RECULL DE CONFERÈNCIES 2021 / DEBATS DE RECERCA 14: 268-273 (2022)
Societat Andorrana de Ciències, Andorra
DOI: 10.2436/15.8060.31.9 ISBN: 978-99920-61-65-7

Winona Oliveros i Díez

Graduada en Microbiologia, màster en Bioinformàtica i doctoranda al Transcriptomics and Functional Genomics Lab, del Barcelona Supercomputing Center / Universitat de Barcelona

Winona Oliveros i Díez

Caracterització epigenètica dels colangiocarcinomes

Introducció

El colangiocarcinoma (CCA) és un càncer poc freqüent que es forma en els conductes biliars que transporten la bilis. Representa entre el 10 i el 20% dels càncers de fetge primaris diagnosticats, fet que el col·loca en la segona malignitat hepatobiliar més comuna. El CCA és un tipus de tumor que és molt difícil de tractar i l'únic tractament potencialment curatiu que existeix actualment és la cirurgia del tumor. No obstant això, la majoria dels pacients presenten un pronòstic complicat a causa de la gran recurrència d'aquests tumors després de la cirurgia. A més, la majoria dels pacients no són diagnosticats fins que la malaltia ja és inoperable o metastàtica; per tant, només qualificant per a quimioteràpia pal·liativa o cures de suport.

Recentment alguns investigadors han publicat diverses dades de CCAs que descriuen la seva complexa biologia molecular i patogenicitat implicant-hi diverses vies moleculars, algunes de les quals són possibles dianes terapèutiques.

Entre les diverses potencials dianes terapèutiques hi trobem la mutació en el gen IDH1/2, la qual es troba en el 20% dels pacients diagnosticats amb CCA. Els tumors amb aquesta mutació generen un *oncometabòlit* anomenat D-(R)-2-hidroxiglutarat (D2HG), responsable de molts dels efectes biològics de les mutacions en IDH1/2 associades al càncer. Aquest oncometabòlit altera el patró epigenètic de les cèl·lules normals (canvis funcionalment rellevants en el genoma que no impliquen canvis en la seqüència de l'ADN, com la metilació), i, per tant, altera la funció cel·lular normal. Encara no es coneix detalladament com la mutació IDH1 afecta l'estructura de la cromatina ni els patrons d'expressió. Per tant, tenim la necessitat d'estudiar en profunditat com les mutacions en IDH1/2 porten a l'alteració de la cromatina en CCA. Per aquest motiu, en aquest projecte analitzem l'epigenoma i el transcriptoma del CCA fent ús de dues línies

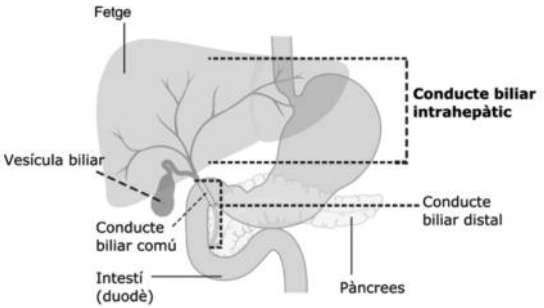


Figura 1. Representació esquemàtica del teixit d'interès (conducte biliar intrahepàtic) i els seus teixits adjacents

cel·lulars i diversos xenògrafts derivats de pacients (PDXs). El nostre principal objectiu és entendre la relació entre la genètica i l'epigenètica de CCA IDH1 mutants i no mutants. Per a assolir el nostre objectiu realitzarem una sèrie d'anàlisis computacionals de diferents tipus de dades que obtindrem utilitzant tècniques capdavanteres de seqüenciació. Aquesta col·lecció de PDXs de CCA és única, i actualment continua en expansió. Finalment, també farem ús dels models de CCA_PDX per a testar diferents inhibidors d'IDH1 i estudiarem la biologia subjacent d'aquest procés per a buscar nous biomarcadors de resposta.

El centre

Abans d'entrar en detall sobre la metodologia i els resultats preliminars d'aquest projecte és important fer un breu resum de les instal·lacions que fan possibles aquests tipus de projectes en els quals s'han d'analitzar milers de dades conjuntament. Les anàlisis computacionals i l'emmagatzemament de dades d'aquest projecte es porten a terme al Barcelona Supercomputing Center (BSC). El centre es va establir l'any 2005 i és el centre nacional de supercomputació a Espanya. Estan especialitzats en computació d'altes prestacions (HPC) i gestionen el MareNostrum, un dels supercomputadors més potents d'Europa, ubicat dins una capella. La recerca al centre es divideix en quatre camps: Ciències Computacionals, Ciències de la Vida, Ciències de la Terra i Aplicacions Computacionals en Ciència i Enginyeria. Però, què és la supercomputació? La supercomputació permet realitzar experiments on se simula el comportament de l'objecte estudiat. Això permet reduir molts

Figura 2. Localització del MareNostrum4. Barcelona Supercomputing Center (BSC)

costos i efectuar experiments que no es podrien fer a la vida real. D'altra banda, els supercomputadors són necessaris també per analitzar grans quantitats de dades, com les que proporcionen les noves plataformes de seqüenciació de genomes i transcriptomes.

