



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00079

(22) Data de depozit: 09/02/2018

(41) Data publicării cererii:
30/08/2019 BOPI nr. 8/2019

(71) Solicitant:
• SEICEAN ION-RADU, STR.CLOȘCA
NR.15, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• SEICEAN ION-RADU, STR.CLOȘCA
NR.15, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) METODA DE ANALIZĂ BIOINFORMATICĂ NONINVAZIVĂ
A BIOMARKERILOR IMPLICAȚI ÎN CARCINOGENEZA
PANCREATICĂ

(57) Rezumat:

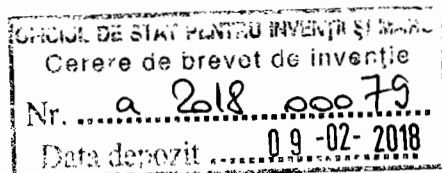
Invenția se referă la o metodă de analiză bioinformatică noninvasivă a biomarkerilor implicați în carcinogeneza pancreatică. Metoda conform invenției constă în recoltarea intraoperatorie de țesut pancreatic tumoral versus adiacent sănătos în perechi, înghețarea speciemenelor tisulare la -80°C, fixarea în parafină a probelor tisulare și colorație hematoxilină eozină, pentru confirmarea malignității, analiza genomică și proteomică, suprapu-

nerea listelor de gene și proteine exprimate diferențiat, selecția panelului de biomarkeri semnătură ai cancerului pancreatic, validarea prin imunohistochimie, corelare cu parametrii clinici și de supraviețuire, pentru depistarea precoce a neoplaziei.

Revendicări: 1

Figuri: 1





Metoda de analiză bioinformatică noninvazivă a biomarkerilor implicați în carcinogeneza pancreatică

Invenția se referă la implementarea unui algoritm de identificare a biomarkerilor implicați în oncogeneza pancreatică. Metoda presupune combinarea tehnicilor de genomică și proteomică în cadrul unei analize bioinformatică, din care să rezulte suprapuneri între diversele seturi de gene și proteine identificabile ca fiind mutate. Prin înscrierea acestora în căile de semnalizare genetice cunoscute, se identifică posibili biomarkeri ai bolii, dar și mecanisme patogenetice care vor constitui viitoarele ținte terapeutice.

Cancerul de pancreas reprezintă a cincea cauză de mortalitate prin cancer și se estimează că în anul 2020 va ocupa locul trei în această ierarhie. Încadrarea pacientului în această boală este dificilă din cauza dispoziției profunde a acestui organ, a expresiei clinice abia în faze tardive de locală și a limitelor explorărilor imagistice transabdominale. De aceea s-a sperat în identificarea unor biomarkeri care să permită screeningul subiecților pentru această boală.

Multe cercetări au fost realizate în domeniul modificărilor genetice, dar rezultatele diferitelor studii puse în comun au fost dezamăgitoare din cauza variabilității expresiei genetice. Studiile realizate pe genomul uman au ajuns la concluzia că, la 24 de pacienți cu cancer de pancreas existau modificări genetice care implicau 12 căi patogenetice diferite (Jones et al. Nature 2008). Din acest motiv entuziasmul pentru modificările genetice singure s-a diminuat și atenția cercetătorilor s-a îndreptat spre nivelul proteic din țesutul pancreatic bolnav. În același scop sunt cunoscute platformele tehnologice de proteomică, care s-au dezvoltat cu rapiditate în ultimii ani, în privința vitezei de analiză (spectrometria de masă), lărgirii spectrului de acoperire a proteinelor și proteomica țintită (SRM/MRM). Testele tip ELISA au demonstrat de asemenea aplicabilitate clinică, fiind precursorul tehnicilor de diagnostic multiparametric, de tip microarray [Borrebaeck Carl A K, Nature reviews 2017]. Acestea sunt însă limitate de numărul relativ redus de anticorpi caracterizați până în prezent.

