



MEMÒRIA

25è RETORN SOCIAL DE LA RECERCA
CÀNCER

CARACTERITZACIÓ EPIGENÈTICA DELS COLANGIOCARCINOMES

Dra. Teresa Macarulla Mercadé

VHIO Vall d'Hebron Institut d'Investigació Oncològica

Dra. Marta Melé Messeguer

BSC Barcelona Supercomputing Center

1. Resum del projecte

OBJECTIUS

En aquest projecte, vam proposar utilitzar la nostra col·lecció única de models derivats de pacients de colangiocarcinoma (CCA) per caracteritzar-los molecularment i epigenètica. Teníem previst realitzar una anàlisi integradora per caracteritzar els CCA molecularment i epigenètica i entendre la relació entre l'arquitectura genètica i epigenètica dels CCA. A més a més, teníem previst provar diferents inhibidors en models IDH1/2 CCA i estudiar la biologia darrere d'aquesta activitat. Això pot conduir a identificar biomarcadors terapèutics potencials i/o estratègies terapèutiques noves.

OBJECTIUS ESPECÍFICS

Establiment i caracterització de xenografts derivats del pacient (PDX) a partir de CCA IDH1 de tipus salvatge i mutant.

1. Creació d'un epigenoma de referència de models CCA_PDXs IDH1 de tipus salvatge i mutants i perfils de transcriptoma.
2. Avaluar l'eficàcia de diferents tractaments en models IDH1 de tipus salvatge i mutants de CCA_PDXs.
3. Identificar biomarcadors potencials per predir la resposta a aquest tractament i millorar l'estratificació del pacient.

MÈTODES

OBJECTIU 1: Establiment i caracterització de xenografts derivats del pacient (POX) a partir de CCA IDH1 de tipus salvatge i mutant.

OBJECTIU 2: Generació d'epigenomes de referència a partir de CCA_PDXs i perfils de transcriptoma

- Les mostres de 6 CCA_PDX IDH1wt i 6 CCA_PDX IDH1mut s'utilitzaran per realitzar ChIPseq.
- Caracteritzar el paisatge mutacional dels CCA PDX i comparar-los amb les biòpsies tumorals.
- Generar epigenomes de referència a partir de CCA PDX que consisteixin en l'accessibilitat de l'ADN mitjançant ATACseq (Assaig per a la cromatina accessible a la transposasa).

- Anàlisi integradora per vincular els canvis en l'expressió gènica amb els canvis epigenètics a les regions de la cromatina properes.

OBJECTIU 3: Avaluar l'eficàcia de diferents tractaments en models de tipus salvatge i mutants IDH1 de CCA_PDX

- Els models IDH1 de tipus salvatge i CCA_PDXs mutants seran tractats ex vivo amb quimioteràpia a base de platí.
- Obtenir perfils d'expressió gènica per RNAseq en tots els models generats, amb especial atenció als platí-sensibles (PtS) en combinació amb els inhibidors de PARP (PtS_PARPiR -Resistant- i PtS_PARPiS - Sensitive-).

OBJECTIU 4: Identificar biomarcadors potencials per predir la resposta a aquest tractament i millorar l'estratificació del pacient

- La metilació de l'ARNseq i l'ADN en la configuració PDX_IDH1mut en comparació amb la configuració PDX_IDH1wt ens donarà biomarcadors candidats que qRT-PCR i IHQ validaran en mostres de tumor.
- Identificarem biomarcadors que ens permetin estratificar els pacients en funció de la seva expressió diferencial, metilació i/o accessibilitat. Realitzarem diverses validacions, com ara qRT-PCR i immunohistoquímica, en mostres de tumors de pacients.

2. Resultats obtinguts

Part dels resultats obtinguts encara s'estan publicant (CONFIDENCIAL).

Perfil transcriptòmic de CCA_PDXs

L'anàlisi de dades d'ARN-seq de mostres de CCA_PDX mitjançant l'anàlisi de components principals (PCA) i la agrupació jeràrquica no supervisada va revelar dos grups diferents basats en l'estat de mutació IDH1. El clúster 1 (*IDH1^{mut}* i *IDH1^{wt}* PDX133) va mostrar un enriquiment en processos metabòlics, com el metabolisme dels àcids grassos o la biosíntesi d'àcids biliars. En canvi, el Clúster 2 (*IDH1^{wt}*) s'enriqueix en vies de desenvolupament, com ara WNT-β-catenina i Notch, vies relacionades amb el sistema immunitari i factors de transició epitelial-mesenquimal (EMT).

