

Samenvatting en algemene conclusie

Sinds hun introductie zijn medicijnen een essentieel onderdeel van ons dagelijkse leven geworden. Inmiddels zijn er al duizenden medicijnen ontwikkeld die geleid hebben tot een significante verbetering van patiëntresultaten. Echter, één van de grootste uitdagingen bij farmacotherapie is de variabiliteit in geneesmiddelrespons tussen patiënten; zowel de effectiviteit van medicijnen als hun veiligheidsprofiel verschillen aanzienlijk over de populatie. Dit heeft geleid tot het ontstaan van nieuwe benaderingen in de farmaceutische gezondheidszorg. Twee opvallende voorbeelden zijn de evolutie naar meer gepersonaliseerde geneeskunde en meer gerichte therapieën. Deze nieuwe benaderingen zijn beide vooruitgegaan door het benutten van genetische inzichten uit DNA sequentiegegevens. Het unieke genetische profiel van een patiënt kan helpen bij het voorschrijven van op maat gemaakte behandelingen voor een specifiek individu, met het oog op effectievere, efficiëntere en patiëntgerichte gezondheidszorg. Dit is het onderwerp van onderzoek in het veld van farmacogenetica (PGx), dat een hoeksteen vormt van gepersonaliseerde geneeskunde. Bovendien kan het benutten van antilichaam-DNA-sequenties van herstellende of geïmmuniseerde personen ook de ontwikkeling van volledig humane, gerichte monoklonaal antilichaam (mAb)-therapieën vergemakkelijken. Ondanks het potentieel van deze benaderingen, kampen huidige methoden in zowel PGx als therapeutische mAb-ontwikkeling met beperkingen en kunnen ze baat hebben bij verdere optimalisatie. Daarom heeft deze dissertatie twee primaire onderzoeksdoelen gesteld om deze kansen aan te pakken. Het eerste doel van deze dissertatie was het onderzoeken van verschillende alternatieve benaderingen voor het verkrijgen van meer volledige en gefaseerde gegevens om PGx-genotypering te verbeteren. Het tweede doel was het verkennen van een nieuwe workflow om huidige problemen met de screening en de generatie van antilichaamsequenties vanuit individuele B cellen in de context van mAb-ontwikkeling aan te pakken.

Deel A van deze dissertatie richtte zich op het eerste doel. In de afgelopen decennia is het belang van gepersonaliseerde geneeskunde steeds duidelijker geworden. Hiermee direct verbonden is de behoefte aan nauwkeurige genotyperingsmethoden om het farmacogenetisch profiel van patiënten te bepalen. Hoewel huidige genotyperingsmethoden redelijk robuust presteren, ondervinden ze problemen met complexe genen en schieten ze tekort in het identificeren van onbekende varianten en het definiëren van volledige haplotypes. Veel klinisch relevante farmacogenen, zoals *CYP2D6*, komen samen voor met pseudogenen die sequentiehomologie vertonen, wat uitdagingen met zich meebrengt voor genotypering. Traditionele methoden lopen het risico om zowel sequenties van de pseudogenen als van de functionele genen te detecteren, wat kan leiden tot fouten in de mapping van de genen, lage variantdetectiepercentages en een hoog aantal vals positieven. Om dit probleem te verhelpen kunnen sequenceringsmethoden die in staat zijn om de sequentie van een volledig gen te bepalen

nuttig zijn. Aangezien de functie van een gen bovendien wordt bepaald door de combinatie van alle varianten per allel, kan het belang van sequenering van de volledige, gefaseerde allelen van een gen voor nauwkeurige fenotypevoorspellingen niet worden genegeerd. Daarom hebben **hoofdstukken 3 en 4** van deze dissertatie alternatieve genotyperingsmethoden beoordeeld voor verschillende farmacogenen, inclusief het complexe *CYP2D6*-gen. Deze methodes zijn gericht op het verkrijgen van nauwkeurige, gefaseerde sequenties van volledige genen door gebruik te maken van gerichte sequenering technologieën op basis van gelinkte en lange reads.

