





Nu kartläggs cancercellers organisation med ny metod

Hur enskilda cancerceller ändrar sig över tid kan förklara varför hjärntumörer utvecklas så olika, och varför en del cancerceller är resistenta mot vissa behandlingar. Forskare vid Uppsala universitet har tagit fram en ny metod för att kartlägga cancercellernas utveckling. I förlängningen kan metoden göra det enklare att ta fram nya effektiva läkemedelskombinationer. Studien, som presenterats i tidskriften *Molecular Systems Biology*, beskrivs här av forskarna **Ida Larsson** och **Erika Dalmo**.



Varje år diagnostiseras cirka 400 personer i Sverige med den aggressiva hjärntumören glioblastom. Dagens standardbehandling utgörs av kirurgi i kombination med strålbehandling och kemoterapi (temozolomid). Då både strålbehandling och kemoterapi riktas mot celler som delar sig kommer vilande cancerceller som inte avlägsnats kirurgiskt ge upphov till nybildning av tumören. Tyvärr är detta i stort sett alltid fallet, vilket resulterar i en medianöverlevnad på cirka 15 månader för dessa patienter¹.

Att hitta målinriktade behandlingar mot glioblastom har visat sig svårt då cancercellerna i sig skiljer sig mycket åt mellan olika patienter. På senare tid har dock forskningsfältet kring glioblastom delvis skiftat fokus från att fokusera på olikheter mellan patienter² till att utforska skillnaderna mellan cancercellerna i en och samma patient³. En rådande hypotes har varit att cellerna som återstår efter standardbe-

handlingen är så kallade cancerstamceller som sedan ger upphov till en ny tumör. I ett sådant scenario skulle patienterna kunna botas med en målinriktad behandling mot dessa cancerstamceller. Parallellt har det funnits en idé om att så kallade cancerstamceller inte borde tillskrivas alla stamcells-egenskaper som finns i normal vävnad, där en viktig egenskap är att dessa ej kan uppstå från mer specialiserade celler. Att kunna skilja på dessa scenarion kan vara avgörande för att utveckla en fungerande behandlingsstrategi – om celler som uppvisar en större grad av specialisering kan bli mer stamcellslika och ge upphov till en tumör räcker det inte med att hitta en behandling som enbart avlägsnar stamcellspopulationen utan en annan strategi behövs.

TVÄRVETENSKAPLIG METOD

För att närma oss svaret på vilket scenario som stämmer har vi utvecklat en metod att följa enskilda cancerceller

och deras avkomma in vitro, det vill säga hos humana glioblastomceller som växer i cellodlingsskålar. Själva metoden är tvärvetenskaplig, då den bygger på en kombination av laborativt arbete och matematisk modellering⁴. I den laborativa delen märks ett tusental enskilda glioblastomceller in slumpmässigt med en slags genetisk streckkod, som integreras i cellernas DNA med hjälp av ett lentivirus. När cellerna sedan delar sig ärver deras dotterceller streckkoden och detta kan användas för att härleda vilka celler som är nära släkt med varandra. För att få information om varje enskild cell använder vi oss av metoden singel-cell-RNA-sekvensering. Det är ett sätt att läsa av hur mycket enskilda gener uttrycks i varje cell. Den samlade informationen om varje cells genuttryck kan användas för att bygga upp en profil för den cellen, och vi kan få en uppfattning om den är mer stamcellslik eller mer specialiserad. Det fiffiga med RNA-sekvenseringen är att vi i samma veva kan läsa av cellens streckkod. Därför har vi både information om vilken typ av cell vi har samt vilka andra celler den är släkt med.

I vårt försöksupplägg tillåts en grupp streckkodsinmärkt celler växa under ett antal veckor och med jämna mellanrum skördas ett stickprov av cellerna för att ge en bild av hur de ändrar sig över tid.

Från den laborativa delen får vi alltså ut en mängd användbar information för varje cell. Vi känner till cellens genuttryck och, tack vare streckkoden vi stoppat in i cellerna, även dess släktträd. Den här typen av data är mycket omfattande, i vårt fall får vi information om ungefär 6 000 celler per celllinje med uttrycket för cirka 20 000 gener per cell, vilket gör det omöjligt att på ett meningsfullt sätt analysera för hand. Vi har därför utvecklat en matematisk modell som på ett beräkningsmässigt smart sätt kan analysera våra data – själva analysen tar inte mer än några sekunder. Den slutliga modellen kallar vi för STAG, en förkortning för State Transitions And Growth. STAG börjar med att dela upp cellerna i ett visst antal grupper baserat på genuttryck. Dessa grupper representerar de olika stadier en tumörcell kan befinna

sig i, till exempel mer stamcellslik eller mer specialiserad. STAG använder sedan informationen om vilken grupp cellen tillhör, tillsammans med vilken streckkod den har och vilken experimentell tidpunkt den representerar, för att räkna ut flödet av celler mellan grupperna över tid. Resultatet visualiseras slutligen som ett nätverk där varje nod representerar en grupp och pilar mellan noderna ger riktning och storlek på flödet av celler mellan grupperna.

