens ribosomer, och om de skiljer sig åt från den normala cellens. Om så är fallet skulle man kunna undkomma tox-problematiken genom att inrikta sig mot skillnaderna.

plex är nödvändigt för slutlig korrekt MDM- mRNA-splitsning och translation. Våra data visar på att EIF4A3-inhibitorer potentiellt effekten av andra p53-aktiverande molekyler såsom Actinomycin D och hämmar ribosom-biogenes på samma gång. Korrelationen mellan celltillväxt, mRNA-translation och RiBi är inte perfekt då cancerceller kan använda olika vägar för att nå samma mål. Det kan finnas mer subtila kvalitativa skillnader och en noggrann analys av genuttrycksmönster avseende transkriptionsfaktorer som styr RiBi och translationsfaktorer kan särskilja nya unika mål och möjliga behandlingsgrupper. Här kan den snabba utvecklingen inom precisionsmedicin och bioinformatik komma till nytta genom att identifiera de tumörer som är mest beroende av respektive process, kanske då även tumörer som är allra mest beroende av EIF4A3.

I ett vidare perspektiv fortsätter utvecklingen av den nya generationens RiBi-inhibitorer. En omständighet som har varit besvärlig är att det föga förvånande är som så att flera föreningar som blockerar RiBi har andra och samtidiga verkningsmekanismer. Detta behöver egentligen inte innebära en nackdel ur terapeutisk synvinkel, tvärtom, men att utvärdera biologiska mekanismer i detalj kräver dock kompletterande och betydligt mer precisa verktyg. Det kan dock också innebära säkerhetsproblematik samt oönskad genotoxicitet. Vi kommer den närmaste tiden också att få ta del av nya forskningsresultat där man utnyttjat den nya strukturella informationen om ribosomen. En del forskare pratar idag om en andra generationens antibiotika mot cancercel-

ler på samma sätt som vi använder antibiotika mot bakterier. Dessa föreningar är ibland påtagligt giftiga, men man undersöker nu cancercellens ribosomer, och om de skiljer sig åt från den normala cellens. Om så är fallet skulle man kunna undkomma tox-problematiken genom att inrikta sig mot skillnaderna. Förutom dessa försök kommer det även att göras fortsatta ansträngningar att utveckla mer specifika RiBi-inhibitorer, betydligt mer så än de som finns tillgängliga idag. För det finns faktiskt ingen förening i dagsläget som är helt specifik enbart för RNA pol I. För att detta ska lyckas måste vi rent fundamentalt öka vår förståelse för den komplexa process som RiBi utgör. Det finns en hel del kvar att upptäcka både om EIF4A3 och cancercellens ribosomer.

REFERENSER

Bruno PM, Liu Y, Park GY, Murai J, Koch CE, Eisen TJ, Pritchard JR, Pommier Y, Lippard SJ, Hemann MT. A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nat Med.* 2017, 23(4):461-471.

Peltonen K, Colis L, Liu H, Trivedi R, Moubarek MS, Moore HM, Bai B, Rudek MA, Bieberich CJ, Laiho M. A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity. *Cancer Cell.* 2014, 25(1):77-90.

Bywater MJ, Poortinga G, Sanij E, (...), Hannan RD. Inhibition of RNA polymerase I as a therapeutic strategy to promote cancer-specific activation of p53. *Cancer Cell.* 2012, 22(1):51-65.

Lindström MS, Jurada D, Bursac S, Orsolic I, Bartek J, Volarevic S. Nucleolus as an emerging hub in maintenance of genome stability and cancer pathogenesis. *Oncogene.* 2018, 37(18):2351-2366.

Kanellis DC, Espinoza JA, Zisi A, Sakkas E, Bartkova J, Katsori AM, Boström J, Dyrskjøt L, Broholm H, Altun M, Elsässer SJ, Lindström MS, Bartek J. The exon-junction complex helicase eIF4A3 controls cell fate via coordinated regulation of ribosome biogenesis and translational output. *Sci Adv.* 2021, 7(32):eabf7561.

Espinoza JA, Zisi A, Kanellis DC, Carreras-Puigvert J, Henriksson M, Hühn D, Watanabe K, Helleday T, Lindström MS, Bartek J. The antimalarial drug amodiaquine stabilizes p53 through ribosome biogenesis stress, independently of its autophagy-inhibitory activity. *Cell Death Differ.* 2020, 27(2):773-789.

Burger K, Mühl B, Harasim T, Rohrmoser M, Malamoussi A, Orban M, Kellner M, Gruber-Eber A, Kremmer E, Hölzel M, Eick D. Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J Biol Chem.* 2010, 285(16):12416-25.

Volarevic S, Stewart MJ, Ledermann B, Zilberman F, Terracciano L, Montini E, Grompe M, Kozma SC, Thomas G. Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science.* 2000, 288(5473):2045-7.

Comiskey DF Jr, Montes M, Khurshid S, Singh RK, Chandler DS. SRSF2 Regulation of MDM2 Reveals Splicing as a Therapeutic Vulnerability of the p53 Pathway. *Mol Cancer Res.* 2020, (2):194-203.

Mullard A. p53 programmes plough on. *Nat Rev Drug Discov.* 2020, (8):497-500.

MIKAEL LINDSTRÖM, PHD, DOCENT, INSTITUTIONEN FÖR MEDICINSK BIOKEMI OCH BIOFYSIK, KAROLINSKA INSTITUTET, MIKAEL.LINDSTROM@KI.SE

