

Bruk av udødelige cellelinjer i forskning på tarmkreft



Bjarne Johannessen,
overingeniør, ph.d.,
Seksjon for molekylær onkologi,
Institutt for kreftforskning,
K.G. Jebsen senter for tarmkreft-
forskning, Oslo Universitetssykehus



Kaja C. G. Berg,
ph.d.-stipendiat,
Seksjon for molekylær onkologi,
Institutt for kreftforskning,
K.G. Jebsen senter for tarmkreft-
forskning, Oslo Universitetssykehus

Svært mange forskningsmiljøer bruker cellelinjer til funksjonelle studier. Vi har nylig publisert en studie der vi kartlegger genetiske egenskaper hos 34 cellelinjer som stammer fra pasienter med tykk- og endetarmskreft.¹

I denne studien presenterer vi detaljerte data for ulike nivåer av genomvide analyser (DNA, RNA og protein), samt bioinformatisk integrering av data-settene for å tegne et mest mulig komplett bilde av hvilke molekylære særtrekk som karakteriserer de ulike cellelinjene.

Kreftcellelinjer

Humane cellelinjer, kulturer av celler med evne til ubegrenset deling, er essensielle modellsystemer i biomedisinsk forskning. Cellelinjer etablert fra kreftsvulster beholder mange av vevets opprinnelige egenskaper og er blant de viktigste redskapene forskere har for å forstå molekylære mekanismer i kreft. Studier av cellelinjer gir oss verdifull kunnskap om hvilke biologiske prosesser som ligger til grunn for utvikling av kreft, og om hvordan forskjellige typer celler responderer på ulike typer behandling.

Det er stor forskjell mellom ulike krefttyper når det gjelder hvor representative cellelinjene er for sykdommen. Tykk- og endetarmskreft er en mangeartet sykdom der de genetiske variasjonene mellom ulike svulster kan være store. Til tross for at cellelinjene vi

bruker i laboratoriet vokser i et kunstig miljø og kan dele seg i det uendelige, viser imidlertid flere studier at cellelinjer basert på svulster fra tykk- og endetarmskreft speiler mange av de særtrekkene og den heterogeniteten som kjennetegner primære svulster, og at de er representative modeller for denne sykdommen.²⁻⁴

Innsikt i kreftbiologi følger teknologisk utvikling

I løpet av det siste tiåret har den teknologiske framgangen revolusjonert biomedisinsk forskning. De mest effektive sekvenseringsmaskinene er nå i stand til å kartlegge DNA og RNA fra kliniske prøver på bare noen timer. Store internasjonale studier som The Cancer Genome Atlas (TCGA) har ved hjelp av denne teknologien identifisert alle hyppige mutasjoner og avvik i de mest vanlige kreftformene.⁵

Men til tross for at store kliniske serier nå kan analyseres ned til hver enkelte base, er det likevel nødvendig å ha tilgang til prekliniske modellsystemer for å kunne gjennomføre funksjonelle studier på levende celler og oppnå økt kunnskap om det kompliserte samspillet mellom ulike cellulære prosesser. I så måte er cellelinjer effektive redskap ettersom de gjør det mulig å studere de biologiske konsekvensene av for eksempel spesifikke mutasjoner som man finner i kreftsvulster. Studier på cellelinjer gjør det dessuten mulig å undersøke hvordan ulike molekylære egen-



skaper påvirker respons på et stort antall legemidler på en svært tidseffektiv måte.

Molekylære særtrekk ved tarmkreft

Svulster fra tykk- og endetarmskreft deles inn i to undergrupper basert på hva slags genetiske avvik som danner grunnlag for kreftutviklingen. Rundt 15 % av svulstene er gjenstand for mikrosatelitt-ustabilitet (MSI), et fenomen som skyldes defekter i DNA-reparasjonsgener og følgelig akkumulering av punktmutasjoner og korte insersjoner og delesjoner («indels»), spesielt i ikke-komplekse områder av genomet. Mutasjoner i bestemte polymerase-gener kan i ca 1 % av alle tarmkreft-tilfeller føre til tilsvarende høye mutasjonsrater.

Mikrosatelitt-stabile svulster (~85 %) er i all hovedsak kromosom-ustabile (CIN) og kjennetegnes av strukturelle DNA-endringer og til dels store kopitallsavvik i genomet. I tillegg til denne inndelingen på DNA-nivå kan pasienter med tykk- og endetarmskreft kategoriseres i ulike grupper basert på genuttrykk. Den mest etablerte biologiske klassifiseringen basert på genuttrykk kalles "consensus molecular subtypes" (CMS) og har prognostisk betydning uavhengig av tumorstadium.⁶

Integrering av avvik på DNA-, RNA- og proteinnivå – en kilde til ny informasjon og bedre valg av modellsystem

For å kunne utnytte potensialet som ligger i cellelinjer som modellsystem, er det avgjørende å vite hvilke genetiske avvik som kjennetegner de ulike linjene for dermed å kunne velge den modellen som passer best til å teste ut en aktuell hypotese. Mutasjoner på

DNA-nivå kan gi seg utslag på RNA-nivå både gjennom avvikende RNA-produkt og gjennom endring av ekspresjonsnivået, som videre kan påvirke uttrykket av proteiner i cellen. I vår studie inkluderte vi data for genomvide DNA-kopitall, DNA-punktmutasjoner og indels for om lag 600 kreftrelevante gener og kina- ser, samt data for gen-, miRNA- og proteinuttrykk.

