



MEMORIA

25.º RETORNO SOCIAL DE LA INVESTIGACIÓN CÁNCER

CARACTERIZACIÓN EPIGENÉTICA DE LOS COLANGIOCARCINOMAS

Dra. Teresa Macarulla Mercadé

VHIO Vall d'Hebron Institut d'Investigació Oncològica

Dra. Marta Melé Messeguer

BSC Barcelona Supercomputing Center

1. Resumen del proyecto

OBJETIVOS

En este proyecto, propusimos utilizar nuestra colección única de modelos derivados de pacientes con colangiocarcinoma (CCA) para caracterizarlos molecular y epigenéticamente. Planeamos realizar un análisis integrativo para caracterizar los CCA molecular y epigenéticamente y comprender la relación entre la arquitectura genética y epigenética de las CCA. Además, planeamos probar diferentes inhibidores en modelos IDH1/2 CCA y estudiar la biología detrás de esta actividad. Esto puede conducir a la identificación de posibles biomarcadores terapéuticos y/o nuevas estrategias terapéuticas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecimiento y caracterización de xenoinjertos derivados de pacientes (PDX) a partir de CCA IDH1 de tipo salvaje y mutante.

1. Creación de un epigenoma de referencia de modelos mutantes y de tipo salvaje IDH1 de CCA_PDX y perfil del transcriptoma.
2. Evaluar la eficacia de diferentes tratamientos en modelos IDH1 de tipo salvaje y mutantes de CCA_PDX.
3. Identificar potenciales biomarcadores para predecir la respuesta a este tratamiento y mejorar la estratificación de los pacientes.

MÉTODOS

OBJETIVO 1: Establecimiento y caracterización de xenografías derivadas de pacientes (POX) de CCA IDH1 de tipo salvaje y mutante.

OBJETIVO 2: Generación de epigenomas de referencia a partir de CCA_PDX y perfiles de transcriptoma.

- Utilizar muestras de 6 CCA_PDX IDH1wt 6 CCA_PDX IDH1mut para realizar ChIPseq.
- Caracterizar el panorama mutacional de los CCA PDX y compararlos con biopsias de tumores.
- Generar epigenomas de referencia a partir de CCA PDX que consistan en accesibilidad al ADN mediante ATACseq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin).
- Análisis integrativo para vincular cambios en la expresión génica con cambios

epigenéticos en las regiones cercanas de la cromatina.

OBJETIVO 3: Evaluar la eficacia de diferentes tratamientos en modelos IDH1 de tipo salvaje y mutantes de CCA_PDX.

- Los modelos IDH1 de tipo salvaje y CCA_PDX mutante se tratarán ex vivo con quimioterapia basada en platino.
- Obtener perfiles de expresión génica mediante RNAseq en todos los modelos generados, con especial atención a los sensibles al platino (PtS) en combinación con inhibidores de PARP (PtS_PARPiR -Resistente- y PtS_PARPiS -Sensible-).

OBJETIVO 4: Identificar posibles biomarcadores para predecir la respuesta a este tratamiento y mejorar la estratificación de los pacientes.

- La metilación de RNAseq y ADN en la configuración PDX_IDH1mut en comparación con la configuración PDX_IDH1wt ofrecerá candidatos a biomarcadores que qRT-PCR e IHQ validarán en muestras de tumores.
- Identificaremos biomarcadores que nos permitan estratificar a los pacientes en función de su expresión diferencial, metilación y/o accesibilidad. Realizaremos varias validaciones, como qRT-PCR e inmunohistoquímica, en muestras tumorales de pacientes.

2. Resultados obtenidos

Parte de los resultados obtenidos aún se encuentran en publicación (CONFIDENCIAL).

Perfil transcriptómico de CCA_PDX

El análisis de datos de RNA-seq de muestras CCA_PDX mediante análisis de componentes principales (PCA) y agrupamiento jerárquico no supervisado reveló dos grupos distintos según el estado de mutación IDH1. El grupo 1 (*IDH1^{mut}* e *IDH1^{wt}* PDX133) mostró enriquecimiento en procesos metabólicos, como el metabolismo de los ácidos grasos o la biosíntesis de ácidos biliares. Por el contrario, el Grupo 2 (*IDH1^{wt}*) está enriquecido en vías de desarrollo, como WNT- β -catenina y Notch, vías relacionadas con el sistema inmunológico y factores de transición epitelial a mesenquimal (EMT).

