

**18. Rezumatul activității și a rezultatelor obținute în proiect perioada 2020-2023
(obligatoriu)**

**Studiul comparativ al particularităților genomice, imunologice și funcționale ale
carcinoamelor cu celule scuamoase în cinci localizări anatomice**

Cifra proiectului 20.80009.80007.02

Carcinoamele cu celule scuamoase (SCC) sunt cele mai frecvente tumori solide umane, care decurg din epiteliul tractului aerodigestiv și genito-urinar. SCC din diferite părți ale corpului au unele proprietăți comune datorită caracteristicilor lor histopatologice. Scopul acestui proiect a fost studiul comparativ al carcinomului scuamos de cap și gât (HNSCC), carcinomului scuamos pulmonar (LSCC), carcinomului scuamos cervical (CSCC), carcinomului scuamos de esofag (ESCC) și carcinomului scuamos de piele (SSCC) în vederea eficientizării screening-ului, diagnosticului precoce, strategiilor de tratament și managementului acestor tipuri de cancer.

Luând în considerare importanța inerentă a biobăncilor în cercetările cancerului, pe parcursul realizării proiectului a fost creată o biobancă în IMSP Institutul Oncologic în care se stochează diverse probe biologice, cum ar fi țesut tumoral proaspăt, țesut normal histologic adiacent tumorii (NAT), sânge integru, plasmă sanguină ș.a. recoltate de la pacienții diagnosticați primar cu cele 5 tipuri de SCC incluse în studiu. Probele biologice recoltate au fost utilizate pentru realizarea obiectivelor prezentului studiu, dar pot servi și ca biomaterial pentru studii ulterioare ce vizează oncologia de precizie.

Analiza comprehensivă a seturilor de date descărcate de pe cBioPortal, efectuată cu ajutorul limbajelor de programare R și Python ne-a permis să identificăm o gamă de biomarkeri importanți în apariția și dezvoltarea carcinoamelor cu celule scuamoase (SCC). În baza frecvenței acestora, patogenității și căilor de semnalizare implicate, pentru testarea în laborator au fost selectați în calitate de markeri moleculari câte 3 mutații în următoarele gene: TP53, EGFR și PIK3CA. În ce privește markerii de expresie au fost cercetate genele TP53, WEE1, SLC7A11 și mTOR. Pentru aprecierea statutului imun al tumorii s-au testat markerii proteici PD-1 și PD-L1 iar ca markeri de microbiom— 7 specii de bacterii pentru HNSCC și 8 specii și genuri pentru CSCC. De asemenea, a fost investigată frecvența infecțiilor cu oncovirusul HPV în HNSCC, CSCC și LSCC. Pe lângă acești markeri a fost investigată metilarea globală a ADN-ului ca mecanism de reglare a expresiei genelor. Toți markerii menționați au fost testați *in vitro*.

S-au evidențiat unele tipare comune la nivel molecular cum ar fi scăderea expresiei genei TP53 în probele de HNSCC, LSCC și SSCC. TP53 este o genă supresoare tumorală care reglează diviziunea celulară, împiedicând celulele să crească și să se divizeze necontrolat. Un alt aspect comun este prevalența mutației TP53:c.818G>A, comparativ cu celelalte mutații testate, în LSCC, ESCC și SSCC. În același timp se observă și unele diferențe cum ar fi prevalența mutației TP53:c.524G>A în HNSCC sau valoarea crescută a metilării globale a ADN-ului în CSCC. S-a observat și o frecvență crescută a infecției cu HPV la pacienții diagnosticați cu carcinom scuamos de orofaringe (OPSCC). Integrarea datelor a evidențiat că în cazurile HNSCC HPV+ rata de apariție a celor trei mutații TP53 testate este mai mică comparativ cu cazurile HPV- (18,75% vs 28,71%) iar mutațiile duble au apărut doar în cazurile HNSCC HPV-.

Rezultatele obținute pe parcursul realizării proiectului au fost utilizate pentru formularea recomandărilor practice ce vizează includerea în Protocolul Clinic Național PCN160 „Cancerul

cavității bucale” a testării IHC și RT-PCR pentru subtipizarea OPSCC în HPV+ și HPV-. Clasificarea respectivă influențează deciziile de tratament. De asemenea am recomandat testarea mutațiilor TP53 germinale la pacienții cu unele forme de SCC cu scopul modificării strategiilor de tratament și diagnosticul precoce de cancer a membrilor familiilor.

Comparative study of genomic, immunological and functional features of squamous cell carcinomas in five anatomical locations
cipher 20.80009.80007.02

Squamous cell carcinomas (SCCs) are the most common human solid tumors arising from the epithelium of the aerodigestive and genitourinary tracts. SCCs from different parts of the body have some common properties due to their histopathological features. The aim of this project was the comparative study of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), lung squamous cell carcinoma (LSCC), cervical squamous cell carcinoma (CSCC), esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and squamous cell carcinoma of the skin (SSCC) in order to improve screening, early diagnosis, treatment strategies and management of these types of cancer.

Considering the inherent importance of biobanks in cancer research, during the realization of the project in the IMSP Institute of Oncology was created a biobank in which various biological samples are stored, such as fresh tumor tissue, normal histological tissue adjacent to the tumor (NAT), whole blood, blood plasma, etc. The samples were collected from patients primarily diagnosed with the 5 types of SCC included in the study. The collected biological samples were used to achieve the objectives of this study and they can also serve as biomaterial for further studies in precision oncology.

Comprehensive analysis of data sets downloaded from cBioPortal, performed using R and Python programming languages, allowed us to identify a range of important biomarkers in the occurrence and development of squamous cell carcinomas (SCC). Based on their frequency, pathogenicity and signaling pathways involved, there were selected as molecular markers for laboratory testing 3 mutations in each of the following genes: TP53, EGFR and PIK3CA. Regarding the expression markers, TP53, WEE1, SLC7A11 and mTOR genes were investigated. In order to assess the immune status of the tumor were tested the protein markers PD-1 and PD-L1, while as microbiome markers were studied 7 species of bacteria for HNSCC and 8 species and genera for CSCC. The frequency of HPV oncovirus infections in HNSCC, CSCC, and LSCC was also investigated. In addition to these markers, global DNA methylation was investigated as a mechanism of gene expression regulation. All mentioned markers were tested *in vitro*.

Some common molecular patterns such as decreased TP53 gene expression in HNSCC, LSCC and SSCC samples were revealed. TP53 is a tumor suppressor gene that regulates cell division, preventing cells from growing and dividing uncontrollably. Another common pattern is the prevalence of the TP53:c.818G>A mutation, compared to the other mutations tested, in LSCC, ESCC and SSCC. At the same time, some differences are also observed, such as the prevalence of the TP53:c.524G>A mutation in HNSCC or the increased value of global DNA methylation in CSCC. An increased frequency of HPV infection was also observed in patients diagnosed with oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC). Data integration revealed that in HNSCC HPV+ cases the occurrence rate of the three tested TP53 mutations is lower compared to HPV- cases (18.75% vs 28.71%) and double mutations appeared only in HNSCC HPV- cases.

The results obtained during the realization of the project were used for the formulation of practical recommendations that target the inclusion in the National Clinical Protocol PCN160 "Cancer of the oral cavity" of IHC and RT-PCR testing for the subtyping of OPSCC in HPV+ and HPV-. This classification influences treatment decisions. We also recommended the testing of germline TP53 mutations in patients with some forms of SCC with the aim of changing treatment strategies and detecting early cancer diagnosis of family members.