Cellelinjepanelet bestod av 11 MSI- og 22 MSS-modeller, samt én hypermutert CIN-cellelinje (HCC2998) med mutasjon i POLE-genet. Vi utviklet et bioinformatisk verktøy for å dele inn cellelinjene i henhold til CMS. Dette var nødvendig fordi CMS-klassifiseringen som er publisert for primære svulster, i stor grad tar hensyn til stroma som ikke er tilstede i cellelinjer.⁶ I henhold til CMS var alle fire subtyper representert: 8 cellelinjer var CMS1, 9 var CMS2, 6 var CMS3 og 10 var CMS4.

To undergrupper av cellelinjer basert på grad av differensiering

Et viktig funn i studien var at cellelinjene kan deles inn i «tarm-lignende» eller udifferensierte cellelinjer basert på analyser av genuttrykk. De tarm-lignende linjene karakteriseres av høyt genuttrykk av differensieringsmarkører, i motsetning til de udifferensierte cellelinjene som har høyt uttrykk av epitelial-mesenchymalmarkører og TGF β -signatur. Skillet mellom de to gruppene var relatert til CMS i den forstand at de tarm-lignende linjene i hovedsak var CMS2 og CMS3, mens de udifferensierte var CMS1 og CMS4.

Vi undersøkte videre sammenhengen mellom endringer i DNA-kopitall og genuttrykk, og for om lag en fjerdedel av genene fant vi god korrelasjon mel-



lom kopitall på DNA-nivå og uttrykket på RNA-nivå. Dette kan tolkes som at uttrykket av disse genene blir påvirket av eventuelle avvik som oppstår på DNA-nivå, og sammen med andre faktorer vil det potensielt bidra til å forme fenotypen. Blant genene med god korrelasjon finner vi et større antall kreft-relevante gener, inkludert transkripsjonsfaktorer som ELF1, KLF5 og LMO7, som alle er relatert til celledifferensiering, og som i større grad var uttrykt i tarm-lignende sammenlignet med udifferensierte cellelinjer.

Cellelinjer som egnede modeller for klinisk relevante problemstillinger

Enkelte cellelinjer vil være særlig godt egnet til å undersøke spesifikke problemstillinger ut fra deres særegne molekylære egenskaper. Vi identifiserte flere karakteristiske avvik som vil være relevant for valg av modellsystem. Et eksempel er amplifikasjon av ERBB2-genet med tilsvarende høyt genuttrykk, som ble observert i 1 av 22 CIN-cellelinjer (Colo678).

HERACLES-studien har nylig vist positiv effekt av behandling med HER2-antistoffer for tykk- og endetarmskreft med ERBB2-amplifikasjon.⁷ Denne cellelinjen kan dermed være av interesse for videre undersøkelser av hvilke funksjonelle konsekvenser ERBB2-amplifikasjon har på relevante signalveier. Den kan videre brukes til å undersøke potensielle

resistensmekanismer mot HER2-hemming i tykk- og endetarmskreft. I tillegg til direkte målgener identifiserte vi også cellelinjer med amplifikasjon av MYC og CCNE1. Disse genene er potensielle biomarkører for positiv effekt av ATR-hemming, og cellelinjene med disse avvikene kan være gode modellsystemer for videre funksjonelle undersøkelser.⁸ ■

KONKLUSJON

I 2013 beskrev vi forekomsten av noen av de mest hyppige molekylære avvikene i tarmkreft i en rekke cellelinjer, og vi har fått betydelig respons fra forskere på dette arbeidet.⁴ Derfor tror vi at denne nye studien som presenterer molekylære egenskaper og integrerte genomvide data for i alt 34 prekliniske modeller for tarmkreft, vil bli en ressurs for forskere som ønsker å ta i bruk mest mulig relevante prekliniske modellsystemer for analyser av biomedisinske problemstillinger.

Referanser

1. Berg KCG, Eide PW, Eilertsen IA, Johannessen B, Bruun J, Danielsen SA, Bjørnslett M, Meza-Zepeda LA, et al. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Molecular Cancer* 2017;16(1):116.
2. Medico E, Russo M, Picco G, Cancelliere C, Valtorta E, Corti G, Buscarino M, Isella C, et al.: The molecular landscape of colorectal cancer cell lines unveils clinically actionable kinase targets. *Nat Commun* 2015;6:7002.
3. Mouradov D, Sloggett C, Jorissen RN, Love CG, Li S, Burgess AW. Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer. *Cancer Res* 2014;74.
4. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, and Hektoen M: Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogene* 2013;2.
5. The Cancer Genome Atlas Research N, Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KRM, Ozenberger BA, Ellrott K, Shmulevich I, et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet* 2013;45(10):1113-1120.
6. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Sonesson C, Marisa L, Roepman P, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015;21(11):1350-1356.
7. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, Zagonel V, Leone F, et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2016;17(6):738-746.
8. Hall AB, Newsome D, Wang Y, Boucher DM, Eustace B, Gu Y, Hare B, Johnson MA, et al. Potentiation of tumor responses to DNA damaging therapy by the selective ATR inhibitor VX-970. *Oncotarget* 2014;5(14):5674-5685.