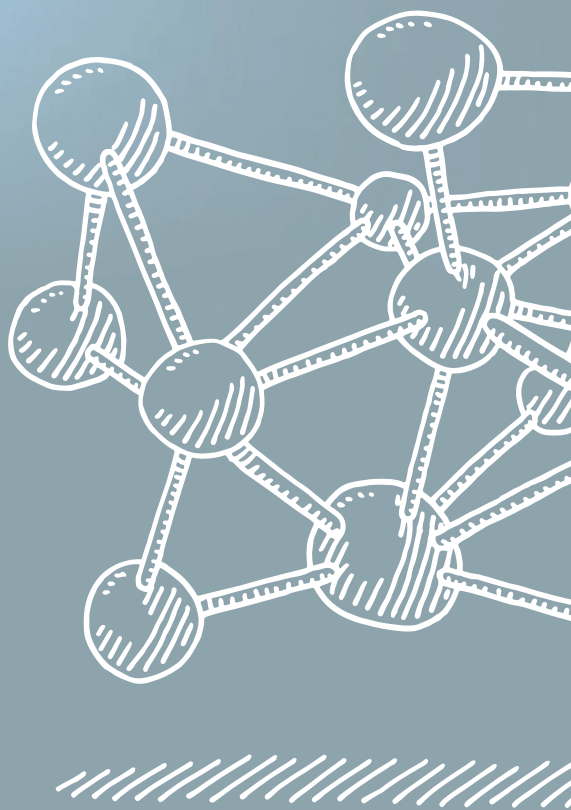


# Incidensen av levercancer **ökar över hela världen**

– nu presenteras nya rön som  
kan förbättra behandlingen

// Det saknas  
förståelse för  
de underliggande mole-  
kylära mekanismer som  
orsakar den onormala  
cellfenotypen, delvis  
eftersom HCC i allmän-  
het diagnostiseras i ett  
långt utvecklat stadium  
av sjukdomen.



Forskare vid Karolinska Institutet har identifierat förekomsten av en specifik kombination av ett protein och en lncRNA-molekyl i levercancer. Genom att öka förekomsten av lncRNA-molekylen minskar tumörcellernas fettdepåer vilket leder till att tumörcellernas delning upphör, och att de så småningom dör. Studien, som publicerats i den framstående tidskriften *Gut*, bidrar till ökad kunskap som kan leda till bättre diagnos och framtida cancerbehandlingar.

Docent **Claudia Kutter** skriver här om hur den nya kunskapen kan förbättra diagnostik och behandling av levercancer.

Levern är inte bara det tyngsta inre organet utan också den största körteln i människokroppen. De gamla grekerna trodde att levern är källan till liv, centrum för känslor och säte för själen. Redan år 300 f.Kr. postulerade den grekiske läkaren Herophilus av Chalcedon att levern tar näring från tarmen för att omvandla den till energi som distribueras via blodet till resten av kroppen. Även om Herophilus beskrivning är enkel, fångade den leverns centrala roll som en ”metabolisk koordinator”.

Idag vet vi, efter århundraden av noggrann forskning, att levern fungerar i hematopoies, det vill säga blodbildning, i det tidiga embryot och övergår i metaboliska och avgiftande funktioner senare i livet. Under den kontinuerliga processen att bryta ner giftiga ämnen kan levervävnaden skadas. Anmärkningsvärt nog har levern en oöverträffad hög förmåga att reparera sig själv. Men om denna självregenerativa kapacitet är uttömd är vägen mot irreversibla leversjukdomar satt. Cancer är den mest elaka leversjukdomen med över 905 000 nya fall per år över hela världen<sup>1</sup>. År 2030 förutsågs en inci-

densökning på upp till 35 procent i många länder, inklusive Sverige, på grund av kroniska hepatitvirusinfektioner, ohälsosam livsstil eller exponering för cancerframkallande ämnen. Även genetiska faktorer bidrar till utveckling av levercancer<sup>2</sup>. Primär levercancer omfattar en samling av kliniskt olika tumörsubtyper, där hepatocellulärt karcinom (HCC) drabbar 80 procent av alla diagnostiserade patienter<sup>1</sup> och därmed är den vanligaste formen av levercancer.

