

” Även om förståelsen av de grundläggande biologiska processerna hos leukemier har ökat markant med hjälp av sekvenseringsstudier av DNA och RNA, finns det alldeles för få individanpassade och målinriktade behandlingar – och nya tillvägagångssätt behövs för att nå målen.



Ny metod för att identifiera – och utforska deras koppling

Forskare vid Institutionen för onkologi-patologi på Karolinska Institutet och The European Molecular Biology Laboratory har tillsammans utvecklat en ny metod som kan identifiera och särskilja viktiga fysikaliska skillnader mellan proteinvarianter på ett objektivt sätt. Metoden möjliggör systematisk klassificering av olika proteinvarianter vilket har bäring på utvärdering av läkemedelskänslighet, och presenteras i en artikel i Nature Chemical Biology.

Genom att kombinera termisk proteomik och grafteori, undersöktes termostabiliteten hos proteiner på peptidnivå, och baserat på smältkurvornas utseende identifierades fall där olika peptidpopulationer från ett och samma protein skiljde sig åt. I dessa fall förekommer proteinet sannolikt i flera varianter, så kallade proteinformer. Förhoppningen är att proteinformerna ska kunna fungera som fingeravtryck för att identifiera biomarkörer för precisionsbehandlingar.

Här beskriver forskningsledaren **Rozbeh Jafari** den senaste kunskapen på området.



funktionella proteinform till läkemedelskänslighet

Akut lymfatisk leukemi (ALL) är en cancerform som uppstår i benmärgen där omogna blodceller, så kallade lymfoblaster, förökar sig okontrollerat. ALL är den vanligaste typen av cancer hos barn, men leukemifallen är till antalet högst hos vuxna, och prognosen försämras med stigande ålder. De flesta barn med ALL kan behandlas med hormonterapi, cytostatika och stamcellstransplantation, men cirka 15–20 procent svarar dåligt på dessa ospecifika behandlingar och får återfall där behandlingsalternativen är begränsade, något som i sin tur leder till en högre dödlighet.