Hoofdstuk 3 had als doel volledige allel-specifieke sequenties van *CYP2D6* te genereren door een gerichte amplificatievrije sequenceringsmethode voor lange reads te optimaliseren en een verbeterde analysepijplijn te ontwikkelen. Aanrijking van het gen van interesse (target) werd verkregen door toepassing van de nanopore Cas9 targeted sequencing (nCATS) strategie, of nCATS gecombineerd met adaptieve sequenering (AS) op 5 µg DNA van drie goed gedefinieerde cellijnen. Sequenering van de lange reads werd uitgevoerd gebruik makende van een ONT GridION apparaat, gevolgd door data-analyse met de ontwikkelde CoLoRGen pijplijn, met als doel zowel grote structurele varianten als kleine varianten tegelijkertijd te detecteren. Het gebruik van de AS-software in aanvulling op de nCATS-verrijking resulteerde niet consequent in een hogere on-target diepte, waardoor het voordeel in deze context beperkt is. De nCATS-strategie op zichzelf bereikte ook niet de verwachte 100X diepte, wat waarschijnlijk te wijten was aan de aanwezigheid van sequeneerbaar achtergrond-DNA en de aanwezigheid van niet-sequeneerbare DNA-moleculen zonder gekoppelde adapter op de flow cell. Deze lage diepte on-target is een van de belangrijkste nadelen van de nCATS-verrijkingmethode in de PGx-context. Echter, hoewel de nCATS-verrijking suboptimaal bleek, was de nCATS-CoLoRGen methode in staat om nauwkeurige genotypering voor het complexe *CYP2D6*-gen te bekomen. Wanneer de minimale diepte van 16X voor elk allel en drie reads op de breekpunten van structurele varianten werden verkregen, konden correcte ster-allelen worden toegewezen aan *CYP2D6* en de *CYP2D6-CYP2D7* hybride voor de drie cel lijnen. Bovendien leverde de CoLoRGen pijplijn direct bewijs van de aanwezigheid van *CYP2D6-CYP2D7* grote structurele varianten en ook kleinere varianten—die onopgemerkt blijven bij andere huidige methoden—door het genereren van een volledige consensussequentie van de genen. Door het mogelijk te maken om nieuwe mutaties te detecteren en te faseren in aanvulling op gekende grote structurele en kleine varianten, opent deze genotyperingmethode de mogelijkheid om nauwkeurigere voorspellingen van de functie van een gen te maken, wat eveneens van toepassing zou moeten zijn voor andere genen. Echter, de praktische toepassing van deze assay wordt belemmerd door de inherente beperkingen van de geselecteerde verrijkingstrategieën, resulterend in lage on-target sequentiediepten en de noodzaak om een kostbare flow cell per patiënt te gebruiken.

Hoofdstuk 4 beoordeelde het potentieel van een sequentiebenadering op basis van gelinkte reads, genaamd targeted locus amplificatie (TLA), op vlak van nauwkeurig faseren. Hiervoor werden vier farmacogenen, *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP1A2*, en *BRCA1*, verrijkt met verschillende generieke primerparen en gesequeneerd met zowel Illumina als Nanopore sequencing technologieën. De vier belangrijkste conclusies kunnen als volgt worden samengevat: i) vanwege de inherente nadelen van TLA, werden drie van de vier genen niet volledig verkregen met deze sequenceringsmethoden; ii) dit resulteerde in onvolledige genotypes voor deze genen, waarbij slechts een klein deel van de varianten correct kon worden gedetecteerd en gefaseerd in vergelijking met referentiesequenties; iii) over het algemeen was variantdetectie nauwkeuriger in de Illumina datasets, terwijl nauwkeuriger faseren werd verkregen met Nanopore sequeneren; en iv) alleen voor het complexe *CYP2D6*-gen verbeterden de lange Nanopore-reads de variantdetectie in vergelijking met Illumina sequeneren, wat het enige correcte haplotype opleverde. Er kan geconcludeerd worden dat, vanwege de inherente nadelen, de TLA workflow als een ongeschikte methode wordt beschouwd voor betrouwbare genotypering en faseren van belangrijke farmacogenen. Hoewel patiënt-specifiek primerontwerp gebaseerd op voorafgaande kennis van heterozygote variant-posities deze resultaten kan verbeteren, compliceert dit serieus het proces en verhoogt het de benodigde kosten en tijdverplichtingen, waardoor de toepassing van TLA als een algemene PGx-methode onpraktisch wordt.

De bevindingen in **hoofdstukken 3** en **4** van deze dissertatie suggereren dat, hoewel mogelijk nuttig in andere contexten, de onderzochte technologieën niet voldoende verfijnd zijn voor nauwkeurige, kosteneffectieve PGx-testen. Desalniettemin, gezien de aanhoudende waarde van sequencing technologieën op basis van lange reads door hun vermogen om volledige en gefaseerde PGx-genotypering te bieden, blijft dit een veelbelovende methode om het veld van PGx vooruit te helpen. Vooral omdat Nanopore sequencing nog steeds een relatief nieuwe methode is, die voortdurend verbetert en in kosten afneemt, behoudt deze technologie nog steeds aanzienlijk potentieel voor kosteneffectieve PGx-genotypering in de toekomst, wat mogelijk kan leiden tot nauwkeurigere voorspellingen van de functie van farmacogenen.