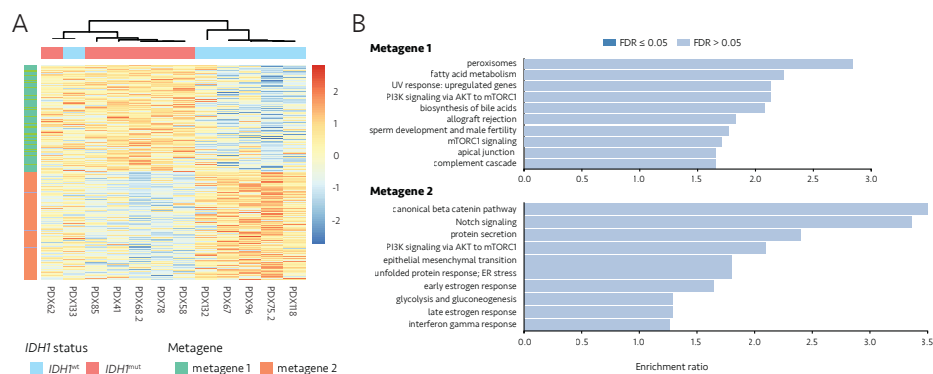


Figura 1. La agrupación no supervisada de datos de RNA-seq separó muestras de CCA_PDX

según el estado de mutación *IDH1*. (A) Agrupación no supervisada de CCA_PDX basada en datos de RNA-seq. (B) Enriquecimiento del conjunto de genes de los dos metagenes. FDR, tasa de descubrimiento falso.

El análisis de expresión diferencial (DE) reveló una regulación negativa significativa de la expresión génica y una superposición con metagenes.

El análisis DE que comparó *IDH1^{mut}* e *IDH1^{wt}* CCA_PDX reveló 575 genes desregulados en tumores *IDH1^{mut}*, de los cuales 447 estaban regulados negativamente. El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) utilizando la base de datos Hallmark mostró una regulación negativa de las vías relacionadas con la hipoxia, la respuesta a los estrógenos, la EMT y el sistema inmunológico en *IDH1^{mut}* CCA_PDX. La comparación entre los genes identificados en el análisis DE y los conjuntos de metagenes del análisis de agrupamiento no supervisado reveló una superposición significativa ($p < 2.2 \times 10^{-16}$), lo que sugiere una contribución esencial de los genes expresados diferencialmente al agrupamiento de la muestra.

La expresión de los genes relacionados con el sistema inmunológico está regulada negativamente en *IDH1^{mut}* CCA_PDX.

Centramos nuestro análisis en comparar la expresión de genes y vías relacionados con el sistema inmunológico en nuestros CCA_PDX *IDH1^{mut}* e *IDH1^{wt}*. Las firmas de "respuesta inflamatoria", interferón alfa ($IFN\alpha$) e interferón-gamma ($IFN\gamma$) mostraron tendencias a enriquecerse negativamente en nuestros *IDH1^{mut}* CCA_PDX. La comparación entre *IDH1^{mut}* e *IDH1^{wt}* CCA_PDX reveló una disminución notable en la expresión de genes relacionados con vías inmunitarias, incluidas quimiocinas, citocinas e interleucinas. Entre los genes regulados negativamente en *IDH1^{mut}* CCA_PDX, se destacó el estimulador de genes de interferón (*STING1*), conocido por regular la transcripción de genes de defensa del huésped como los interferones tipo I (IFN) y las citocinas proinflamatorias. *STING1* desempeña un papel crucial en el reclutamiento de

células inmunitarias en los sitios tumorales y es cada vez más reconocido por su importancia en la mejora de las respuestas inmunitarias contra los tumores. Utilizamos una firma de interferón de 47 genes (IFNsign) para evaluar nuestras muestras, que combina genes de conjuntos de respuesta de IFN-alfa e IFN-gamma. La expresión alta de IFNsign (IFNsignhigh) está relacionada con una mayor infiltración inmune y un microambiente proinflamatorio en PDAC. La agrupación basada en genes IFNsign separó las muestras en grupos enriquecidos con *IDH1^{wt}* e *IDH1^{mut}*. Los *IDH1^{wt}* CCA_PDX tendieron a tener puntuaciones de IFNsign más altas que los *IDH1^{mut}*. Para confirmar esto, seleccionamos ocho genes relacionados con la vía del interferón previamente identificados como expresados diferencialmente entre grupos y utilizamos RT-qPCR para validar su expresión en todos los PDX de nuestro banco. Nuestros hallazgos se mantuvieron consistentemente en la cohorte de muestra ampliada, y nuestros datos demostraron una expresión de genes inmunes disminuida en *IDH1^{mut}* CCA_PDX.