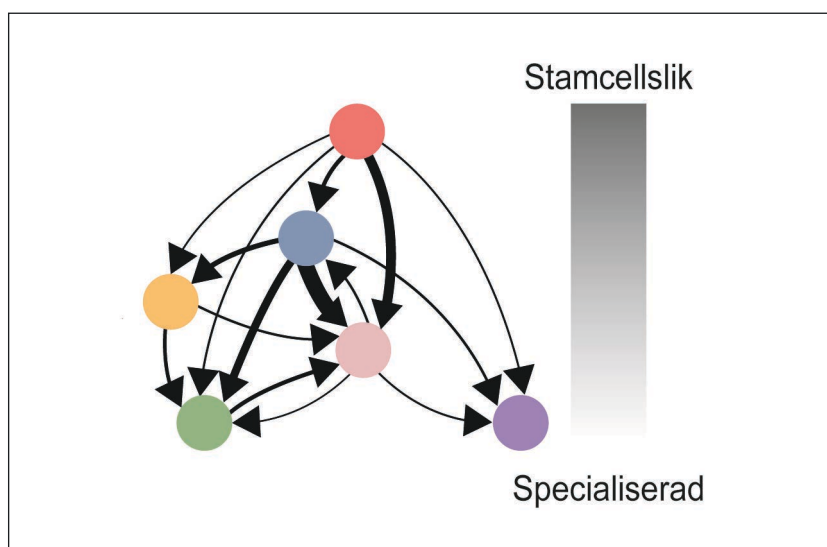
KLASSISK MATEMATIK

Det häftiga med att beskriva flödet av celler mellan grupper på detta sätt är att vi kan använda klassisk matematik för att göra olika förutsägelser om vårt dynamiska tumörcellssystem. Vi kan till exempel räkna ut systemets egenvärden och egenvektorer, två grundläggande algebraiska koncept som har viktiga tolkningar inom tumörbiologi⁵. Systemets egenvärden kan användas för att förutsäga den minsta rubbningen av systemet som krävs för att det ska kollapsa. I vårt fall använde vi detta för att förutsäga vad som behöver adderas till temozolomidbehandling för att bromsa tillväxten av tumören. Systemets egenvektorer kan å andra sidan ge en uppfattning om hur fördelningen av de olika grupperna stabiliseras över tid, till exempel om en grupp kommer ta

över (räknat i antalet celler som befinner sig i den gruppen) eller dö ut. Det kan ge värdefull information vid läkemedelsbehandling – är det så att en viss grupp tar över efter behandling och kan den i så fall representera en grupp av läkemedelsresistenta celler?

För att testa vår metod har vi använt celler från The Human Glioblastoma Cell Consortium (HGCC)⁶ vilket är ett samarbete mellan flera forskargrupper inom forskningsprogrammet neuroonkologi vid Uppsala universitet och Akademiska sjukhuset. I detta samarbete har kirurgiskt avlägsnade tumörbitar från patienter skickats till oss för att vi ska kunna upprätta karakteriserade cellinjer som används i vidare forskning på glioblastom.

Den första cellinjen vi valde att undersöka härstammar från tumören hos en 77-årig manlig patient. Från denna patient kunde vi se att cellerna delade in sig i sex olika grupper, varje grupp med en specifik profil. Vi såg även att det fanns en tydlig organisation bland dessa grupper (figur 1). Från gruppen i toppen av nätverket flödade cellerna enbart nedåt, det vill säga inga celler rörde sig till gruppen från någon annan grupp. Det tyder på att denna grupp har stamcellslika egenskaper. I botten av nätverket fanns en grupp celler med så kallad negativ tillväxthastighet. Det betyder i detta sammanhang att fler



Figur 1: Flödet av celler mellan grupper i en cellinje derivad från en 77-årig manlig patient. De färgade noderna representerar enskilda grupper med en specifik transkriptionell profil, och pilarnas riktning och storlek representerar hur cellerna rör sig mellan dessa grupper. Gradienten indikerar hur grupperna förhåller sig till skalan stamcellslik – specialiserad.

celler dör än föds här, och denna grupp skulle därför kunna ses som en slutstation för cellerna. Mellan dessa två grupper fanns ytterligare fyra grupper i nätverket som cellerna rörde sig fram och tillbaka mellan, vilket tyder på att det finns ett visst mått av flexibilitet i systemet.