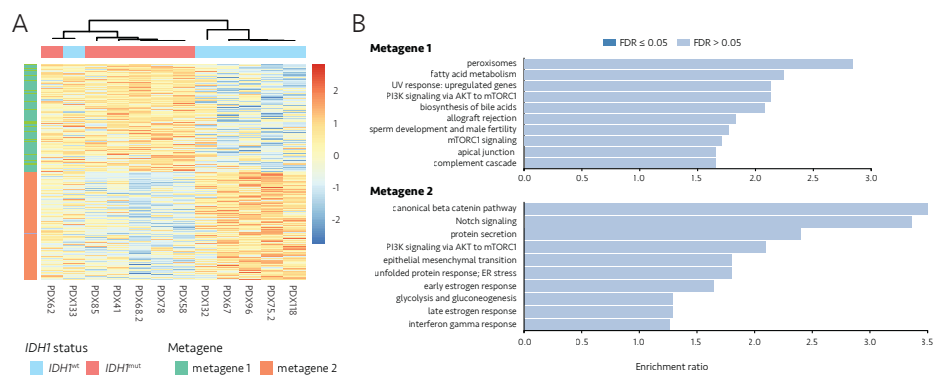


Figura 1. L'agrupació no supervisada de dades d'ARN-seq va separar mostres de CCA_PDX segons l'estat de mutació IDH1. (A) Agrupació no supervisada de CCA_PDX basat en dades d'ARN-seq. **(B)** Enriquiment del conjunt de gens dels dos metagens. FDR, taxa de fals descobriment.

L'anàlisi de l'expressió diferencial (DE) va revelar una baixada significativa de l'expressió gènica i la superposició amb metagens.

L'anàlisi DE comparant *IDH1^{mut}* i *IDH1^{wt}* CCA_PDXs va revelar 575 gens desregulats en tumors *IDH1^{mut}*, dels quals 447 estaven regulats. L'anàlisi d'enriquiment del conjunt de gens (GSEA) mitjançant la base de dades Hallmark va mostrar una regulació negativa de les vies relacionades amb la hipòxia, la resposta d'estrògens, l'EMT i el sistema immunitari en *IDH1^{mut}* CCA_PDXs. La comparació entre els gens identificats a l'anàlisi DE i els conjunts de metagens de l'anàlisi d'agrupació no supervisada va revelar una superposició significativa ($p < 2.2e-16$), cosa que suggereix una contribució essencial dels gens expressats de manera diferencial a l'agrupació de mostres.

L'expressió dels gens relacionats amb el sistema immunitari està regulada negativament en els *IDH1^{mut}* CCA_PDX.

Hem centrat la nostra anàlisi a comparar l'expressió de gens i vies relacionades amb la immunitat en els nostres CCA_PDX *IDH1^{mut}* i *IDH1^{wt}*. Les signatures de "resposta inflamatòria", interferó-alfa ($IFN\alpha$) i interferó gamma ($IFN\gamma$) van mostrar tendències a enriquir-se negativament en els nostres *IDH1^{mut}* CCA_PDX. La comparació entre *IDH1^{mut}* i *IDH1^{wt}* CCA_PDXs va revelar una disminució notable de l'expressió de gens relacionats amb les vies immunitàries, incloses les quimiocines, les citocines i les interleucines. Entre els gens regulats a la baixa en *IDH1^{mut}* CCA_PDX, va destacar l'estimulador dels gens d'interferó (*STING1*), conegut per regular la transcripció de gens de defensa de l'hoste com els interferons tipus I (IFN) i les citocines proinflamatòries. *STING1* té un paper crucial en el reclutament de cèl·lules immunitàries als llocs tumorals i es reconeix cada cop més la seva importància per

millorar les respostes immunitàries contra els tumors. Hem utilitzat una signatura d'interferó de 47 gens (IFNsign) per avaluar les nostres mostres, que combina gens de conjunts de resposta IFN-alfa i IFN-gamma. L'expressió d'IFNsign alta (IFNsignhigh) està relacionada amb l'augment de la infiltració immune i un microambient proinflamatori en PDAC. L' agrupació basada en gens IFNsign va separar les mostres en grups enriquits amb *IDH1^{wt}* i *IDH1^{mut}*. Els *IDH1^{wt}* CCA_PDX tendeixen a tenir puntuacions IFNsign més altes que les *IDH1^{mut}*. Per confirmar-ho, vam seleccionar vuit gens relacionats amb la via de l'interferó identificats prèviament com a expressats de manera diferencial entre grups i vam utilitzar RT-qPCR per validar la seva expressió a tots els PDX del nostre banc. Les nostres troballes es van mantenir constantment a la cohort de mostres ampliada i les nostres dades van demostrar una disminució de l'expressió gènica immune en *IDH1^{mut}* CCA_PDXs.