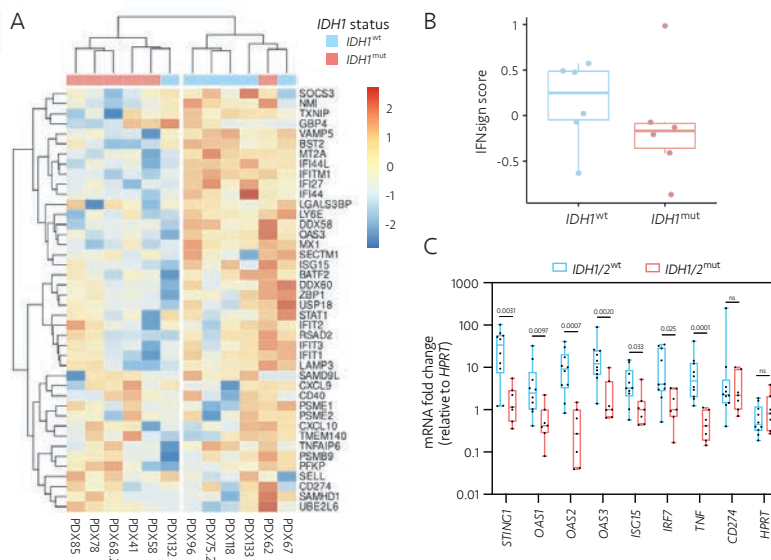


Figura 2. Los genes implicados en la señalización del interferón están regulados negativamente en *IDH1^{mut}* CCA_PDX. (A) Mapa de calor que muestra la agrupación no supervisada de CCA_PDX basada en la expresión diferencial de genes IFNsign. **(B)** Puntuación de IFNsign en *IDH1^{wt}* e *IDH1^{mut}* CCA_PDX. **(C)** Análisis RT-qPCR de la expresión génica relacionada con el interferón en nuestra colección CCA_PDX.

Perfil de metilación del ADN de CCA_PDX

Analizamos la metilación del ADN en nuestra colección CCA_PDX utilizando el beadChip Illumina Human MmethylationEPIC. Las diferencias en la metilación del ADN de sitios CpG individuales revelaron que la mayoría de los cambios fueron ganancias de metilación en *IDH1^{mut}* CCA_PDX. A través del análisis GSEA, encontramos que el CpG asociado con genes que están involucrados en vías como "EMT", "hipoxia" y "respuesta al estrógeno" parecían metilados diferencialmente entre *IDH1^{wt}* e *IDH1^{mut}* CCA_PDX. Es

importante destacar que cuando nos centramos en la metilación del promotor, encontramos que las CpG involucradas en la "respuesta de IFN γ " parecían estar metiladas de manera diferencial entre los dos grupos. Demostramos que los CpG están significativamente más metilados en *IDH1*^{mut} CCA_PDX, lo que sugiere que la hipermetilación de los promotores de genes relacionados con el sistema inmunológico está relacionada con la regulación negativa de estos genes en estos PDX.

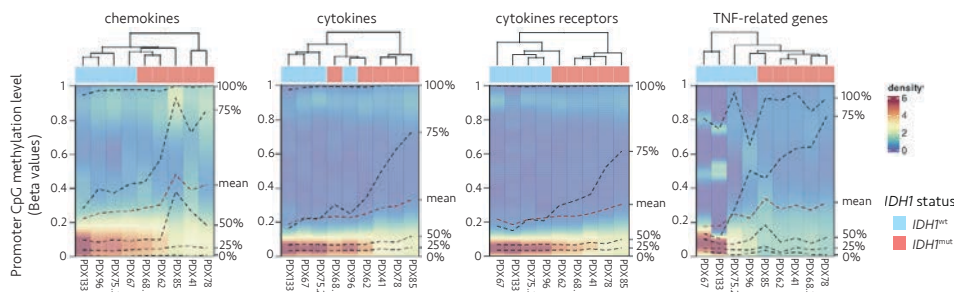


Figura 3. Los promotores CpG de genes relacionados con el sistema inmunitario están hipermetilados en *IDH1*^{mut} CCA_PDX, en comparación con *IDH1*^{wt}. Mapas de calor de densidad que muestran los niveles de metilación de CpG del promotor encontrados en CCA_PDX.