Provocarea actuală constă în identificarea unui set de biomarkeri, așa numiții „biomarkeri semnatură” pentru precizia analitică și extragerea multitudinii de informații din probele biologice. Sunt cunoscute tehnicile de genomică reprezentând promotoarele utilizării conceptului de „biomarkeri semnatură” prin ușurința efectuării profilării transcriptomice. Conceptul a fost aplicat în cancerul mamar, unde o semnătură a 70 de gene în tumorile sporadice au fost predictive pentru prognosticul nefavorabil cu o acuratețe de 83%, fapt care a influențat decizia privind chimioterapia adjuvantă [Cusumano, P. G. et al. European inter-institutional impact study of MammaPrint. *Breast* 23, 423–428 (2014)].

Combinarea genomicii cu proteomica a fost studiată pentru prima dată în încercarea de a ameliora performanța diagnosticării cancerului de prostata. Un studiu recent a utilizat o combinație de markeri genetici (232 SNPs) și 6 proteine plasmatică, iar 5 variabile clinice standard au fost testate. Această abordare în comparație cu nivelul PSA a demonstrat o creștere a performanței diagnostice a tumorilor cu un scor Gleason de minim 7 (ROC AUC=0.74).

Tehnicile de identificare de „biomarkeri semnătură” au fost aplicate și în cancerul pancreatic, unde necesitatea detecției precoce a neoplaziei este subliniată de rata mortalității care o depășește pe cea a cancerului mamar, având o supraviețuire la 5 ani de numai 5-6%. Un studiu retrospectiv în rândul pacienților cu adenocarcinom pancreatic în stadiu tardiv a identificat 3 biomarkeri, respectiv CA 19-9, ICAM-1 și osteoprotegerina prin tehnica bead-based antibody array, care au discriminat acești pacienți de cei sănătoși cu o valoare a ROC-AUC de 0.93 [Brand, R. E. *et al.* Serum biomarker panels for the detection of pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**, 805–816 (2011)]. Un alt studiu însă a infirmat valoarea pre-diagnostică a acestor biomarkeri de evaluare a riscului neoplazic.

Până în prezent nu există studii care să combine metodele de proteomică și genomică în studiile privitoare la cancerul pancreatic, întrucât prin metodele exclusiv proteomice sau genetice nu a putut fi stabilit un set de biomarkeri semnătură pentru evaluarea riscului neoplazic în oncogenetica pancreatică.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este implementarea unei strategii prin care sunt acoperite numeroasele căi de semnalizare implicate în oncogeneza pancreatică.

Metoda de analiză bioinformatică noninvazivă a biomarkerilor implicați în carcinogeneza pancreatică înlătură dezavantajele menționate anterior prin aceea că este alcătuită din următoarele operații în ordine succesivă:

- recoltare intraoperatorie de țesut pancreatic tumoral versus adiacent sănătos în perechi;
- înghețarea specimenelor tisulare la -80C;
- fixare în parafină a piesei operatorii restante și colorație hematoxilină eozină pentru confirmarea malignității;

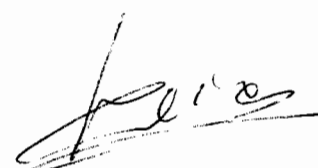
- analiza genomică;

- extragerea ARN și hibridizare;
- aprecierea calității ARN;
- prepararea și hibridizarea ADN;
- marcarea cADN;
- procesarea imaginii;
- importarea datelor;
- analiza statistica a datelor;
- lista gene cu expresie diferențiată;

- analiza proteomică;

- extracția proteinelor;
- obținerea extractelor peptidice ;
- analiza LC-ESI-MS/MS;
- analiza statistica a datelor;
- lista proteine cu abundență diferențiată;

- cuantificare ARN tisular;



- suprapunerea listelor de gene si proteine exprimate diferențiat;
- selecția panelului de biomarkeri semnătură ai cancerului pancreatic;
- validare prin Imunohistochimie; corelare cu parametri clinici si de supraviețuire.