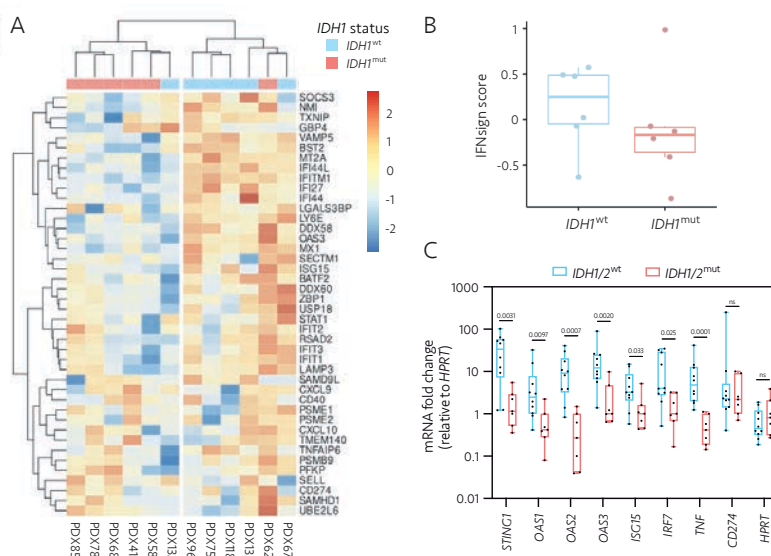


Figura 2. Els gens implicats en la senyalització d'interferó estan regulats negativament en els *IDH1^{mut}* CCA_PDX. (A) Mapa de calor que mostra l'agrupament no supervisat de CCA_PDX basat en l'expressió diferencial dels gens IFNsign. **(B)** Puntuació IFNsign en *IDH1^{wt}* i *IDH1^{mut}* CCA_PDX. **(C)** Anàlisi RT-qPCR de l'expressió gènica relacionada amb l'interferó a la nostra col·lecció CCA_PDXs.

Perfil de metilació de l'ADN de CCA_PDXs

Hem analitzat la metilació de l'ADN a la nostra col·lecció CCA_PDX mitjançant el beadChip Illumina Human MethylationEPIC. Les diferències en la metilació de l'ADN dels llocs CpG individuals van revelar que la majoria dels canvis eren guanys de metilació en *IDH1^{mut}* CCA_PDXs. Mitjançant l'anàlisi GSEA, vam trobar que la CpG associada a gens que estan implicats en vies com ara "EMT", "hipòxia" i "resposta

d'estrògens" semblava metilada de manera diferent en *IDH1^{wt}* i *IDH1^{mut}* CCA_PDXs. És important destacar que quan ens vam centrar en la metilació del promotor, vam trobar que els CpG implicats en la "resposta IFN γ " semblaven estar metilats de manera diferent entre els dos grups. Hem demostrat que els CpG estan significativament més metilats en els *IDH1^{mut}* CCA_PDX, cosa que suggereix que la hipermetilació dels promotors gènics relacionats amb la immunitat està relacionada amb la regulació netaiva d'aquests gens en aquests PDX.

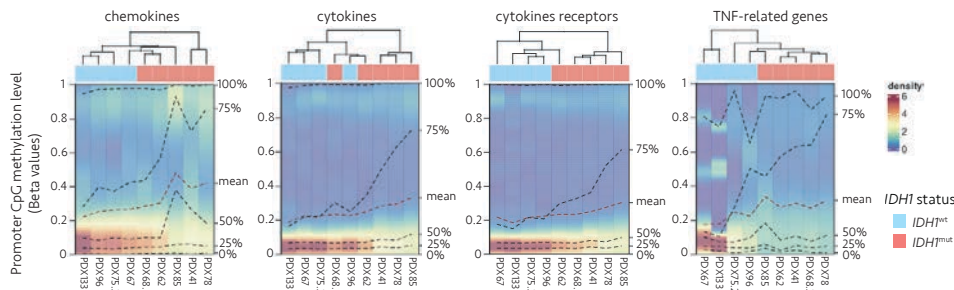


Figura 3. Els promotors CpG de gens relacionats amb la immunitat estan hipermetilats en *IDH1^{mut}* CCA_PDX, en comparació amb *IDH1^{wt}*. Mapes de calor de densitat que mostren els nivells de metilació del promotor CpG trobats a CCA_PDX.

