

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL III – ȘTIINȚE FUNCȚIONALE**

BRÂNZEI OCTAVIA-OANA



TEZĂ DE DOCTORAT

**SECVENȚIEREA GENICĂ DE NOUĂ GENERAȚIE
(NGS) CA METODĂ DE IDENTIFICARE A
NEOEPITOPILOR ÎN TUMORILE SOLIDE**

REZUMAT

Conducător de doctorat

PROF. UNIV. DR. PANAITESCU CARMEN

**Timișoara
2023**

CUVINTE CHEIE: ADN, tumori solide, secvențiere de nouă generație, neoepitopi, oncogene, terapii anti-tumorale.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE

1. **Harich OO**, Olteanu GE, Mihai IM, Benta M, Gavriluc OI, Paunescu V, Bojin MF. Unique Growth Pattern Presentation of a Papillary Renal Cell Carcinoma. *Diagnostics* 2022; 12: 1904. (Factor de impact = 3.6)
<https://doi.org/10.3390/diagnostics12081904>
2. **Harich OO**, Anghel S, Tatu C, Tanasie G, Paunescu V, Panaitescu C. Precision diagnostic methods in solid tumors - next generation sequencing (NGS) *Fiziologia-Physiology*, 2023; 1(104): 47-52.
3. Koteles MM, Vigdorovits A, Kumar D, Mihai IM, Jurescu A, Gheju A, Bucur A, **Harich OO**, Olteanu GE. The Intersection of AI and Pathology: Analyzing the Grading of Ductal Carcinoma of the Breast through Deep Learning and Traditional Assessment. *Diagnostics*, 2023; 13: 2326. (Factor de impact = 3.6)
<https://doi.org/10.3390/diagnostics13142326>
4. **Harich OO**, Gavriluc OI, Ordodi VL, Tirziu A, Paunescu V, Panaitescu C, Bojin MF. In Vitro Study of the Multimodal Effect of Na⁺/K⁺ ATPase Blocker Ouabain on the Tumor Microenvironment and Malignant Cells. *Biomedicines*, 2023; 11: 2205. (Factor de impact = 4.7)
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11082205>

INTRODUCERE

Cancerul reprezintă o problemă majoră de sănătate la nivel mondial, numărul pacienților nou diagnosticați fiind de 19 milioane în 2020, iar cele mai frecvente sunt cancerul mamar, pulmonar, colorectal, de prostată, gastric, hepatic și de col uterin. Rata mortalității în anul 2020 a fost de peste 10 milioane, principalele cauze de deces fiind tumorile pulmonare, colorectale, hepatice, gastrice, mamare, esofagiene și pancreatice.

Situația este similară în Europa, iar în România au fost peste 100.000 de cazuri noi înregistrate în 2020; tumorile mamare, colorectale, pulmonare, de prostată și de vezică urinară reprezintă 50% din cazuri.

În contextul creșterii continue a patologiei tumorale, se caută noi metode de screening, diagnostic și tratament, care să ducă la îmbunătățirea metodelor de identificare precoce și tratament specific fiecărui tip de tumoră.

Secvențierea de nouă generație (NGS) a avut un impact semnificativ în domeniul tumorilor solide, aducând multiple beneficii în înțelegerea și gestionarea acestor afecțiuni, astfel: identificarea mutațiilor driver, profil genomic comprehensiv, monitorizarea evoluției tumorale, identificarea opțiunilor terapeutice, prognosticul și

managementul riscului. Secvențierea de nouă generație (NGS) joacă un rol esențial în înțelegerea și abordarea tumorilor solide.

Secvențierea genică de nouă generație (NGS) reprezintă o metodă utilizată pe scară largă în prezent, atât în screening-ul tumoral (secvențierea genică din probe biologice lichide – biopsie lichidă), cât și în diagnosticul de precizie al tumorilor diagnosticate prin mijloacele convenționale. Această metodă permite și indicarea unei terapii țintite, atât din arsenalul chimioterapiei clasice, cât și din noile imunoterapii specifice. Programele de analiză și interpretare a datelor de secvențiere, care, prin accesul la baze mari de date publice și private, permit identificarea și accesul pacienților cu cancer la studii clinice care se adresează mutațiilor identificate prin metodele menționate.

În acest context, studiul de față se încadrează în tendințele actuale de cercetare în domeniul cancerului, propunând un panel de investigații genice prin NGS, urmat de identificare unor noi ținte terapeutice în tumorile solide.