” Vår studie har visat att cancer-cellernas organisation skiljer sig mellan patienter, men att det verkar finnas en hierarkisk stomme som är gemensam.

TYDLIG OMORGANISATION

För att se hur delar av dagens standardbehandling påverkade organisationen testade vi att upprepa försöket med temozolomidbehandlade celler. Det resulterade i en tydlig omorganisation i nätverket – vissa flöden mellan grupper minskade eller försvann helt, medan andra ökade eller tillkom. Intressant nog uppstod helt nya flöden till toppen av nätverket, vilket kan tolkas som att relativt specialiserade celler kan bli mer stamcellslika under rätt förhållanden.

För att få en uppfattning om hur stor skillnad det är mellan patienter utökade vi vår studie till ytterligare två cellinjer från HGCC-samlingen, varav en enligt tidigare karaktärisering uppvisade en profil som skilde sig från den ursprungliga cellinjen medan den andra hade en snarlik profil. Vi kunde se att det finns tydliga likheter mellan patienterna, till exempel i antalet grupper som cellerna organiserar sig i och dessa grupper samlade genuttryck. Likhe-

terna var störst mellan cellinjerna med liknande profil, medan den avvikande cellinjen även stack ut i sin organisation. Den senare uppvisade till exempel en strikt hierarkisk organisation utan flexibilitet i systemet.

Flera viktiga slutsatser kan dras utifrån dessa resultat. Till att börja med

har vår studie visat att cancercellernas organisation skiljer sig mellan patienter, men att det verkar finnas en hierarkisk stomme som är gemensam. Dessutom ser vi indikationer på att det inte kommer att fungera att utveckla riktad behandling enbart mot cancerstamceller i glioblastom, eftersom mer specialiserade celler kan återgå till ett mer stamcellslikt stadium, till exempel som svar på läkemedelsbehandling. Istället kan en väg framåt vara att utnyttja det vi känner till om hela organisationen och på så sätt rikta oss mot den som helhet. Till detta kan vi använda våra beräkningar av vilka störningar som krävs för att störta hela systemet, vilket i framtiden förhoppningsvis kan över sättas till fungerande läkemedelsbehandlingar.

I dagsläget är metoden utvecklad och testad på glioblastomceller in vitro, men visionen är att den ska fungera som en grund för vidare studier – både i miljöer som liknar tumörcellernas ursprungliga in vivo, samt inom andra

cancerformer där effektiva behandlingsalternativ idag saknas.

REFERENSER

- [1] Ostrom, Q. T. et al (2019) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-oncology* 21, Suppl 5:v1-v100
- [2] Wang Q, Hu B, Hu X, Kim H, Squatrito M, Scarpace L, deCarvalho AC, Lyu S, Li P, Li Y et al (2018) Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment. *Cancer Cell* 33: 152
- [3] Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ, Richman AR, Silverbush D, Shaw ML, Hebert CM et al (2019) An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma. *Cell* 178: 835–849
- [4] Larsson, I, Dalmo, E, Elgendy, R, Niklasson, M, Doroszko, M, Segerman, A, Jörnsten, R, Westermark, B, Nelander, S (2021). Modeling glioblastoma heterogeneity as a dynamic network of cell states. *Mol Syst Biol*, 17, 9:e10105
- [5] Varfolomeev SD, Lukovenkov AV (2018) Instability of the null steady state: the fundamental problem of inhibiting malignant cell growth. *Russ J Phys Chem A* 92: 1423–1428
- [6] Xie Y, Bergström T, Jiang Y, Johansson P, Marinescu VD, Lindberg N, Segerman A, Wicher G, Niklasson M, Baskaran S et al (2015) The human glioblastoma cell culture resource: validated cell models representing all molecular subtypes. *EBioMedicine* 2: 1351–1363

IDA LARSSON, DOKTORAND VID INSTITUTIONEN FÖR IMMUNOLOGI, GENETIK OCH PATOLOGI, UPPSALA UNIVERSITET, IDA.LARSSON@IGP.UU.SE



ERIKA DALMO, DOKTORAND VID INSTITUTIONEN FÖR IMMUNOLOGI, GENETIK OCH PATOLOGI, UPPSALA UNIVERSITET, ERIKA.DALMO@IGP.UU.SE

