

Framsteg för nya läkemedel mot livmoderhalscancer

Emmy Borgmästars

Populärvetenskaplig sammanfattning av Självständigt arbete i biologi 2012

Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Livmoderhalscancer dödar globalt ungefär 275 000 kvinnor varje år. I 71 % av alla fall av livmoderhalscancer världen över har man hittat förekomsten av sådana humana papillomvirus (HPV) som kan öka risken för att utveckla livmoderhalscancer. Dessa HPV-typer placeras i kategorin av högrisk HPV-typer. Två vaccin finns idag, men precis som för alla vaccin, så krävs det att man tar vaccinet innan infektion för att detta ska ge immunskydd. Ett nytt sätt att bota livmoderhalscancer vore att angripa de kända proteinerna i viruset som har visats ge en ökad risk för utvecklandet av livmoderhalscancer. Många studier stöder nämligen teorin om att inhibering av dessa geners uttryck leder till att nivåerna av proteinerna i de virusangripna cellerna sänks vilket i sin tur gör att nivåerna av tumörsuppressorererna p53, tumörprotein 53, och Rb, retinoblastoma protein, höjs. Det som återstår att göras är att hitta de mest effektiva vektorerna för att få in inhibitorerna i värdcellen.

Onkogener i högrisk HPV

HPV har ett dubbelsträngat genom på 8 kb. DNA från HPV kan påträffas både som episomer, det vill säga fria DNA-molekyler, och integrerat i värdcellens genom. I fall av livmoderhalscancer har man hittat fall av integrerat HPV DNA eller fall av både episomer och integrerat HPV DNA.

När HPV DNA integreras i värdcellens genom uttrycks onkogenerna *E6* och *E7*, där E står för tidiga gener eftersom de uttrycks tidigt efter en integrering, vars genuttryck regleras av en gemensam promotor, P97. Onkogener är gener som kan öka risken för utveckling av cancer. *E1* har visat sig vara viktig för HPV DNA replikering och i samband med HPV-integrering slås generna *E2*, *E4* och *E5* ut. *L1* och *L2* kodar för de större respektive de mindre kapsidproteinerna, där L står för sena gener, och eftersom det är kapsiden som målcellerna känner igen har *L1* använts vid framställningen av vaccin i form av viruslika partiklar (VLPs).

HPV
→ 8 kb
→ 6 tidiga gener: <i>E1</i> , <i>E2</i> , <i>E4</i> , <i>E5</i> , <i>E6</i> , <i>E7</i>
→ 2 sena gener: <i>L1</i> , <i>L2</i>

E6

E6 räknas som en av de tidiga generna i HPV:s genom. Denna gen kodar för onkoproteinet E6. Man tror att genen uppstod från en duplikation av en region på 99 bp som visar på möjlighet att binda till nukleinsyror. Bindningsställen i *E6* som har visat sig vara viktiga för bindningen till tumörsuppressorn p53 är två regioner med ett zinkfinger motiv i varje region som består av Cys-X-X-Cys-29X-Cys-X-X-Cys, där Cys står för aminosyran cystein och X för varierande aminosyra. Dessa zinkfinger motiv påverkar affiniteten för hur *E6* binder till p53 eftersom de hjälper till att stabilisera onkoproteinet.

E6
→ 15,8 – 19,2 kDa
→ 138 – 159 aminosyror
→ Binder till p53
E7
→ 9,5 – 12,8 kDa
→ 86 – 104 aminosyror
→ Binder till Rb

Tumörsuppressorn p53 spelar en viktig roll i cellen när DNA-skador har uppkommit. Den inducerar cellcykelarrest så att DNA-skador kan repareras eller inducerar apoptos när DNA skadorna inte kan repareras. I många cancerfall har mutationer i genen som kodar för p53 påträffats. Det finns två föreslagna bindningsställen i p53, en i kärndomänen och en annan i C-terminalen. E6 påverkar p53:s funktion genom att binda direkt till p53:s DNA bindningsställe och förhindra att p53 kan reglera transkription. Det virala proteinet kan även binda till p53 via E6-AP och inducera degradering av p53 via en ubiquitin-proteasom gång. När E6 har bundit till E6-AP och p53, märks p53 med ubiquitin-molekyler. p53 skickas sedan till proteasomen för degradering. Man har även visat att degraderingen av p53 kan ske via en ubiquitin-oberoende väg och då tror man att bindningsstället i C-terminalen i p53 spelar en stor roll.

E7

E7 är den andra onkogenen i högrisk HPV och precis som för E6 tror man att den uppstod från en duplikation på 99 bp. E7 har tre viktiga regioner; CR1, CR2 och CR3 (CR står för konserverad region). I CR2 finns regionen LXCXE, där L står för leucin, X för varierande aminosyra och E för glutamat, som är viktig för interaktionen mellan E7 och tumörsuppressorn Rb.