OBIECTIVE DE CERCETARE

Lucrarea de față a avut 3 obiective majore de cercetare:

1. Realizarea secvențializării genice pentru pacienții cu tumori solide de diferite tipuri morfopatologice, prin tehnici de nouă generație (NGS) și identificarea mutațiilor genice asociate fiecărui tip de tumoră;
2. Determinarea mutațiilor genice somatice, comune tuturor tipurilor de tumori solide investigate în funcție de frecvența alelică și localizare, precum și identificarea modificărilor induse în expresia proteinelor asociate fiecărei gene;
3. Identificarea neoepitopilor prezentați de celulele tumorale în contextul moleculelor din sistemul major de histocompatibilitate (MHC) clasa I, ca potențiale ținte terapeutice anti-tumorale sau pentru identificarea de către celulele sistemului imun (limfocitele T citotoxice) și declanșarea răspunsului anti-tumoral intrinsec.

PARTEA GENERALĂ

Cancerul este o problemă majoră de sănătate la nivel mondial, iar numărul de pacienți crește rapid. Cele mai recente date statistice arată că peste 19 milioane de cazuri noi au fost diagnosticate în 2020, cele mai mari cifre fiind înregistrate pentru cancerul mamar, pulmonar, colorectal, de prostată, gastric, hepatic și de col uterin. În 2020, aproape 10 milioane de oameni au decedat de cancer, principalele cauze de deces fiind tumorile pulmonare, colorectale, hepatice, gastrice, mamare, esofagiene și pancreatice.

Situația este similară în Europa (4.497.329 cazuri noi), precum și în România, cu aproximativ 100.000 de cazuri noi înregistrate în 2020; tumorile mamare, colorectale, pulmonare, de prostată și de vezică urinară reprezintă 50% din cazuri.

Mutațiile genetice sunt o modificare a secvenței de nucleotide de pe ADN care nu este un rezultat direct al recombinării genetice. Mutațiile pot fi diferențiate în mutații induse sau mutații spontane. Mutațiile induse sunt rezultatul unui mutagen care acționează asupra ADN-ului, în timp ce o mutație genetică spontană este consecința unei greșeli care poate apărea în mod natural în diferite procese endogene. Un exemplu al acestor procese endogene este replicarea ADN-ului însuși. O mutație poate fi fie o inserție/deleție, fie o mutație punctiformă, ultima fiind cunoscută și ca mutație de pereche de baze sau substituție de pereche de baze.

Oncogenele sunt responsabile pentru codificarea diferitelor proteine care au un rol major în controlul și reglarea apoptozei și a proliferării celulare. O mutație în interiorul genei poate duce la activarea unei oncogene, fie prin poziționarea acesteia lângă un element de amplificare, fie prin amplificare. Nu numai o mutație are potențialul de a iniția un astfel de proces, dar și translocarea genetică poate duce la acest proces. Cel mai cunoscut exemplu de oncogenă produsă prin translocare cromozomială este formarea cromozomului Philadelphia, $t(9;22)(q34;q11)$, conducând adesea la dezvoltarea tumorilor hematopoietice.

Secvențierea de generație următoare (NGS), numită și secvențierea masivă paralelă, este caracterizată printr-un randament foarte mare în comparație cu secvențierea Sanger. Această tehnică secvențiază simultan mai multe fragmente de ADN dintr-o bibliotecă pregătită anterior, arhivând astfel o rată de secvențiere mult mai mare ca secvențiere de primă generație, care permite doar secvențierea unei molecule la un moment dat. NGS presupune de obicei trei etape: primul, fragmentarea și pregătirea bibliotecii, al doilea, amplificarea clonală și al treilea, procesul de secvențiere propriu-zis urmat de o reasamblare pentru a obține întreaga secvență genomică.

Metoda de secvențiere a ADN-ului folosind un secvențior semiconductor de ioni se bazează pe detectarea ionilor de hidrogen care sunt eliberați în timpul polimerizării ADN-ului. Adăugarea unui dNTP la un polimer ADN are ca rezultat eliberarea unui pirofosfat și a unui ion de hidrogen, modificând prin urmare pH-ul, care apoi poate fi măsurat printr-un strat sensibil la ioni de pe cipul semiconductor. În timpul procesului de secvențiere, cipul este inundat alternativ cu una dintre cele patru nucleotide ADN; de fiecare dată când o nucleotidă este încorporată, este eliberat un ion de hidrogen. Schimbarea pH-ului este apoi măsurată și convertită în tensiune. Modificarea tensiunii indică faptul că o nucleotidă este încorporată și, prin urmare, a fost determinată o bază. Acest lucru se repetă la fiecare 15 secunde cu o spălare diferită de nucleotidă peste cip. Tehnologia Ion Torrent nu folosește dNTP-uri marcate fluorescent, ci mai degrabă baze nemodificate, deoarece este sensibilă la modificarea concentrației ionilor de hidrogen. Eliberarea ionilor de hidrogen este direct proporțională cu numărul de dNTP-uri încorporate, prin urmare, într-o repetiție de bază (de exemplu, TTT) se adaugă simultan mai mult de o nucleotidă, ceea ce duce la o schimbare mai mare a pH-ului. Cipurile semiconductoare specializate permit detectarea simultană a milioane de astfel de modificări, determinând rapid cantități mari de secvențe. Într-un interval de timp/rulare de 2,5 ore, Ion Torrent este capabil să realizeze până la 10 Gb de date de secvențiere.