På histologisk nivå kännetecknas HCC av okontrollerad levercelltillväxt och -förökning, vilket bidrar till leverdysfunktion. Det saknas förståelse för de underliggande molekylära mekanismer som orsakar den onormala cellfenotypen, delvis eftersom HCC i allmänhet diagnostiseras i ett långt utvecklat stadium av sjukdomen. Endast en av fem patienter är fortfarande vid liv ett år efter diagnosen vilket gör HCC till en av de dödligaste cancertyperna<sup>1</sup>. Trots denna alarmerande statistik finns det bara ett fåtal behandlingsalternativ. De flesta patienter upplever återfall efter operation, och de två godkända läkemedlen som hämmar tyrosinkinasaktivitet, sorafenib och lenvatinib, förlänger endast patienters medellivslängd med ett år<sup>3</sup>. Därför är det av största vikt att nya diagnostiska markörer och behandlingsalternativ utvecklas för primär levercancer.

**Intressant nog, genom tekniska framsteg, har många fler proteiner identifierats som binder RNA, trots att de saknar någon känd RNA-bindande domän. Sådana proteiner kallas icke-kanoniska RBP.**

### HAR KOMPLEXA TRANSKRIPTOM

Celler har utvecklat sofistikerade sätt att kontrollera flödet av genetisk information från DNA via RNA till protein, vilket säkerställer korrekt cellfunktion och pålitlig överföring av genetiskt material. Onormalt genuttryck och transkriptbildning kan störa denna balans och leda till sjukdomar, såsom primär levercancer. Under de senaste decennierna har intensiv forskning fokuserat på att identifiera faktorer som bidrar till den fenotypiska mångfalden i cancerceller. Till exempel avslöjade profileringen av ett stort antal patientbiopsier distinkta RNA-signaturer för varje cancertyp och resulterade i mer exakt tumörtyp, stratifiering och sjukdomsprognos<sup>4</sup>. Även om den genetiska regleringen av RNA, kallad riboreglering, är väsentlig, förblir den exakta cellulära påverkan ofta understuderad.

Efter transkription interagerar en RNA-molekyl med RNA-bindande proteiner (RBP). RBP:er är viktiga enzymer för korrekt funktion av RNA-reglerande processer. Mutationer i RBP-gener förändrar interaktionen med RNA, vilket kan påverka eller leda till sjukdom. När ett RBP och RNA interagerar bildar de specialiserade ribonukleära komplex (RNP). Denna interaktion kan ske med hjälp av RNA-

bindande domäner som är distinkta strukturella enheter inom RBP. Proteiner med en känd RNA-bindande domän kallas kanoniska RBP. Intressant nog, genom tekniska framsteg, har många fler proteiner identifierats som binder RNA, trots att de saknar någon känd RNA-bindande domän. Sådana proteiner kallas icke-kanoniska RBP. För närvarande omfattar katalogen över kanoniska och icke-kanoniska RBP:er cirka 5 000 proteiner. Det betyder att ungefär en fjärdedel av alla proteiner i människokroppen har potential att binda RNA och forskare har bara börjat förstå den fulla omfattningen av komplexiteten i RBP:s verkningssätt. Även om det är känt att RBP:er kan koordinera ett transkripts öde i många olika molekylära processer, allt från kromatinförpackning till mRNA-translation<sup>5</sup>, är det nödvändigt att karakterisera vilka RBP:er det gäller, och hur dessa bidrar till den varierande sammansättningen av transkript i cancerceller. Denna kunskap är väsentlig för att förbättra framtida RNA-baserade cancerbehandlingsstrategier.