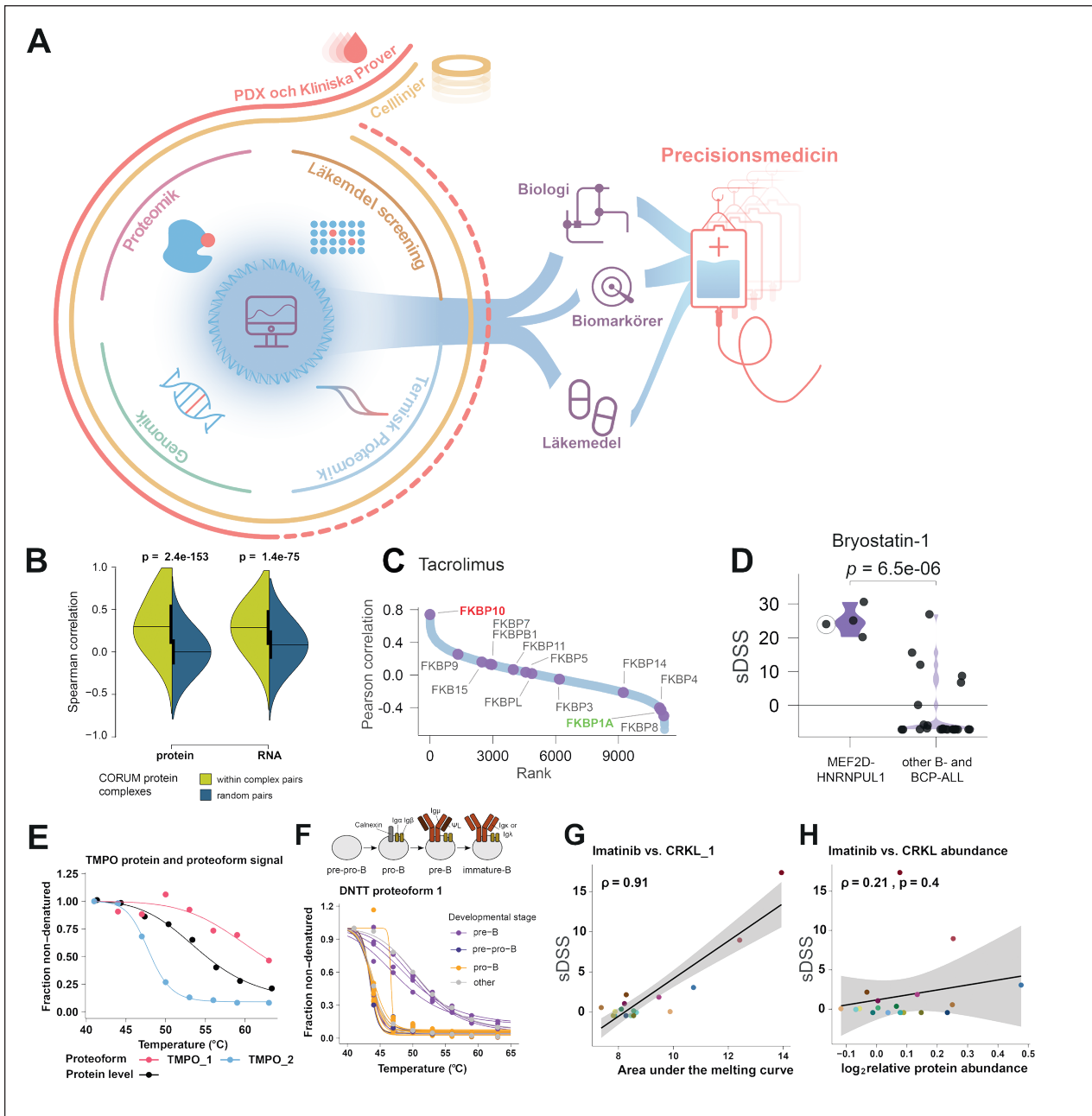
Även hos de barn som överlever sin leukemi kan de nuvarande standardbehandlingarna leda till livslånga och svåra biverkningar för de barn som överlever sin leukemi. Det finns därför ett behov av nya terapeutiska biomarkörer och individanpassade läkemedel som dels kan minska de svåra livslånga biverkningarna, dels kan hjälpa de patienter som inte svarar på behandling. Det är också angeläget med alternativ för patienter som utvecklar resistens och får återfall efter en initialt lyckad behandling.

ALL är en heterogen sjukdom där man traditionellt har använt sig av studier på DNA och RNA för att utforska de genetiska förändringar och de biologiska processer som driver sjukdomen. Detta har haft en betydande roll för klassificering av sjukdomen och för att anpassa behandlingen för bästa möjliga utfall, men har tyvärr inte lett till fler individanpassade och riktade behandlingsalternativ. Ett undantagsfall är patienter med den så kallade Philadelphia-kromosomen (Ph+) som gynnas av behandling med specifika tyrosinkinashämmare som blockerar genprodukten BCR-ABL1.

BEHANDLINGAR SAKNAS

Även om förståelsen av de grundläggande biologiska processerna hos leukemier har ökat markant med hjälp av sekvenseringsstudier av DNA och RNA, finns det alldeles för få individanpassade och målinriktade behandlingar – och nya tillvägagångssätt behövs för att nå målen.