Testele NGS concepute pentru a explora statusul mutațiilor în genele asociate cancerului dincolo de mutațiile hotspot specifice nu au fost caracterizate. Cunoașterea acestor date este deosebit de importantă în alegerea tratamentului pentru pacienții cu tipuri rare de cancer, inclusiv a pacienților pediatrici. Datele genomice sunt valoroase atunci când genele identificate sunt legate de date clinice, de tipul, numărul, răspunsurile și durata tratamentelor anterior urmate și alte caracteristici clinico-patologice. Ca atare, trebuie obținut consimțământul informat de la toți pacienții înainte ca datele lor anonimizate să fie utilizate de către cercetători și clinicieni.

Sfera de utilitate clinică a testelor de cancer bazate pe NGS începe să se extindă substanțial. Informațiile furnizate de NGS au devenit valoroase în deciziile terapeutice, deoarece în prezent înțelegem mai bine atât apariția concomitentă, cât și excluderea reciprocă a mutațiilor în genele asociate cancerului. De exemplu, prezența și numărul mutațiilor sunt asociate cu un răspuns la inhibiția imună de tip checkpoint, iar un număr crescut de mutații poate avea implicații terapeutice.

S-a stabilit că vaccinurile împotriva cancerului care declanșează activarea celulelor T împotriva antigenelor tumorale pot fi benefice pentru pacienții cu cancer, deși sunt încă necesare multe îmbunătățiri ale strategiilor de vaccinare pentru a obține supraviețuirea pe termen lung a pacienților. Au fost testați diverși imunogeni, variind de la epitopul CTL minim la proteina recombinată de lungime completă. Epitopul CTL minim, de obicei 9-10 aminoacizi lungime, a indus un număr limitat de celule T efectoare, asociindu-se cu o eficiență clinică redusă, datorată probabil anergiei CTL. Această anergie a rezultat probabil din încărcarea exogenă a epitopului scurt și prezentarea directă la celulele T CD8, ocolind astfel procesarea intracelulară a antigenului de către DC și co-semnalizarea de către DC mature. Pe de altă parte, vaccinarea cu proteine recombinante de lungime completă nu este cea mai bună alternativă. Studiile *in vivo* la șoareci au arătat că toate căile intracelulare de prezentare încrucișată au fost mai eficiente atunci când s-au folosit peptide lungi sintetice (synthetic long peptides - SLPs) decât cu antigenul de lungime completă. Prin urmare, în prezent, SLPs, definite de obicei ca peptide lungi de 25-35 de aminoacizi (AA) care cuprind un epitop CD8 bine definit, extins pentru a include epitopi CD4 presupuși, sunt considerate cele mai eficiente imunogene. Acestea sunt de obicei administrate ca un amestec de 10-12 astfel de constructe, pentru a acoperi o gamă largă de haplotipuri HLA și/sau o gamă largă de epitopi. Peptidele lungi sintetice au demonstrat eficiență clinică împotriva neoplaziei cervicale și vulvare induse de HPV și recent au fost utilizate la pacienții cu melanom pentru a-i vaccina împotriva neoantigenelor tumorale. În majoritatea cazurilor raportate, alegerea SLP s-a bazat în primul rând pe un epitop CD8 definit și a presupus prezența unui epitop CD4 auxiliar în vecinătate. O strategie alternativă pentru designul vaccinurilor SLP se bazează pe o selecție atentă a epitopilor CD8 și CD4 bine definiți, pentru care există un repertoriu larg și/sau provoacă răspunsuri imune puternice. Selectarea ambilor epitopi, CD4 și CD8, oferă o gamă largă de oportunități: separarea epitopilor care se suprapun în mod natural, legarea epitopilor, care sunt departe unul de celălalt pe antigenul natural, sau crearea de epitopi himerici care conțin un epitop CD4 de la un antigen cuplat la un epitop CD8 de la un alt antigen tumoral. Astfel, au fost

descriși epitopi auxiliari universali CD4, capabili să se lege la o gamă largă de haplotipuri HLA și, astfel, să provoace răspunsuri la o populație mare de pacienți.