### LncRNA BLIR TERAPEUTISKA MÅL

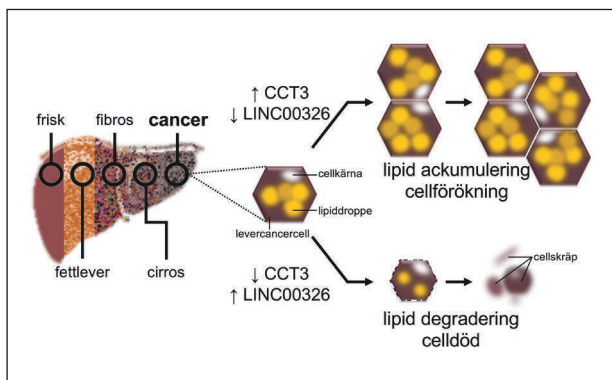
Förutom gener som kodar för proteiner kan mer än 50 000 gener i det mänskliga genomet ge upphov till långa icke-kodande RNA (lncRNAs)<sup>6</sup>. LncRNA definieras som transkript som är längre än 200 nukleotider med ingen eller låg proteinkodande potential. Även om uttryck av lncRNA är starkt avreglerat i olika humana cancerformer, har endast ett fåtal lncRNA karakteriserats. Som exempel har lncRNA, som också blivit funktionellt kopplade till levercancer, kopplats till reglering av cellcykeln, proliferation och immunsvaret. Anmärkningsvärt nog, och till skillnad från proteinkodande (mRNA) gener, är uttrycket av lncRNA:s spatio-temporärt begränsat och mycket sjukdomsspecifikt<sup>7</sup>.

Detta unika genuttryck är exceptionellt och understryker användningen av lncRNA som lovande mål för utveckling av biomarkörer, sätt att följa sjukdomsprognos och nya läkemedel. Att modulera mängden av en specifik lncRNA-molekyl har enorma terapeutiska fördelar eftersom det endast kommer att påverka sjuka celler, vilket förhindrar allvarliga behandlingsbiverkningar. Konceptet liknar det för andra RNA-baserade läkemedel eller RNA-vaccin som redan har gått in i kliniska prövningar eller är godkända för patientanvändning<sup>8</sup>.

Allt detta belyser att forskning om lncRNAs håller på att växa fram och att nya framsteg i utvecklingen av lncRNA för kliniska ändamål är nära förestående.

### NYA RÖN KAN GE BÄTTRE BEHANDLING

För att få en bättre förståelse av riboreglering i cancerceller jämförde vi transkriptionsammansättningen i celler från hundratal patienter med levercancer och andra cancertyper<sup>9</sup>. För detta ändamål kombinerade vi offentligt tillgängliga data och genererade flera nya stora datauppsättningar. En ny datauppsättning baserad på vävnadsmaterial förvärvades, som generöst donerats av patienter med levercancer. Genom analys av de olika datauppsättningarna fann vi att 7 000 gener avreglerades i levercancer. Bland dessa identifierade vi att genuttrycksnivåer av RBP:er är högre i levercancerceller jämfört med patologiska normala leverceller.



Figur 1: Olika leversjukdomsprogressioner från normal till cancer illustreras (till vänster). CCT3 är högt och LINC00326 är lågt förekommande i levercancer celler, vilket underlättar lipidackumulering till bränslecellsproliferation (uppe till höger). Däremot resulterar minskning av CCT3 och ökande LINC00326-genuttryck i cellulär lipidnedbrytning och levercancer celldöd.

Högt uttryck av de RBP:er som vi undersökte vidare, var associerat med högre riskkvoter, vilket är indikativt för en minskad chans för patientöverlevnad. Därför har RBP-genuttryck prognostiskt värde för levercancer och kan läggas till den befintliga panelen av biomarkörer i framtiden.