Mapatge del microambient immunitari del tumor (TIME) de CCA_PDX mitjançant la multiplexació de la immunohistoquímica

A partir dels nostres estudis transcriptòmics i de metilació de l'ADN sobre CCA_PDX, vam plantejar la hipòtesi que en els *IDH1^{mut}* CCA_PDXs, el 2-HG produït per l'enzim IDH1 mutant podria conduir a una hipermetilació de l'ADN de promotors gènics específics relacionats amb la immunitat. Hem realitzat immunohistoquímica multiplexada (mIHC) en mostres de biòpsia de 8 pacients amb CCA avançat; quatre d'aquestes mostres eren *IDH1^{mut}* i les altres eren *IDH1^{wt}*. Els resultats van mostrar que les mostres *IDH1^{mut}* presenten una infiltració de cèl·lules immunitàries lleugerament elevada. A la zona del tumor, les mostres mostren una concentració més alta de cèl·lules CD163⁺ que de cèl·lules CD3⁺, independentment de l'estat de mutació *IDH1*. Els resultats indiquen que els pacients amb *IDH1^{mut}* CCA poden experimentar problemes amb l'activació de cèl·lules T en lloc de la infiltració de cèl·lules T.

Estratègies terapèutiques per augmentar la immunogenicitat dels CCA *IDH1^{mut}*

Els nostres resultats indiquen que la reducció de l'expressió de gens relacionats amb la immunitat, possiblement a causa de la metilació excessiva de l'ADN de les seves regions promotores, podria estar associada a un microambient immunitari tumoral

alterat dels CCA *IDH1^{mut}* que pot afectar negativament l'eficàcia dels infiltrats de tumors de cèl·lules T. Proposem que la inhibició de l'enzim IDH1 mutant o de les ADN metiltransferases (DNMT), que són responsables de la metilació de l'ADN, podria revertir aquest fenotip immunosuprimit i fer que els CCA *IDH1^{mut}* responguin més a la immuno-oncologia.

Les línies cel·lulars CCA recapitulen el fenotip observat als CCA_PDX

Hem verificat si aquests models de cèl·lules recapitulen el fenotip observat anteriorment als nostres models CCA_PDX. Com era d'esperar, ambdues línies cel·lulars *IDH1^{mut}* van mostrar nivells de 2-HG més alts que les cèl·lules *IDH1^{wt}*. En conseqüència, es van trobar nivells més alts de la marca de metilació de l'ADN 5-metilcitosina (5mC) a les cèl·lules *IDH1^{mut}* Snu1079 i RBE. És important destacar que també vam trobar que un dels gens regulats negativament identificats a l'*IDH1^{mut}* CCA_PDXs, *STING1*, estava regulat a la baixa en les línies cel·lulars *IDH1^{mut}* Snu1079 i RBE, tant a nivell d'ARNm com de proteïna.