În acest context, s-au dezvoltat două modele de studii clinice de bază pentru testarea terapiilor împotriva cancerului direcționate genomic:

1. *Basket trials* (studii de tip coș) plasează toți pacienții cu tumori care exprimă aceeași țintă genomică în aceeași categorie (*basket*) permițând pacienților să primească o terapie potrivită, țintită.
2. *Umbrella trials* (studii de tip umbrelă) implică investigarea mai multor terapii țintite și înrolarea unor grupuri specifice de pacienți în diferite studii în funcție de genotipul lor tumoral. În ambele tipuri de studii, un test de secvențiere de ultimă generație care permite detectarea mai multor modificări poate oferi informații care să permită includerea pacienților într-una dintre cohortele de studii disponibile (Figura 1).

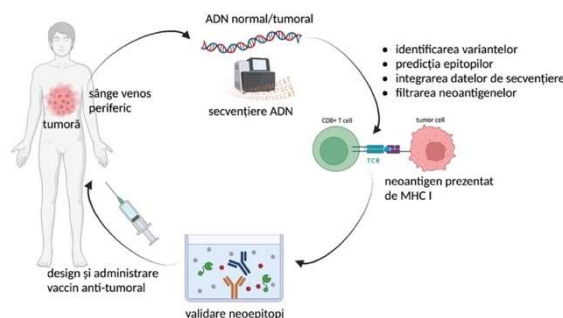


Fig. 1. Rezumat grafic al etapelor de cercetare

PARTEA SPECIALĂ

1. MATERIALE ȘI METODE

1.1. Subiecții incluși în studiu

Subiecții incluși în studiu au fost pacienți oncologici, cu diagnostic stabilit, care s-au prezentat benevol la Spitalul Clinic Județean de Urgență „Pius Brînzeu” Timișoara, Centrul de Terapii genice și Celulare în Tratamentul Cancerului - OncoGen cu probele biologice prelevate anterior în serviciile de specialitate în cursul diagnosticării și tratamentului oncologic; probele biologice incluse în studiu au fost blocuri de parafină cu țesut tumoral/normal, care au fost utilizate anterior pentru diagnosticul, stadializarea și stabilirea strategiei terapeutice anti-tumorale convenționale. În cadrul studiului doctoral rezultatele obținute prin investigațiile suplimentare (secvențierea genică de nouă generație - NGS) au fost utilizate exclusiv în scop de cercetare.

Criterii de includere a subiecților în studiu: pacienți cu patologie neoplazică diagnosticată - tumori solide, care au oferit materialul biologic benevol (țesut tumoral inclus la parafină), exclusiv în scop de cercetare; subiecți caucazieni, de sex masculin și

feminin, proveniți atât din mediul urban, cât și cel rural, cu vârsta cuprinsă între 18 și 80 de ani; cu capacitate de a înțelege informațiile prezentate subiecților și disponibilitatea de a semna consimțământul informat.

Criterii de excludere: subiecți/populații vulnerabile.

Studiul desfășurat la Spitalul Clinic Județean de Urgență „Pius Bînzeu” Timișoara, este un studiu prospectiv de cohortă, de tip *basket*, care a presupus analiza probelor biologice incluse la parafină, obținute de la pacienți care au fost anterior diagnosticați cu patologie oncologică - tumori solide, în vederea identificării mutațiilor genice prezente la nivelul țesutului tumoral. Rezultatele analizelor de secvențiere genică au fost utilizate exclusiv în scop de cercetare, pentru identificarea și stabilirea frecvenței mutațiilor genice de tip SNV dintr-un panel de gene implicate în dezvoltarea tumorală.

Studiul prospectiv de cohortă de tip *basket* a fost desfășurat timp de 3 ani, în perioada 2020-2023, pe un lot de 100 pacienți cu cancer (tumori solide), fiind divizat în funcție de localizarea tumorii primare în: cancer mamar (n=33), tumori genitourinare (n=16), cancer pulmonar (n=15), tumori tract digestiv (n=15), alte tipuri de tumori solide (n=21). În categoria tumorilor genitourinare au fost incluse tumori ovariene, adenocarcinoame de prostată, tumori renale și de vezică urinară. În categoria tumorilor tractului digestiv au fost incluse tumorile hepatice, cancerul de colon și cancerele gastrice. În categoria altor tipuri de tumori solide au fost incluse tumorile cu incidență scăzută și cu origine comună ectodermală a țesutului tumoral, de tipul melanoame și tumori cerebrale – glioblastoame.