När vi minskade nivåerna av dessa uppregerade RBP:er i levercancer celler (HepG2 och Huh7) genom *RNA interference* (en metod då RNA-molekyler används för specifik nedreglering av mål-molekylen), mätte vi ett lägre antal metaboliskt aktiva celler och en minskning av cellproliferation, samt ett högre antal döda celler och en ökning av cellapoptos. Det visar att minskningen av RBP-genuttryck kan begränsa cancer celltillväxt. Utveckling av kemiska föreningar som kan blockera RBP:er kan därför implementeras i framtida strategier för cancerterapi. Men eftersom RBP:er kontrollerar flera typer av RNA-molekyler, är det fortfarande svårt att rikta in sig specifikt på den skadliga effekten utan att samtidigt skada de fördelaktiga aspekterna av RBP-aktiviteten. Därför resonerade vi att nedtröms RBP-bindande molekyler är bättre alternativ för framtida cancerterapi. Vi fokuserade därför på RNA-molekyler som regleras av RBP. LncRNA är särskilt relevanta eftersom deras uttryck är mycket celltypspecifikt. Vi verifierade våra nyligen identifierade lncRNA-kandidater genom att producera och analysera storskalig sekvenseringsdata från cancer celler där vi antingen minskade eller ökade mängden lncRNA-molekyler genom avancerad CRISPR-teknologi. Mer detaljerad undersökning av ett distinkt RBP-lncRNA-par, det icke-kanoniska RBP CCT3 och lncRNA LINC00326, gjorde det möjligt för oss att detektera hämmande effekter på tumörtillväxt och lipidmetabolism (Figur 1).

#### STARK KLINISK RELEVANS

Sofistikerade *in cellulo*- och *in vivo*-experimentella metoder, som vi skraddarsydde enligt resultatet av vår första dataana-

lys, gjorde det möjligt för oss att utföra djupgående mekanistiska studier. Vi presenterar ett av de första exemplen på att lncRNA kan bidra till att skadliga aktiviteter slutar i en sjuk cell – i vårt fall förhindrande av cellulär lipidackumulering. Vi tror att aktiviteterna för CCT3-LINC00326-paret kan användas vid både levercancerdiagnos och prognos. I motsats till proteinkodande RNA kan lncRNA bli värdefulla terapeutiska mål, antagligen med låga biverkningar eftersom endast sjuka celler är målet, snarare än alla celler inklusive de friska. I ljuset av framväxande RNA-terapi kan inriktning på lncRNA bli ett framtida behandlingsalternativ för cancer.

Våra nuvarande fynd uppmuntrar till att undersöka fler RBP-RNA-par. Det kommer att hjälpa oss att få en mycket bättre vetenskaplig förståelse av hela komplexiteten i denna sammanflätade protein-RNA-reglering. Att identifiera vilka cellulära svar som kontrolleras av RBP-lncRNA-par och som kan moduleras specifikt har stark klinisk relevans för att utveckla metoder för att förändra tumörsammansättningen mot cellulära fenotyper som är mindre aggressiva, eller framtagande av mer målinriktade läkemedel. Vårt långsiktiga mål är att erbjuda nya behandlingsalternativ. När vi fastställer de minimala kraven som gör lncRNA effektiva, kan lncRNA så småningom användas i mer exakta behandlingsstrategier för alla cancer typer.

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021; 71: 209-49.
2. McGlynn KA, Petrick JL, El-Serag HB. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2021; 73: 4-13.
3. Alqahtani A, Khan Z, Alloghbi A, S. Said Ahmed T, Ashraf M, M. Hammouda D. Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanisms and Targeted Therapies. *Medicina*. 2019; 55: 526.
4. Rebouissou S, Nault J-C. Advances in molecular classification and precision oncology in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2020; 72(2): 215-29.
5. Collins LJ, Kurland CG, Biggs P, Penny D. The Modern RNP World of Eukaryotes. *Journal of Heredity*. 2009; 100: 597-604.
6. Hon C-C, Ramiłowski JA, Harshbarger J, Bertin N, Rackham OJL, Gough J, et al. An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. *Nature*. 2017; 543: 199-204.
7. Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, Singhal U, Sahu A, Hosono Y, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nature Genetics*. 2015; 47: 199-208.
8. Lundstrom K. RNA-based drugs and vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 2015; 14: 253-63.
9. Søndergaard JN, Sommerauer C, Atanasoai I, Hinte LC, Geng K, Guiducci G, et al. CCT3-LINC00326 axis regulates hepatocarcinogenic lipid metabolism. *Gut*; 2022. p. gutjnl-2021-325109.

CLAUDIA KUTTER, DOCENT, INSTITUTIONEN FÖR MIKROBIOLOGI, TUMÖR- OCH CELLBIOLOGI, KAROLINSKA INSTITUTET, CLAUDIA.KUTTER@KI.SE