Mapeo del microambiente inmunológico tumoral (TIME) de CCA_PDX mediante inmunohistoquímica multiplexada

Con base en nuestros estudios transcriptómicos y de metilación del ADN en CCA_PDX, planteamos la hipótesis de que en *IDH1*^{mut} CCA_PDX, el 2-HG producido por la enzima *IDH1* mutante podría conducir a una hipermetilación del ADN de promotores de genes específicos relacionados con el sistema inmunológico. Realizamos inmunohistoquímica multiplexada (mIHC) en muestras de biopsia de 8 pacientes con CCA avanzado; cuatro de estas muestras eran *IDH1*^{mut} y las otras eran *IDH1*^{wt}. Los resultados mostraron que las muestras de *IDH1*^{mut} exhiben una infiltración de células inmunes ligeramente elevada. En el área dentro del tumor, las muestras muestran una mayor concentración de células CD163⁺ que de células CD3⁺, independientemente del estado de mutación *IDH1*. Los resultados indican que los pacientes con *IDH1*^{mut} CCA podrían experimentar problemas con la activación de las células T en lugar de con la infiltración de células T.

Estrategias terapéuticas para potenciar la inmunogenicidad de los CCA *IDH1*^{mut}

Nuestros hallazgos indican que la expresión reducida de genes relacionados con el sistema inmunológico, posiblemente debido a una metilación excesiva del ADN de sus regiones promotoras, podría estar asociada con un microambiente inmunológico tumoral alterado de los CCA *IDH1*^{mut} que puede afectar negativamente la eficacia de los infiltrados tumorales de células T. Proponemos que la inhibición de la enzima *IDH1*

mutante o de las ADN metiltransferasas (DNMT), que son responsables de la metilación del ADN, podría revertir este fenotipo inmunosuprimido y hacer que los CCA *IDH1*^{mut} respondan mejor a la inmunooncología.

Las líneas celulares CCA recapitulan el fenotipo observado en CCA_PDX

Verificamos si estos modelos celulares recapitulan el fenotipo observado previamente en nuestros modelos CCA_PDX. Como se esperaba, ambas líneas celulares *IDH1*^{mut} mostraron niveles de 2-HG más altos que las células *IDH1*^{wt}. En consecuencia, se encontraron niveles más altos de la marca de metilación del ADN 5-metilcitosina (5 mC) en células *IDH1*^{mut} Snu1079 y RBE. Es importante destacar que también encontramos que uno de los principales genes regulados negativamente identificados en *IDH1*^{mut} CCA_PDX, *STING1*, estaba regulado negativamente en las líneas celulares *IDH1*^{mut} Snu1079 y RBE, tanto a nivel de ARNm como de proteína.

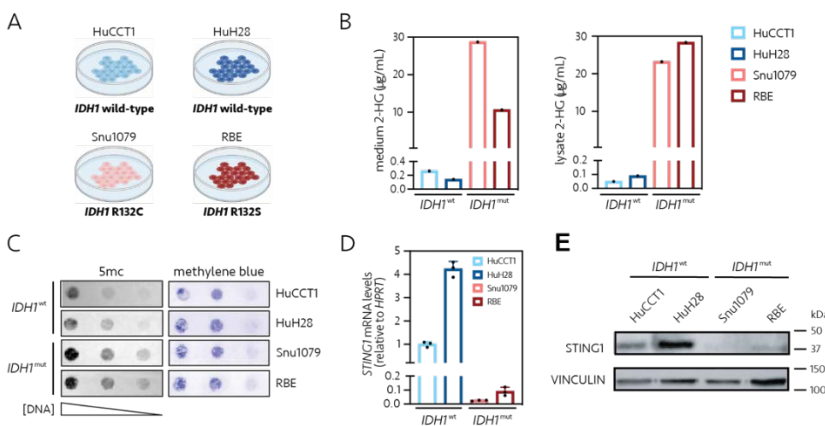


Figura 4. Caracterización de los cuatro modelos de líneas celulares CCA. (A) Estado de mutación *IDH1* de cuatro modelos de líneas celulares CCA. **(B)** Cuantificación de 2-HG por LS-MS. **(C)** Evaluación de niveles de 5 mC mediante Dot Blot. **(D)** Análisis RT-qPCR de *STING1*. La expresión *HPRT* se utilizó como gen de mantenimiento para la normalización. Los datos de ARNm se presentan como media ± sd. **(E)** Determinación de los niveles de proteína *STING1* mediante Western Blot. Se utilizó VINCULIN como control de carga.