1.2. Metode de secvențiere genică de nouă generație (NGS)

Probe: țesut tumoral inclus la parafină

Procedurile utilizare în acest studiu au fost efectuate pe blocuri de parafină conținând țesut tumoral, care au fost prelucrate în vederea purificării acizilor nucleici (ADN) și secvențierii genice de nouă generație (NGS). Rezultatele obținute au fost folosite exclusiv în scop de cercetare, pacienții nu au avut beneficii și nu au fost expuși la riscuri.

Unul dintre soft-urile de analiză și interpretare folosite pentru datele obținute la NGS a fost IonReporter Software. Acest program ne oferă informații referitoare la localizarea cromozomială a genei secvențializate, tipul de mutație (au fost selectate mutațiile de tip SNV – *missens*, *frameshift/non-frameshift* deleții și inserții, nonsens), gena la nivelul căreia s-a produs mutația, mutația la nivelul nucleotidelor, modificarea prin substituție a aminoacizilor (în cazul mutațiilor *missense*), precum și indicația terapeutică ținută pentru mutația identificată.

Programul de analiză Oncomine Reporter este un software complex, care identifică, pe baza mutațiilor genice, biomarkeri semnificativi din punct de vedere clinic, pentru care există terapii ținute în tipul de cancer specificat sau în alte tipuri de cancer, aprobate de autoritățile specializate în domeniul oncologiei: FDA, ESMO, EMA, NCCN.

1.3. Metode de identificare a neoepitopilor tumoali

- Selecția alelelor specifice imunofenotipului populației din România și populației globale;
- Identificarea proteinelor cu mutații prin NGS. Bazat pe rezultatele variației unei singure nucleotide (SNV) ale secvențierii genice, aminoacizii rezultați au fost înlocuiți în secvențele proteice descrise în baza de date NCBI. Comparând proteina mutantă cu proteina normală am identificat regiunile imunogenice folosind algoritmul Deimmunization de la IEDB. Regiunile imunogenice (mutant comparativ cu control) au fost testate folosind algoritmul IEDB pentru afinitatea de legare de moleculele MHC clasa I, transportul spre reticulul endoplasmic cu ajutorul proteinelor transportoare (TAP 1 și 2) și clivarea proteazomală a acestora.
- Predicția epitopilor restricționați la MHC clasa I. Predicția epitopilor HLA clasa I a fost realizată utilizând NetMHCpan, un software de predicție bazat pe ANNs, care permite utilizatorului să introducă alele în format FASTA pentru realizarea predicției. Printre parametrii generați de program este și afinitatea de legare, care a fost folosit pentru caracterizarea perechilor epitop-alela HLA. Pragul folosit a fost de 500 nM. Al doilea software utilizat este IEDB tools. Acesta nu permite introducerea unor secvențe alelice HLA custom în format FASTA, dar oferă în documentație o listă cu alelele HLA clasa I de referință pentru care se pot face predicții astfel încât să acopere un procent mare din populația globului (aproximativ 98,55%).
- Predicția epitopilor liniari specifici pentru moleculele MHC clasa I a fost efectuată utilizând un algoritm bazat pe artificial neural network, online server NetCTL 1.2, care efectuează predicții pentru legarea de molecule MHC clasa I, urmată de trimiterea rezultatelor generate la serverele VaxiJen v2.0, ToxinPred, pentru a identifica peptidele antigenice non-toxice. După efectuarea screening-ului epitopilor cu ajutorul serverelor VaxiJen v2.0 și ToxinPred, epitopii rezultanți au fost testați pentru imunogenicitate cu IEDB server.

2. REZULTATE

2.1. Identificarea mutațiilor genice la loturile de pacienți selectate

Studiul prezent a propus identificarea și dezvoltarea de metode moderne de diagnostic și orientare terapeutică în boala canceroasă (tumori solide) – secvențierea de nouă generație (NGS).

Cercetarea noastră s-a axat pe utilizarea de metode și tehnici moderne pentru îndeplinirea obiectivelor enumerate. Studiul a fost efectuat pe un lot de 100 de pacienți cu tumori solide, cu vârsta cuprinsă între 20-79 de ani, de ambele sexe, care s-au prezentat benevol la Spitalul Clinic Județean de Urgență „Pius Brînzeu” Timișoara – Centrul OncoGen. Investigațiile au fost efectuate în scop exclusiv de cercetare pe probele pacienților (blocuri de parafină cu țesut tumoral) diagnosticați cu cancer prin metodele convenționale.