Algoritmul metodei de analiză bioinformatică noninvazivă a biomarkerilor implicați în carcinogeneza pancreatică este prezentat în Figura 1.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- simplificarea tehnicii de lucru ;
- depistare precoce a pacienților cu tumori mai agresive, în consecință creșterea supraviețuirii prin aplicarea precoce a metodelor terapeutice ;
- creerea unui panel de biomarkeri care să permită stabilirea unui prognostic pentru pacienții cu cancer pancreatic și să conducă spre o terapie chimioterapică mai agresivă ;
- costuri mai reduse.

În continuare se dă un exemplu de realizare al invenției.

Izolarea și hibridizarea ARN s-a realizat pe platforma microarray Agilent (Agilent Technologies) . Extragerea ARN s-a realizat din fragmente de tumoră înghețate folosind Allprep Kits (Qiagen) și cuantificarea s-a realizat cu un spectrofotometru nanodrop (ThermoScientific). Calitatea ARNului s-a analizat cu Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). ARN a fost selectat din formele hibridizate folosind numărul de integritate al ARNului și inspecția ARN ribosomal 18S și 28S. Analiza probelor a fost realizată încucișat. Un microgram de ARN s-a folosit ca matriță pentru prepararea și hibridizarea ADN cu ajutorul Agilent 4644 K whole human genome arrays (Agilent Technologies). cDNA a fost marcat cu Cy5-dUTP și un control de referință (Stratagene) a fost marcat cu Cy3-dUTP folosind kitul Agilent de amplificare liniară (Agilent Technologies). Hibridizarea ulterioară s-a realizat cu Agilent 4644 K whole human genome arrays (Agilent Technologies). Grila obținută a fost spălată și scanată folosind un scanner Agilent (Agilent Technologies).

În experiența noastră, în cancerul de pancreas am identificat 443 de gene exprimate diferit față de țesutul normal, dintre care 42 supraexprimate și 401 subexprimate.

Analiza proteomului pancreatic tisular a fost descrisă detaliat în lucrarea C. Iuga et al. (Proteomics, 2014).

Extracția proteinelor se realizează pe aproximativ 20 mg de țesut înghețat în azot lichid omogenizat cu ajutorul unei mori cu bile. Pulberea obținută se solubilizează, vortexează și ultrasoniază pe baie de gheață pentru ruperea membranelor celulare. Soluția extractivă se centrifughează la rece și se colectează supernatantul. Se determină concentrația proteinelor iar extractele se depozitează la -80°C până la momentul prelucrării pentru analiză.

Un volum de probă ce conține 4μg de proteine se diluează cu bicarbonat de amoniu 20mM, până la o concentrație finală de uree mai mică de 1M. În urma reducerii cu dithiothreitol DTT 2,5mM și alchilare cu iodoacetamidă 10 mM, probele se împart în două volume egale (2 μg

proteine/replicat tehnic) și se supun tripsinării timp de 20 de ore. Digestia enzimatică se oprește cu acid acetic la o concentrație finală de 1%. Amestecul de peptide se desalefiază și purifică pe fază inversă C-18 (ZipTip-C18 Millipore Corporation, Billerica, MA). Peptidele se eluază cu un amestec de solvenți, se concentrează sub vaccum și se resuspendă în 20 μ L solvent.

Șase microlitri din această soluție de peptide se utilizează pentru analiza LC-ESI-MS utilizând tehnica de cuantificare relativă a proteinelor din țesut tumoral vs. țesut normal pentru fiecare pacient luat în studiu (gel-free shotgun proteomics).


Pentru identificarea peptidelor/proteinelor separate prin LC-MS/MS, se utilizează programul Rosetta Elucidator. Acesta permite identificarea de proteine unice cu FDR sub 1% la nivel de peptide (false discovery rate) 1 %.