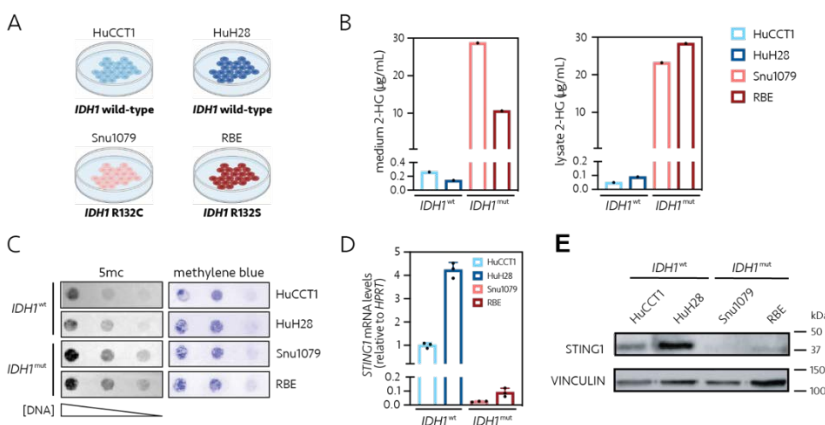


Figura 4. Caracterització dels quatre models de línia cel·lular CCA. (A) Estat de mutació IDH1 de quatre models de línia cel·lular CCA. **(B)** Quantificació de 2-HG per LS-MS. **(C)** Avaluació dels nivells de 5 mC mitjançant Dot Blot. **(D)** Anàlisi RT-qPCR de *STING1*. L'expressió *HPRT* es va utilitzar com a gen control per a la normalització. Les dades d'ARNm es presenten com a mitjana ± s.d. **(E)** Determinació dels nivells de proteïna *STING1* mitjançant Western Blot. *VINCULIN* es va utilitzar com a control de càrrega.

Tractaments que augmenten l'expressió *STING* a les línies cel·lulars *IDH1^{mut}* CCA

Vam tractar cèl·lules CCA amb un agent desmetilant de l'ADN provat clínicament, la decitabina. La seva aplicació va disminuir 5 mC tant a les línies cel·lulars *IDH1^{wt}* com a *IDH1^{mut}*. No obstant això, la regulació de *STING1* es va observar únicament a les línies cel·lulars *IDH1^{mut}* CCA i no a les cèl·lules *IDH1^{wt}*. El tractament d'agents desmetiladors de l'ADN pot augmentar l'expressió *STING* a les línies cel·lulars *IDH1^{mut}* CCA. Per

verificar si la inhibició de l'IDH1 mutant podria provocar un augment dels gens relacionats amb el sistema immunitari, vam tractar les línies cel·lulars *IDH1^{mut}* Snu10790 i RBE amb l'inhibidor IDH1 mutant, ivosidenib. En conseqüència, es van trobar nivells reduïts de 5 mC a les línies cel·lulars *IDH1^{mut}* tractades amb ivosidenib durant 120 hores. Vam tractar Snu1079 i RBE constantment amb ivosidenib (5 µM), i aquestes noves línies es van utilitzar per a estudis funcionals posteriors.

S'ha demostrat que tant els tractaments amb l'agent desmetilant de l'ADN com els inhibidors IDH1 mutants disminueixen els nivells de 5 mC i augmenten l'expressió *STING*. Realitzem estudis de transcriptòmica i metilació de l'ADN a tot el genoma per verificar si les dues estratègies potencials poden millorar l'expressió gènica de gens relacionats amb vies immunitàries.

L'anticòs biespecífic de cèl·lules HER2-T es pot utilitzar per estudiar l'activació de les cèl·lules T

Vam provar si administrar decitabina i ivosidenib a cèl·lules *IDH1^{mut}* CCA afectaria l'activació de les cèl·lules T. Vam realitzar una prova de citometria de flux per confirmar l'expressió de HER2 a les nostres línies cel·lulars CCA en condicions basals i amb els tractaments indicats. Els resultats van mostrar que les quatre línies cel·lulars de CCA expressaven *HER2* i la variació de la seva expressió amb tractaments amb decitabina o ivosidenib no té un paper significatiu en l'activació de cèl·lules T. Vam exposar línies cel·lulars CCA a 5 µM de decitabina durant 24 o 48 hores. A continuació, vam refrescar el medi de cultiu per eliminar la decitabina restant i les vam co-cultivar amb PBMC de donants sans durant 72 hores addicionals amb la presència de 100 pM HER2-TCB. Vam mesurar l'activació i la citotoxicitat de les cèl·lules T mitjançant el marcador d'activació tardana CD25 i el marcador citotòxic Granzyme B (GZMB). Els resultats de l'estudi van mostrar que quan no es va administrar el tractament amb HER2-TCB, hi havia poca activació de cèl·lules T (% CD25⁺ (de cèl·lules CD3⁺)) i citotoxicitat (% GZMB⁺ (de cèl·lules CD3⁺)). Tanmateix, quan hi havia HER-TCB (a una concentració de 100 pM), el co-cultiu de cèl·lules *IDH1^{mut}* Snu1079 i RBE pretractades amb decitabina amb PBMC va provocar un augment significatiu de l'activació de cèl·lules T i l'expressió citotòxica de GZMB. En canvi, quan les cèl·lules HuCCT1 i HuH28 *IDH1^{wt}* pretractades amb decitabina es van cocultivar amb PBMC, l'activació de les cèl·lules T i la citotoxicitat van ser mínimes.