Pentru realizarea secvențierii genice de nouă generație (NGS) am urmat mai multe etape:

Pregătirea probelor a constat în extragerea și purificarea materialului genetic (ADN) necesar secvențierii. A fost realizată ulterior biblioteca genomică a probelor, pentru care

materialul genetic a fost fragmentat și s-a creat o bibliotecă genomică, prin adăugarea unor adaptorii specializați la fragmentele de ADN pentru a le pregăti pentru secvențiere. Secvențierea NGS a fost realizată utilizând biblioteca genomică și a permis secvențierea simultană a mii sau chiar milioane de fragmente de ADN, oferind o acoperire genomică extinsă. Analiza datelor de secvențiere a fost efectuată cu ajutorul unor algoritmi specializați și a unor softuri bioinformatic (IonReporter și Oncomine Reporter). Aceasta include identificarea mutațiilor genice, a variațiilor de număr de copii (CNV), a variațiilor unei singure nucleotide (SNV), a rearanjamentelor genice și a altor modificări genice asociate tumorii.

Au fost identificate următoarele categorii de parametri:

- Mutațiile somatice frecvente, care sunt prezente într-un procent semnificativ al pacienților cu un anumit tip de tumoră solidă. Aceste mutații au fost cuantificate pentru fiecare tip de tumoră inclusă în studiu, în cele 5 loturi de pacienți (cancer pulmonar, mamar, digestiv, genito-urinar și alte tipuri de tumori solide), fiind de tip mutații punctiforme, deleții, inserții sau rearanjamente genice (frameshift și non-frameshift), care afectează anumite gene cunoscute pentru a juca un rol important în tumorigeneză.
- Frecvența alelică, ce indică proporția de celule tumorale care poartă mutația în raport cu celulele normale în eșantionul tumoral; frecvența alelică ne-a oferit informații despre nivelul de prevalență al mutației, fiind utilizată pentru a evalua heterogenitatea genetică a tumorii și subclonalitatea.
- Localizarea mutațiilor, care ne-a oferit informații utile pentru identificarea regiunilor genice afectate și regiunile exonice implicate.
- Modificări ale expresiei proteinelor asociate cu fiecare genă.

Prin combinarea acestor informații, analiza rezultatelor obținute prin NGS ne-a oferit o imagine mai completă și detaliată a modificărilor genice și moleculare asociate cu fiecare tip de tumoră solidă, identificând mutații comune în toate loturile studiate: TP53 p.(P72R), PIK3CA p.(I391M), KDR p.(Q472H), APC p.(A1582T/P) și NOTCH1 p.(V1578del) (Figura 2). Aceste date pot fi utilizate pentru a ghida selecția terapiei personalizate, pentru a identifica noi ținte terapeutice și pentru a dezvolta strategii de tratament mai eficiente.

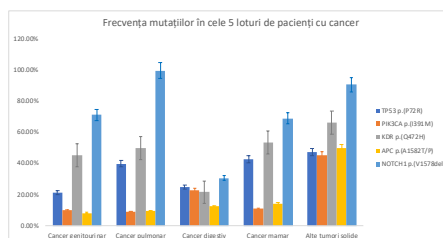


Fig. 2. Mutațiile comune identificate pentru cel 5 loturi de pacienți cu tumori solide

2.2. Predicția neoepitopilor comuni tumorilor solide în vederea identificării unor strategii imunoterapeutice în tumorile solide

Ulterior etapei de analiză NGS și identificare a mutațiilor și modificărilor moleculare în probele tumorale ale pacienților din cele 5 loturi, a fost efectuată predicția neoepitopilor prezentați de celulele tumorale în contextul moleculelor MHC clasa I (Figura 3). Au fost selectate moleculele MHC clasa I cel mai frecvent reprezentate în populația din întreaga lume și din România și au fost selectați epitopi de 8-11 AA din secvențele peptidice mutate ale genelor TP53 p.(P72R), PIK3CA p.(I391M), KDR p.(Q472H), APC p.(A1582T/P) și NOTCH1 p.(V1578del). Acești epitopi vor fi recunoscuți de sistemul imun ca fiind non-self, în contextul prezentării cu molecule MHC clasa I, rezultând distrugerea celulelor tumorale care prezintă astfel de modificări. Au fost identificați următorii epitopi, care pot deveni ținte terapeutice în contextul tumorilor solide: pentru proteina KDR - HLA-B*35:01-QAVSVTNPY; TP53 - HLA-A*02:01-RMPEAAPPV; PIK3CA - HLA-B*18:01-NEWLNYDIY.