Tratamientos que aumentan la expresión de *STING* en líneas celulares *IDH1*^{mut} CCA

Tratamos las células CCA con un agente desmetilante del ADN clínicamente probado, la decitabina. Su aplicación disminuyó 5 mC tanto en las líneas celulares *IDH1*^{wt} como en *IDH1*^{mut}. Sin embargo, la regulación positiva de *STING1* se observó únicamente en líneas celulares *IDH1*^{mut} CCA y no en células *IDH1*^{wt}. El tratamiento con agentes desmetilantes del ADN puede aumentar la expresión de *STING* en líneas celulares *IDH1*^{mut} CCA. Para verificar si la inhibición del *IDH1* mutante podría conducir a un aumento de genes relacionados con el sistema inmunológico, tratamos las líneas celulares *IDH1*^{mut} Snu10790 y RBE con el inhibidor de *IDH1* mutante, ivosidenib. En

consecuencia, se encontraron niveles reducidos de 5 mC en líneas celulares *IDH1^{mut}* tratadas con ivosidenib durante 120 horas. Tratamos Snu1079 y RBE constantemente con ivosidenib (5 μ M) y estas nuevas líneas se utilizaron para estudios funcionales adicionales.

Se ha demostrado que tanto los tratamientos con agentes desmetilantes del ADN como con inhibidores mutantes de IDH1 disminuyen los niveles de 5 mC y aumentan la expresión de *STING*. Realizamos estudios de transcriptómica de todo el genoma y de metilación del ADN para verificar si las dos estrategias potenciales pueden mejorar la expresión de genes inmunitarios.

El anticuerpo biespecífico de células HER2-T se puede utilizar para estudiar la activación de las células T

Probamos si la administración de decitabina e ivosidenib a las células *IDH1^{mut}* CCA afectaría la activación de las células T. Realizamos una prueba de citometría de flujo para confirmar la expresión de HER2 en nuestras líneas celulares CCA en condiciones basales y tras los tratamientos indicados. Los resultados mostraron que las cuatro líneas celulares CCA expresaban *HER2*, y la variación en su expresión tras los tratamientos con decitabina o ivosidenib no desempeña un papel significativo en la activación de las células T. Expusimos líneas celulares CCA a decitabina 5 μ M durante 24 o 48 horas. Posteriormente repusimos el medio de cultivo para eliminar cualquier resto de decitabina y los cultivamos conjuntamente con PBMC de donantes sanos durante 72 horas adicionales con la presencia de HER2-TCB 100 pM. Medimos la activación y la citotoxicidad de las células T utilizando el marcador de activación tardía CD25 y el marcador citotóxico Granzyme B (GZMB). Los resultados del estudio mostraron que cuando no se administró el tratamiento con HER2-TCB, hubo poca activación de las células T (%CD25⁺ (de células CD3⁺)) y citotoxicidad (%GZMB⁺ (de células CD3⁺)). Sin embargo, cuando HER-TCB estaba presente (a una concentración de 100 pM), el cocultivo de células *IDH1^{mut}* Snu1079 y RBE pretratadas con decitabina con PBMC condujo a un aumento significativo en la activación de las células T y la expresión citotóxica de GZMB. Por el contrario, cuando las células *IDH1^{wt}* HuCCT1 y HuH28 pretratadas con decitabina se cultivaron conjuntamente con PBMC, la activación de las células T y la citotoxicidad fueron mínimas.

Examinamos los marcadores de activación de células T y citotoxicidad en la población CD8⁺ y la activación de células T en la población CD4⁺. Descubrimos que, en

comparación con las células *IDH1*^{wt} pretratadas con decitabina (HuCCT1 y HuH28), las células *IDH1*^{mut} (Snu1079 y RBE) tratadas con decitabina aumentaron la activación y la citotoxicidad de las células T CD8⁺ en presencia de HER2-TCB de manera más significativa. Además, las células *IDH1*^{mut} pretratadas con decitabina también aumentaron la activación de las células T CD4⁺ en presencia de HER2-TCB. En particular, las células T auxiliares CD4⁺ desempeñan un papel fundamental en el apoyo a las funciones efectoras de CD8⁺ y en la dirección de una respuesta inmune sostenida contra los tumores.