Deel B richtte zich op het tweede onderzoeksdoel door een nieuwe workflow te verkennen voor snelle en high-throughput screening en antilichaamsequentie-analyse van individuele B-cellen in de context van mAb-ontwikkeling. Door de jaren heen zijn mAbs steeds belangrijker geworden voor een breed scala aan toepassingen. Hun rol als therapeutische middelen groeit exponentieel vanwege hun zeer gerichte aard, waardoor de kans op bijwerkingen wordt beperkt. Echter, vaak gebruikte technologieën voor mAb-ontwikkeling bevatten tijdrovende screeningprocessen, die de snelle ontwikkeling van nieuwe mAb-therapeutica in urgente situaties zoals de COVID-19-pandemie belemmeren. De nieuwere single B-cel technologieën worden sinds

recent meer gebruikt in mAb-onderzoek, aangezien ze een snellere en high-throughput screening van de antigeenspecificiteit van menselijke B-cellen mogelijk maken om uiteindelijk volledig humane mAbs te genereren met behulp van hun antilichaamsequentie. **Hoofdstuk 6** had als doel te verifiëren of een innovatieve methode enkele van de nadelen van beschikbare screeningsmethoden kan overwinnen en een gelijkwaardig of zelfs beter alternatief voor screening en analyse van individuele B cellen kan blijken te zijn. De kracht van de methode ligt in het ontwerp van een continue workflow voor de stappen van het verkrijgen van individuele B-cellen, screening van antilichaamsecretie, visuele inspectie en isolatie van B-cellen van interesse, en identificatie van hun antilichaamsequentie. Door daarnaast kleine well volumes te gebruiken en 6,400 wells in een enkele microwell-chip te combineren, biedt deze methode een snel en high-throughput systeem voor de screening en analyse van individuele menselijke B-cellen. Aangezien B-cellen afkomstig uit bloed van patiënten opmerkelijk kortlevend en moeilijk te onderzoeken zijn *ex-vivo*, bieden de kleine well volumes en de snelle workflow aanzienlijke voordelen in deze context. Bovendien werden kweekomstandigheden en RT-PCR-protocollen verder geoptimaliseerd om met succes antilichaam-DNA-sequenties te verkrijgen uit individuele B-cellen van interesse. Dit resulteerde in de identificatie van complementaire V_H - en V_L -DNA-paren van 43% van de geïsoleerde B-cellen, vergelijkbaar met behaalde efficiënties in bestaande protocollen. De volledige workflow, van bloedafname tot detectie van antilichaamsequenties, kon met succes worden uitgevoerd in een tijdsperiode van ongeveer 1 dag.

Bovendien werd het potentieel van het nieuwe platform voor het screenen van hybridoma's ook geëvalueerd, gezien de hybridoma-technologie nog steeds veel gebruikt wordt voor mAb-ontwikkeling maar te kampen heeft met langdurige screeningstappen. De workflow bleek in staat om individuele hybridoma's te sorteren, screenen en isoleren op een high-throughput manier. Door deze processen te beperken tot ongeveer 1 dag, toont deze methode een aanzienlijke verbetering ten opzichte van de 7–10 dagen die nodig zijn per screening voor de traditionele aanpak met beperkende seriële verdunning en herhaaldelijke screening door ELISA. Deze resultaten benadrukken het potentieel en de voordelen van deze workflow voor antilichaamscreening en analyse van individuele B-cellen. Daarnaast heeft de workflow een breed translationeel potentieel voor andere celtypen of zelfs andere immunologische assays. Desondanks bevindt deze technologie zich nog in de experimentele fase en vereist verdere verfijning en validatie voor praktische toepassingen. Met verdere optimalisatie zullen dergelijke high-throughput single-cel technologieën de ontwikkeling van mAbs ingrijpend veranderen in de toekomst door de ontdekking van uiterst effectieve therapeutische antilichamen mogelijk te maken met ongekennde snelheid.

Kortom, deze dissertatie draagt bij aan twee snel evoluerende domeinen van farmaceutische gezondheidszorg. Door het veelbelovend potentieel van alternatieve methoden in de onderzoeksvelden van PGx en mAb-ontwikkeling aan te tonen, zijn deze studies het startpunt voor interessant nieuw onderzoek in beide velden. Op het gebied van PGx bieden gerichte sequencerende technologieën de belofte voor nauwkeurigere genotypering, met name van complexe genen, wat uiteindelijk zal leiden tot betere voorspellingen van genfuncties. Daarnaast zou het veld van mAb-ontwikkeling baat kunnen hebben van technologieën die het mAb-ontwikkelingsproces kunnen versnellen en in staat zijn om antilichaamsequenties van individuele B-cellen op een high-throughput manier te verkrijgen. Met deze dissertatie zijn dus enkele belangrijke stappen gezet op weg naar een meer geïndividualiseerde en gerichte benadering van patiëntenzorg, die zullen helpen om de gezondheidszorg van de nabije toekomst te verbeteren.