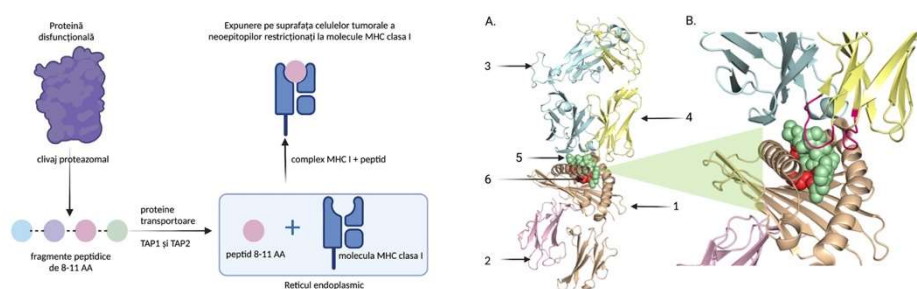


Fig. 3. Prezentarea neoepitopilor în contextul moleculelor MHC clasa I

CONCLUZII

Această lucrare a avut 3 obiective majore de cercetare, activitățile și rezultatele obținute fiind efectuate pentru îndeplinirea acestora.

1. Au fost analizate prin secvențiere genică de nouă generație (NGS) 100 de probe de țesut tumoral inclus la parafină provenite de la pacienți cu tumori solide de diferite tipuri morfopatologice, împărțite în 5 loturi: cancer pulmonar, cancer genitourinar, cancer mamar, cancer digestiv și alte tipuri de tumori solide;
2. Au fost identificate mutațiile genice somatice prin analiza datelor de secvențiere, care a fost efectuată cu ajutorul unor algoritmi specializați și a unor softuri bioinformatic (IonReporter și Oncomine Reporter), aceste modificări fiind de tip variații ale numărului de copii (CNV), variații ale unei singure nucleotide (SNV), mutații punctiforme, deleții, inserții, rearanjamente genice și alte modificări genice asociate tumorilor solide.

Studiul efectuat pe un lot de 100 de pacienți cu tumori solide, cu vârsta cuprinsă între 20-79 de ani, de ambele sexe, care s-au prezentat benevol la Spitalul Clinic Județean de

Urgență „Pius Brînzeu” Timișoara – Centrul OncoGen s-a desfășurat în scop exclusiv de cercetare pe probele tisulare incluse la parafină ale pacienților diagnosticați cu cancer prin metodele convenționale. Materialul genetic analizat a fost reprezentat de ADN, care a fost izolat, purificat, cuantificat și utilizat în pregătirea bibliotecilor de probe, urmată de secvențierea genică de nouă generație (NGS) folosind un panel de tip Hotspot, care a identificat mutații în 207 regiuni genice cheie pentru dezvoltarea tumorală.

3. Prin combinarea parametrilor generați de analiza datelor de secvențiere genică am identificat mutații somatice missens comune în toate loturile studiate: TP53 p.(P72R), PIK3CA p.(I391M), KDR p.(Q472H), APC p.(A1582T/P) și NOTCH1 p.(V1578del). Aceste mutații de tip SNV ar putea deveni utile în terapiile personalizate anti-tumorale.

Parametrii utilizați pentru identificarea mutațiilor somatice comune, frecvent întâlnite în toate loturile de pacienți cu cancer studiate au fost: mutațiile somatice frecvente, care sunt prezente într-un procent semnificativ al pacienților cu un anumit tip de tumoră solidă; frecvența alelică, care indică proporția de celule tumorale care poartă mutația în raport cu celulele normale în eșantionul tumoral; localizarea mutațiilor, care ne-a oferit informații utile pentru identificarea regiunilor genice afectate și regiunile exonice implicate; modificări structurale și funcționale ale proteinelor rezultate ca urmare a procesului de transcripție/translație de la nivelul genelor cu mutații. Aceste date pot fi utilizate pentru a ghida selecția terapiei personalizate, pentru a identifica noi ținte terapeutice și pentru a dezvolta strategii de tratament mai eficiente.

4. Pe baza metodelor de predicție pentru legarea și activarea limfocitelor T citotoxice CD8⁺ în cadrul răspunsului imun anti-tumoral, au fost identificați următorii neoepitopi liniari restricționați la MHC clasa I: pentru proteina KDR - HLA-B*35:01-QAVSVTNPY; pentru proteina TP53 - HLA-A*02:01-RMPEAAPPV; pentru proteina PIK3CA - HLA-B*18:01-NEWLNYDIY. Acești neoepitopi ar putea fi utilizați în imunoterapiile anti-tumorale în cazul tumorilor solide.