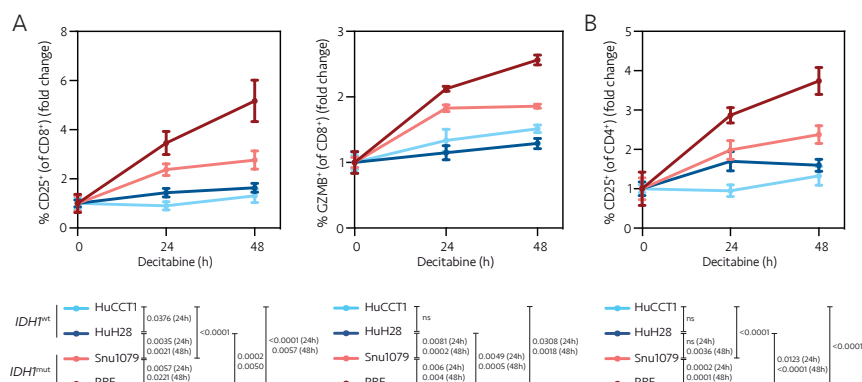


Figura 5. El tratamiento con decitabina aumenta la activación de las células T CD8⁺ citotóxicas y CD4⁺ auxiliares solo en cocultivos con células *IDH1*^{mut} CCA. Las células CCA previamente tratadas con decitabina 5 μ M se cocultivaron con PBMC en una proporción de 1:1 y 100 pM de HER2-TCB durante 72 h antes de la evaluación del marcador. **(A)** Análisis de citometría de flujo del marcador de activación tardía CD25 (izquierda) y del marcador de citotoxicidad de Granzima B (GZMB) (derecha) en células T CD8⁺. **(B)** Análisis de citometría de flujo del marcador de activación tardía CD25 en células T CD4⁺. El porcentaje de positividad se representa como el cambio en comparación con el control no tratado para cada línea celular. Los datos se presentan como media \pm sd, n = 3 réplicas independientes, y se analizaron mediante comparaciones múltiples ANOVA bidireccional con corrección de Tukey.

A continuación, evaluamos si el tratamiento con ivosidenib, inhibidor de *IDH1* mutante, en células *IDH1*^{mut} podría aumentar la activación y citotoxicidad de las células T con la presencia de HER2-TCB y no encontramos cambios significativos en la activación y toxicidad de las células T.

3. Relevancia con posibles implicaciones futuras

Nuestra propuesta abordará sistemáticamente los efectos específicos de las mutaciones de *IDH1* en el contenido de las células inmunes de CCA y sus cambios dinámicos durante el tratamiento. Estos datos brindarán una gran cantidad de oportunidades para

soluciones clínicas para pacientes con CCA: 1) Desarrollo futuro de fármacos: dilucidar los detalles moleculares del mecanismo proporcionará una solución farmacológica para tratar el CCA incurable; 2). Biomarcadores e inmunoterapia: obtener un mapa detallado de la expresión génica en muestras de tumores a partir de nuestros resultados ayudará a descubrir nuevos biomarcadores y desarrollar estrategias de inmunoterapia con un enorme potencial clínico; y 3) Mejora de la toma de decisiones basada en biomarcadores predictivos que ofrecerán una nueva oportunidad para mejorar la toma de decisiones terapéuticas y, por tanto, mejorar la eficacia de las inmunoterapias.

4. Bibliografía científica generada

Publicaciones

1. **Yanez-Bartolome M, Macarulla T, Tian TV.** The potential of patient-derived organoids in precision medicine of biliary tract cancer. *Cell Rep Med.* 2023;4(11):101294. Epub 2023/11/23. doi: 10.1016/j.xcrm.2023.101294. PubMed PMID: 37992681.

2. **Serra-Camprubi Q, Verdaguer H,** Oliveros W, **Lupion-Garcia N,** Llop-Guevara A, Molina C, Vila-Casadesus M, Turpin A, Neuzillet C, Frigola J, **Querol J, Yanez-Bartolome M, Castet F, Fabregat-Franco C, Escudero-Iriarte C,** Escorihuela M, Arenas EJ, Bernado-Morales C, Haro N, Giles FJ, Pozo OJ, Miquel JM, Nuciforo PG, Vivancos A, Mele M, Serra V, Arribas J, Tabernero J, Peiro S, **Macarulla T, Tian TV.** Human Metastatic Cholangiocarcinoma Patient-Derived Xenografts and Tumoroids for Preclinical Drug Evaluation. *Clin Cancer Res.* 2023;29(2):432-45. Epub 2022/11/15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-2551. PubMed PMID: 36374558; PMCID: PMC9873249.

Tesis doctorales

Queralt Serra, A journey towards the identification of novel therapeutical strategies for advanced cholangiocarcinoma with IDH1 mutations, 27 July 2023. Cum Laude.