Objectius

Ara que ja sabem on és poder dur a terme aquests tipus de projectes, és el moment d'explicar els principals objectius de la meva recerca i mencionar algunes de les anàlisis preliminars fetes fins a la data d'avui.

El nostre projecte el podem dividir en 4 principals propòsits. Primerament, ens centrarem a establir i caracteritzar els PDX de dos tipus de CCA, els que tenen el gen IDH1 mutant i els que no el tenen mutat. Seguidament, crearem un epigenoma de referència d'aquests dos grups de CCA PDXs i analitzarem el seu transcriptoma. Aquestes dades les utilitzarem per a realitzar una sèrie d'anàlisis computacionals integrant totes les dades disponibles per a guanyar coneixement sobre els canvis en l'epigenoma que succeeixen en cadascun dels dos grups de CCA PDXs. En tercer lloc, analitzarem l'eficàcia de diversos tractaments en CCA PDXs amb el gen IDH1 mutat i d'altres CCA PDXs sense mutacions en aquest gen. Finalment, intentarem identificar possibles biomarcadors que podrien predir la resposta dels pacients als diferents tractaments testats i millorar així la seva estratificació.

Materials i mètodes

Per a l'obtenció de la nostra col·lecció de CCA PDXs es van agafar mostres del tumor de pacients de CCA (més del 90% presentant metàstasi al fetge) i es van implantar en ratolins nus. Les alteracions genètiques dels tumors es van analitzar en dos moments diferents, en la mostra fresca de tumor i en els PDXs. L'accessibilitat de l'ADN (ATAC-Seq) es va analitzar en aquest set de CCA PDXs. Aquestes dades les vam processar seguint uns protocols ja establerts per la comunitat científica i finalment vam obtenir una col·lecció de pics d'accessibilitat al llarg dels genomes dels nostres CCA PDXs.

L'anàlisi del transcriptoma també es va realitzar en aquesta col·lecció de mostres i les dades les vam processar seguint un protocol establert en el nostre laboratori. Vam obtenir el recompte dels gens per a cadascun dels CCA PDXs.

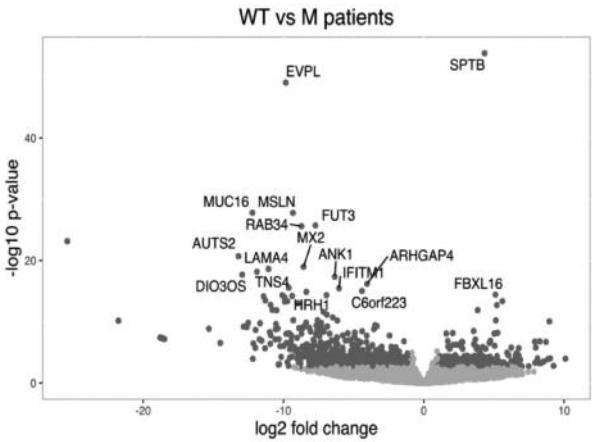
Finalment, es va analitzar l'estat de metilació de 800.000 CpG en aquest conjunt de mostres. El processament d'aquestes dades va ser realitzat per uns col·laboradors i finalment vam obtenir els valors Beta de cada CpG, i les diverses CpG que estan diferencialment metilades entre els dos grups de CCA PDXs (IDH1/2 mutants i els que no tenen aquest gen mutat).
Primerament, vam analitzar la comparació del patró de mutacions entre cada mostra de tumor i el seu corresponent PDX. Seguidament, vam fer algunes anàlisis preliminars que consistien en l'obtenció de gens diferencialment expressats entre els dos grups de CCA PDXs, l'obtenció de pics diferencialment accessibles, CpGs diferencialment metilats i finalment una primera aproximació per a la integració dels diferents tipus de dades disponibles amb un nou paquet de funcions anomenat MOFA+.