Prin această lucrare aducem o contribuție importantă la stabilirea unui diagnostic molecular de precizie în tumorile solide și la identificarea unor noi ținte moleculare pentru imunoterapii personalizate.

CONTRIBUȚII PERSONALE

În această lucrare mi-am adus contribuția în toate etapele experimentale care au fost efectuate pentru îndeplinirea obiectivelor. Astfel, am participat la:

- Elaborarea formularului de Consimțământ informat pentru pacienții cu cancer înrolați în studiu; Stabilirea condițiilor de eligibilitate a pacienților cu cancer/probelor incluse în studiu;
- Preluarea probelor de țesut tumoral inclus la parafină, izolarea, purificarea, cuantificarea ADN-ului și stocarea acestuia la temperaturi de -20° C în vederea utilizării ulterioare în proceduri de secvențiere genică;

- Pregătirea bibliotecilor de probe în sistemul automat IonChef – IonTorrent; Încărcarea automată a bibliotecilor pe chip-uri și secvențierea genică de nouă generație (NGS) cu ajutorul IonTorrent Gene Studio S5;
- Analiza datelor de secvențiere genică și generarea rapoartelor de analiză în programele IonReporter și Oncomine Reporter;
- Analiza mutațiilor genice identificate pentru fiecare pacient și în cadrul fiecărui lot de pacienți cu tumori solide: cancer pulmonar, cancer genitourinar, mamă, digestiv și alte tipuri de tumori solide; generarea datelor statistice cu ajutorul instrumentelor Microsoft Office – Excel;
- Identificarea genelor/mutațiilor frecvente și comune tuturor loturilor de pacienți cu cancer – KDR, PIK3CA, TP53, APC, NOTCH1;
- Utilizarea programelor NetMHC, NetCTL și IEDB pentru predicția neoepitopilor restricționați la molecule MHC clasa I și prezentarea acestora de către celulele tumorale în vederea inducerii unui răspuns imun anti-tumoral;
- Identificarea neoepitopilor candidați targetabili prin legarea specifică și activarea limfocitelor T citotoxice: QAVSVTPY (KDR), RMPEAAPV (TP53) și NEWLNYDIY (PIK3CA).

DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE

Secvențierea de nouă generație (NGS) reprezintă nu doar o modalitate precisă de diagnostic molecular în cancer, dar poate fi utilă pentru identificarea unor noi ținte moleculare pentru terapia/imunoterapia anti-tumorală.

În această lucrare am prezentat modalitatea de identificare a neoepitopilor prezentați în contextul MHC clasa I pe suprafața celulelor tumorale, care devin ținte pentru limfocitele T citotoxice (CD8+) în cadrul răspunsului imun anti-tumoral.

Acest concept poate fi extins la identificarea neoepitopilor prezentați în contextul MHC clasa II, care va duce la activarea limfocitelor T helper (CD4+), cu efect anti-tumoral direct prin secreția de citokine specifice (de exemplu, IFN-gama) sau indirect, prin activarea suplimentară a răspunsului imun înăscut (prin celule de tip fagocitar – macrofage sau celule citotoxice – NK) și co-activarea limfocitelor T citotoxice. De asemenea, în cadrul imunoterapiilor generate prin aceste metode, epitopii restricționați la MHC clasa I (8-11 aminoacizi) pot fi cuplați cu epitopi restricționați la molecule MHC clasa II (13-15 aminoacizi), specifici pentru fiecare proteină mutantă în parte sau în combinație, de la mai multe astfel de proteine, rezultatul fiind un compus de tip peptid lung sintetic (SLP) de 30-35 aminoacizi, care poate fi administrat ca imunoterapie specifică și personalizată fiecărui pacient cu cancer.

O altă direcție de cercetare viitoare este reprezentată de identificarea mutațiilor prin NGS la nivelul genelor care se translatează în proteine transmembranare mutante, care vor genera neoepitopi conformaționali targetabili de către o altă componentă a sistemului imun înăscut, și anume de limfocitele B și anticorpilor (imunoglobulinele) specifici anti-tumoral sintetizați de acestea.

Nu în ultimul rând, în măsura în care neoepitopii conformaționali identificați sunt unici și specifici celulelor tumorale, aceștia pot deveni ținta pentru imunoterapiile celulare de tip limfocite T cu receptori himerici de antigen (CAR-T).

De asemenea, deoarece căile de semnalizare intracelulară în cadrul proceselor tumorale sunt redundante și sinergice, terapiile anti-tumorale ar trebui să fie asociative, cuprinzând terapii convenționale, terapii de dezinhibare a sistemului imun (inhibitori de tip check-point) și terapii țintite, personalizate, identificate prin NGS.