Rb hör till de så kallade pocketproteinerna. E7 binder till Rb genom den så kallade fickan på proteinet. I normala fall reglerar Rb celltillväxten så att det är bundet till en av transkriptionsfaktorerna i gruppen E2F. När Rb är i komplex med E2F kan inte transkriptionen av viktiga gener som krävs för att cellcykeln ska fortsätta ske. Men när E7 associerar med Rb leder det till att Rb och E2F dissocierar. Transkriptionen kan då fortgå vilket leder till att cellcykeln fortsätter som i sin tur ger en ökad celltillväxt. E7 kan även inducera degradering av Rb genom att inducera bindningen av ett proteasom som kallas calpain till Rb. Calpain inducerar klyvning av Rb så att den enbart består av aminosyror 1-180 och skickas då till proteasomen där den degraderas.

Läkemedelsutveckling

Idag finns två vacciner mot livmoderhalscancer; Cervarix och Gardasil. Vaccinerna består av viruslika partiklar som är byggda från L1 från vissa HPV-typer. Båda dessa vacciner har visat sig vara effektiva, men på två villkor. 1) Du måste, precis som med alla vacciner, ta vaccinet innan du blir smittad av HPV. 2) Vaccinet är typspecifikt, det vill säga det skyddar endast mot HPV-typerna som man renat fram kapsidproteinerna ifrån.

<p style="text-align: center;">Cervarix</p> <p>→ L1 från HPV typerna 16, 18 → Godkändes 2006 i Europa</p> <p style="text-align: center;">Gardasil</p> <p>→ L1 från HPV typerna 6, 11, 16, 18 → Godkändes 2007 i Europa</p>
--

Inhibering av onkoproteinerna

Studier visar att tumörsuppressor vägar hålls intakta trots att man blivit smittad av högrisk HPV och cellerna börjat växa okontrollerbart. Därför kan nivåerna av tumörsuppressorerna öka vid inaktivering av onkoproteinerna E6 och E7 i högrisk HPV-typer. Detta har testats genom en metod som kallas RNA interference (RNAi) där man stoppar uttrycket av gener. Inhiberingen av onkoproteinerna har gjorts med siRNA (small interfering RNA), dubbelsträngat RNA på en storlek mellan 20-25 nukleotider, och har visat på goda resultat både *in vitro* och *in vivo*. Man har även föreslagit att inhibering av calpain, ett proteasom

klyver Rb och på så sätt märker proteinet för nedbrytning, skulle kunna vara tillräckligt. Tidigare studier har nämligen visat att Rb självt kan påverka båda onkoproteinerna.

Man har alltså starka bevis på att teorin om att inhibering av de två onkoproteinerna i vissa högrisk HPV-typer märkbart sänker nivån av dessa onkoproteiner och också höjer nivån av de viktiga tumorsuppressorererna p53 och Rb. Inhiberingen ökade även åldrande och apoptos i livmoderhalscancer cellerna. Ett problem kvarstår dock, och det är vilket sätt som skulle vara det bästa för att leverera inhibitorerna till målcellerna. I olika studier föreslår man olika saker. Liposomer är ett exempel, som är artificiellt framtagna lipidvesiklar som används som vektorer för att leverera exempelvis medicin till celler. Andra virala faktorer såsom lentivirala vektorer har man även föreslagit. Lentivirala faktorer är egentligen virus men de innehåller inga virala gener och därför menar man att dessa inte utgör någon större risk för friska celler. En mycket effektiv leverering av inhibitorerna vore om man kunde sammanföra de viruslika partiklar vi har idag med inhibitorer mot onkoproteinerna. Då skulle man kunna bygga upp ett immunförsvar mot framtida högrisk HPV-infektioner, men också inhibera uttrycket av onkoproteinerna om man redan har börjat utveckla livmoderhalscancer på grund av en högrisk HPV-infektion.

Liksom för vaccinerna är användningen av siRNA typs specifikt, det vill säga det fungerar endast mot det som siRNA:t är designat för. Men eftersom bindningsställena i onkoproteinerna för bindningen till p53 respektive Rb är relativt konserverade, kanske man skulle kunna testa att angripa proteinerna istället för generna. Det här skulle i så fall kunna undvika problemet kring att botandet av livmoderhalscancer skulle vara typs specifikt, eftersom studier visar på att dessa konserverade bindningsställen behövs för att effektivt sänka nivån av tumorsuppressorererna i värdcellen.

Mer information

Borgmästarens E, 2012. HPV-onkogenernas betydelse vid utveckling av livmoderhalscancer. Självständigt arbete i biologi. Uppsala universitet.