En bidragande orsak till bristen på individanpassade och målinriktade behandlingsalternativ är att genetiska studier



Översiktsbild av pågående multi-omik-studier inom barnleukemier (A). Samband mellan nivåerna på proteiner som är medlemmar inom redan kända komplex visar bättre statistisk signifikans på proteinnivå än på RNA-nivå (B). Graf som visar bättre positivt samband mellan läkemedelskänsligheten för Tacrolimus och FKBP10 (rött) än det redan kända målproteinet FKBP1A (grön) (C). Läkemedelskänsligheten av högrisk subtypen MEF2D-HNRNPUL1 mot bryostatins-1 (D). Smältkurvor för TMPO på proteinnivå (svart) samt uppdelat på dess proteoformer, TMPO_1 (rött) och TMPO_2 (blått) (E). Smältkurvor för proteoform DNTT_1 som i stora drag delar upp cellinjerna i pre-B och pro-B celler (F). Samband mellan läkemedelskänslighet för Imatinib i olika cellinjier baserad på smältkurvorna för proteoform CRKL_1 (G) samt proteinnivå (H).

undersöker genotyp och inte faktisk fenotyp. Denna återges bättre genom studier på proteinnivå, då proteiner är de slutliga verkställande komponenterna i cellen. Studier på proteinnivå (proteomik) har därför i kombination med DNA- och RNA-sekvensering stor potential att dels öka kunskapen kring de bakomliggande molekylära mekanismer som leder till cancer, dels att bättre förstå läkemedlets verkningsmekanism, då proteiner även utgör måltavlor för en majoritet av dagens läkemedel.

I en inledande multi-omik-studie kombinerade vi masspektrometri-baserad kvantitativ proteomik med RNA-sekvens-

ering och läkemedelscreening för att omdefiniera biologin av ALL och för att hitta nya precisionsbehandlingar (FORALL)¹. I studien samlade vi ett femtiotal ALL-cellinjier med olika väldefinierade ALL-subtyper och studerade deras genotyp (genfusioner och RNA-nivåer) samt fenotyp (proteinnivåer) och hur de svarar på 528 olika cancerläkemedel. I denna multi-omik-studie kunde vi visa att proteiner bättre beskriver de signalvägar som karakteriserar leukemier. Vi visade även på tidigare okända proteiner som kan förklara verkningsmekanismerna hos vissa specifika läkemedel.

Slutligen identifierade vi en överraskande och specifik

känslighet hos en subgrupp av ALL-cellinjer med MEF2D-genfusioner mot bryostatin-1. Bryostatin-1 är en naturligt förekommande substans som finns hos marina mossdjur och som har visat sig kunna modulera proteinkinase C (PKC) och dess aktivitet.

Vi kunde visa att bryostatin-1 aktiverade PKC-proteinfamiljen som i sin tur aktiverade en självmordsmekanism som är inaktiverad i dessa omogna celler med MEF2D-genfusioner. Genom att kunna återaktivera denna mekanism ges möjlighet till precisionsbehandling för patienter med MEF2D-genfusioner, vilka tillhör en högriskgrupp.

Vi har gjort vår data lättillgänglig genom att samla den i ett interaktivt webbaserat verktyg (www.proteomics.se/forall) där andra forskare kan utforska protein, RNA-nivåer och läkemedelsvar hos dessa celler och förhoppningsvis göra nya intressanta fynd.

SVÅRT HITTA LEDTRÄDAR

Kvantitativ mätning av RNA- och proteinnivåer är ett effektivt och etablerat tillvägagångssätt för att undersöka de förändringar i cellulära signalvägar som leder till exempelvis leukemier. Dock kan det vara svårt att baserat på enbart dessa metoder hitta de ledträdor som krävs, då upp- och nedreglering av proteinnivåer inte är den enda orsaken till avvikande cell-signaler.

Komplexiteten av proteomet beror förutom på den genetiska informationen och den stora variationen däri, även på annat som exempelvis proteinmodifieringar, tids- och vävnadsspecifikt uttryck, (läkemedels- eller molekylbindning). Proteiner finns till följd av detta i många olika varianter eller former samtidigt, vilket bidrar till komplexiteten i tolkningarna och slutsatserna.

Proteininformerna som bildas har unika egenskaper, vilket öppnar möjligheten till en bredare utveckling av anpassningsbara proteinfunktioner, och kan vara en bidragande faktor till resistensutveckling i till exempel cancerceller. Att studera proteinformer och deras funktioner är därför av stort intresse för att bättre förstå sjukdomsprocesser, men det är även en tekniskt utmanande uppgift att urskilja proteininformerna, och att veta vilka skillnader man ska leta efter.