Resultats preliminars

Expressió diferencial de gens. Dels gairebé 60.000 gens dels quals vam obtenir dades d'expressió, 888 estan diferencialment expressats entre els PDX amb mutacions al gen IDH1 i els que no tenen mutat aquest gen. En analitzar les vies desregulades vam veure que les vies relacionades amb la reparació de l'ADN estan sobre expressades en els PDX amb mutacions en el gen IDH1. A més, moltes vies involucrades en el desenvolupament i la progressió dels colangiocarcinomes també les hem trobat sobreexpressades en els PDXs amb mutacions en el gen IDH1. D'altra banda, gens relacionats amb les capacitats de cèl·lules mare els trobem menys expressats en els PDXs mutants per IDH1.

Metilació diferencial. Primerament vam analitzar la metilació diferencial dels CpGs individualment. A la literatura trobem informació que lliguen les mutacions en el gen IDH1 amb guanys en la metilació dels CpG, fet que repliquem amb les nostres dades, en què el 66% dels CpG amb metilació diferencial mostren un guany de metilació en els PDXs mutants en IDH1. A més, també hem dut a terme unes anàlisis de DMR (regions de metilació diferencial), on s'analitzen finestres de 2,5 Kbases amb una mitjana de 15 CpGs per regió. En aquesta anàlisi el resultat esperat és encara més evident, un 95% de les regions diferencialment metilades mostren guanys en metilació en els PDXs mutats en IDH1.

Figura 3. Anàlisi d'expressió diferencial entre PDXs amb el gen IDH1 mutat i PDXs amb el gen IDH1 sense mutacions



MOFA+. Per a dur a terme una anàlisi diferencial integrant totes les òmiques disponibles hem fet ús del programa MOFA+. En aquesta anàlisi hem trobat 10 factors que combinant diferents òmiques arriben a explicar col·lectivament entre un 40 i un 80% de la variació en cada tipus d'òmica. El factor número 5 és el que està significativament relacionat amb la mutació en l'IDH1 i està principalment conformat de canvis en la metilació, tal com esperàvem.

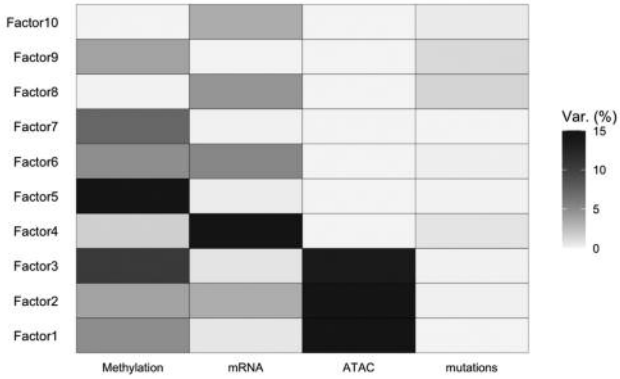


Figura 4. Resultat de l'anàlisi integrant les 4 òmiques disponibles. Percentatge de variació explicada en cada òmica per part de cada factor

Conclusions i impacte de la recerca

Per a detectar enriquiments significatius de vies metabòliques i per a poder estar més segurs dels resultats que hem obtingut necessitem augmentar el nombre de pacients en aquest estudi, fet que s'està realitzant en aquest moment. Finalment el grup d'estudi comptarà amb 12 pacients, dels quals 6 tindran el gen IDH1 mutat.

El més important d'aquest tipus d'estudis és posar en rellevància què aportarem de cara als pacients, quin serà l'impacte real d'aquest projecte un cop finalitzat. Aquest estudi permetrà caracteritzar en profunditat aquest càncer, fet que tindrà un gran impacte en la ràpida detecció i diagnòstic dels pacients que podrien patir potencialment de CCA.

A més, proporcionarem noves possibles dianes per al desenvolupament de teràpies dirigides. Ara mateix necessitem l'aparició de noves teràpies i d'estudis que proporcionin estratègies de reaprofitament de fàrmacs per a fer front al CCA.

D'altra banda, necessitem definir les poblacions *clínicament rellevants* entre aquests grups de pacients (tenint en compte les característiques i alteracions de cada individu) per a poder canviar dramàticament la gestió clínica d'aquesta malaltia. Amb aquests objectius en ment, el nostre projecte ajudarà no només a identificar les potencials subpoblacions d'estudi, sinó també a explorar mecanismes de carcinogènesi i vies tumorals associades a aquestes malalties per tal de definir teràpies dirigides més efectives. En aquest sentit, els fàrmacs que s'han de provar seran agents reutilitzats amb altres indicacions (agents individuals o combinacions) o nous compostos específics, de manera que es puguin desenvolupar noves teràpies dirigides per als CCA.