În experiența noastră, s-au identificat 996 de proteine supra sau subexprimate față de țesutul adiacent normal. Numărul de proteine identificate este comparabil cu cel raportat în studii similare (Takadate, T et al., Int. J. Cancer, 2013). În evaluările ulterioare au fost luate în studiu un număr de 488 proteine identificate cu cel puțin două peptide. Într-o primă etapă a fost folosit programul PANTHER pentru a obține informații referitoare la funcțiile celulare îndeplinite de proteinele luate în studiu. Rezultatele acestei analize au arătat că aceste 488 proteine ar putea fi implicate în 113 proceselor biologice, categoriile principale fiind procesele metabolice (31 proteine, 63.9 % din întreaga listă), procesele sistemului imunitar (96, 19,7 %), transport celular (96, 19,7 %), ca răspuns la stimuli (64, 13.1 %), procesele metabolice ale carbohidraților (59, 12,1 %) și transportul proteinelor (57, 11.7%).

Semnificația diferențelor la nivel proteic între țesutul normal versus tumoral a fost testată cu ajutorul testului t (a two-sided, two sample t test) care a evidențiat 99 proteine modificate semnificativ (34 nivel mai mare, 65 nivel mai mic) în țesutul tumoral comparativ cu cel normal (≥ 1.3 fold change).

Până acum accentul a fost pus pe metode separate de genomică sau proteomică. Prin combinarea celor două tehnici se identifică un set complex de biomarkeri țintă, validați ulterior prin imunohistochimie. În studiile noastre am identificat 16 proteine și gene modificate concomitent în țesutul de cancer pancreatic față de țesutul normal, cu rol de biomarkeri tumorali cu rol prognostic.

Validarea rezultatelor obținute, pentru a certifica rolul de biomarker, se verifică prin imunohistochimie. Specimenele înglobate în parafină provenind de la același pacient de la care s-a realizat analiza mostrei înghețate, se deparafinează, se tratează termic cu citrat (pH 6, 95°C, 20 min), urmată de blocare endogenă peroxidazică. Antigenii rezultați se incubează cu autoanticorpii primary. Reacția se vizualizează folosind the Novo Link Max Polymer kit (Novocastra), și o soluție de 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ca și colorant. Ulterior, secțiunile de colorează cu hematoxilină, se deshidratează și se evaluează la microscop. Astfel se unifică pentru prima dată datele de genomică cu cele de proteomică obținute de la același grup de cancere pancreatice și se identifică mecanismele implicate în carcinogeneza adenocarcinomului pancreatic, ca de exemplu: reglarea proceselor imune, formarea citoscheletului, metabolismul oxidativ și metabolismul proteic.



Deoarece nu toate modificările genetice din cancerul pancreatic au expresie proteică, metoda prezentată identifică acele modificări genetice care devin în practică subexprimate sau supraexprimate în proteine. Modificările genomice și proteomice o dată identificate, sub forma unei 'amprente biologice" permit o analiză a corelației între abundența/lipsa unor proteine și durata de supraviețuire a pacienților cu cancer pancreatic. Datele obținute prin suprapunerea tehnicilor de analiză genomică și proteomică au fost validate prin tehnici de imunohistochimie.



Revendicare:

1. Metoda de analiza bioinformatica noninvaziva a biomarkerilor implicati in carcinogeneza pancreatică caracterizată prin aceea ca este alcătuită din următoarele operații in ordine succesivă:

- recoltare intraoperatorie de țesut pancreatic tumoral versus adiacent sănătos în perechi;
- înghețarea specișenelor tisulare la -80C;
- fixare în parafină a piesei operatorii restante și colorație hematoxilină eozină pentru confirmarea malignității;

- analiza genomică;

- extragerea ARN și hibridizare;
- aprecierea calității ARN;
- prepararea și hibridizarea ADN;
- marcarea cADN;
- procesarea imaginii;
- importarea datelor;
- analiza statistica a datelor;
- lista gene cu expresie diferențiată;

- cuantificare ARN tisular;

- analiza proteomică;

- extracția proteinelor;
- obținerea extractelor peptidice ;
- analiza LC-ESI-MS/MS;
- analiza statistica a datelor;
- lista proteine cu abundență diferențiată;
- suprapunerea listelor de gene și proteine exprimate diferențiat;
- selecția panelului de biomarkeri semnătură ai cancerului pancreatic;
- validare prin Imunohistochimie; corelare cu parametri clinici și de supraviețuire.



Figura 1.