Es van examinar els marcadors d'activació i citotoxicitat de cèl·lules T a la població CD8⁺ i l'activació de cèl·lules T a la població CD4⁺. Vam trobar que, en comparació amb les cèl·lules *IDH1^{wt}* pretractades amb decitabina (HuCCT1 i HuH28), les cèl·lules *IDH1^{mut}* (Snu1079 i RBE) tractades amb decitabina van augmentar l'activació i la citotoxicitat de les cèl·lules T CD8⁺ sota la presència de HER2-TCB de manera més significativa. A més, les cèl·lules *IDH1^{mut}* pretractades amb decitabina també van augmentar l'activació de les cèl·lules T CD4⁺ sota la presència de HER2-TCB. En particular, les cèl·lules T auxiliars CD4⁺ tenen un paper crític en el suport a les funcions efectores CD8⁺ i en la direcció d'una resposta immune sostinguda contra els tumors.

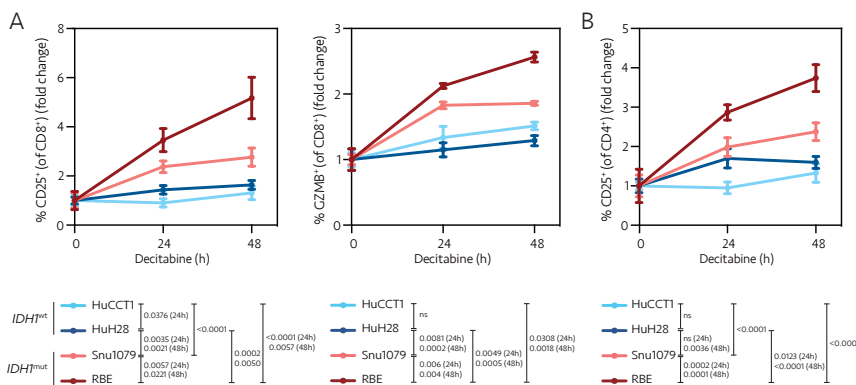


Figura 5. El tractament amb decitabina augmenta l'activació de cèl·lules T CD8⁺ citotòxiques i CD4⁺ auxiliars només en cocultius amb cèl·lules CCA *IDH1^{mut}*. Les cèl·lules CCA tractades prèviament amb decitabina 5 μ M es van cocultivar amb PBMC en una proporció 1:1 i 100 pM de HER2-TCB durant 72 h abans de l'avaluació del marcador. **(A)** Anàlisi de citometria de flux del marcador d'activació tardana CD25 (esquerra) i del marcador de citotoxicitat Granzyme B (GZMB) (dreta) a les cèl·lules T CD8⁺. **(B)** Anàlisi de citometria de flux del marcador d'activació tardana CD25 en cèl·lules T CD4⁺. El percentatge de positivitat es representa com el canvi de plec en comparació amb el control no tractat per a cada línia cel·lular. Les dades es presenten com a mitjana ± s.d., n = 3 rèpliques independents i es van analitzar mitjançant comparacions múltiples ANOVA bidireccionals amb correcció de Tukey.

A continuació, es va avaluar si el tractament amb ivosidenib amb inhibidor IDH1 mutant de cèl·lules *IDH1^{mut}* podria augmentar l'activació i la citotoxicitat de les cèl·lules T amb la presència de HER2-TCB i no es va trobar canvis significatius en l'activació i la toxicitat de les cèl·lules T.

3. Rellevància amb possibles implicacions futures

La nostra proposta abordarà sistemàticament els efectes específics de les mutacions *IDH1* sobre el contingut de cèl·lules immunitàries del CCA i els seus canvis dinàmics durant el tractament. Aquestes dades proporcionaran una gran quantitat d'oportunitats per a solucions clíniques per als pacients amb CCA: 1) Desenvolupament futur de fàrmacs: dilucidar els detalls moleculars del mecanisme proporcionarà una solució farmacològica per tractar el CCA incurable; 2). Biomarcadors i immunoteràpia: disposar d'un mapa detallat de l'expressió gènica en mostres de tumors a partir dels nostres resultats ajudarà a descobrir nous biomarcadors i desenvolupar estratègies d'immunoteràpia amb un gran potencial clínic; i 3) Millora de la presa de decisions basada en biomarcadors predictius que oferiran una nova oportunitat per millorar la presa de decisions terapèutiques i, per tant, millorar l'eficàcia de les immunoteràpies.

4. Bibliografia científica generada

Publicacions

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, Taberner 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 doctorals

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