Cellular Thermal Shift Assay (CETSA) är en banbrytande teknik ursprungligen utvecklad för att ta reda på om ett läkemedel når sitt mål inne i cancercellerna, och grundas på att smälttemperaturen för enskilda protein påverkas då de binder till ett läkemedel². Genom att studera förändringar i smälttemperatur hos enskilda proteiner är det möjligt att direkt mäta omfattningen av läkemedelsbindning. Genom att kombinera CETSA med masspektrometri (MS), så kallad termisk proteomik, vidareutvecklades tekniken ytterligare vilket innebär att vi nu kan analysera och följa smälttemperaturen av hela proteomet i cellerna³. Termisk proteomik har därför stor potential att upptäcka nya alternativa biomarkörer – för cancerutveckling, läkemedelseffektivitet, biverkningar och mekanismer som leder till resistensutveckling. I de fall där proteinnivåer inte kan användas för identifiering av biomarkörer kan förändringar i smälttemperaturen hos proteinerna i stället fungera som en biomarkör.

Vi har i den aktuella studien vidareutvecklat termisk proteomik för att lättare kunna identifiera funktionella proteinformer⁴. Vi undersökte termistabiliteten hos proteiner med termisk proteomik, och baserat på smältkurvornas utseende identifierades med hjälp av grafteori fall där olika peptidpopulationer från ett och samma protein skiljde sig åt. På så sätt sorterades proteiner i sina samexisterande proteinformer. På detta sätt kunde vi genom att applicera metoden identifiera om proteinet förekom i flera fysiska former (proteinformer) genom att använda deras smälttemperatur, men oberoende av deras kvantiteter.

Vi tillämpade metoden på ALL-cellinjer för att identifiera proteinformer associerade med sjukdomsbiologi och läkemedelsvar, med syfte att i förlängningen använda denna kunskap inom precisionsmedicin för att hitta fler riktade behandlingsalternativ.

FLER BEHANDLINGSMÖJLIGHETER

I studien såg vi att proteoform-proteoform-interaktioner från olika proteiner som MDM2-p53 och CXXC1-SETD1A hade samma smälttemperatur i specifika cellinjer och visade ökad känslighet för specifika läkemedel, så som nutlin respektive azacitidine. Vi undersökte även proteinformernas koppling till läkemedelskänslighet från 378 olika cancerläkemedel, och kunde där visa att olika proteinformer av ett givet protein korrelerade olika gällande läkemedelskänslighet. Då samma association inte kunde påvisas genom att enbart kontrollera proteinernas nivåer stärktes idén att smälttemperaturen hos proteinformer i vissa fall kan utgöra en bättre källa till information för att identifiera biomarkörer för precisionsbehandlingar.

Sammanfattningsvis utgör denna metod ett kraftfullt och unikt verktyg som i förlängningen kan leda till viktiga framsteg inom precisionsmedicin och bana väg för effektivare behandlingar.

Nästa steg i detta är att validera ett urval av våra fynd i mer kliniskt relevanta modeller för att stärka hypoteserna och för att kunna ta ett steg närmare kliniken med våra precisionsmedicin-kandidater.

REFERENSER

1. Leo IR, et al. Integrative multi-omics and drug response profiling of childhood acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Nat Commun* 13, 1691 (2022).
2. Martinez Molina D, et al. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science* 341, 84-87 (2013).
3. Savitski MM, et al. Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome. *Science* 346, 1255784 (2014).
4. Kurzawa N, et al. Deep thermal profiling for detection of functional proteoform groups. *Nat Chem Biol*, (2023).

ROZBEH JAFARI, SENIORFORSKARE VID INSTITUTIONEN FÖR ONKOLOGI-PATOLOGI, KAROLINSKA INSTITUTET, ROZBEH.JAFARI@KI.SE

