

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL DE BIOCHIMIE ȘI FARMACOLOGIE

MIHALA A. ADRIAN



# TEZĂ DE DOCTORAT

MARKERI MOLECULARI AI STRUCTURII  
ȘI EXPRESIEI GENICE ÎN CANCER

REZUMAT

Conducător Științific  
Prof. Univ. Dr. ANGHEL ANDREI

Timișoara  
2016

# CUPRINS

Lista lucrărilor publicate .....	V
Lista abrevierilor.....	VI
Indexul Figurilor .....	VIII
Indexul Tabelelor .....	IX
Mulțumiri .....	X
I. INTRODUCERE.....	XI
 <b>II. PARTE GENERALĂ</b> .....	 1
II.1. Cancer. Generalități .....	1
II.2. Epidemiologia și etiopatogenia cancerului .....	3
II.2.1. Mecanisme oncogenetice .....	4
II.2.1.1. Proto-oncogenele .....	4
II.2.1.2. Genele supresoare tumorale .....	6
II.2.1.3. Genele microARN.....	7
II.2.2. Aspecte epigenetice ale biologiei cancerului .....	8
II.2.3. Epidemiologia și etiopatogenia leucemiei acute mieloide (LAM) .....	9
II.2.4. Epidemiologia și etiopatogenia cancerului de prostată .....	12
II.3. Markerii moleculari în cancer .....	14
II.3.1. Generalități .....	14
II.3.2. Markerii ADN.....	15
II.3.3. Markerii de expresie genică.....	18
II.3.4. Markerii epigenetici .....	21
II.3.5. Acetilarea histonelor .....	27
II.4. MicroARN în cancer .....	29
II.4.1. Generalități .....	29
II.4.2. MicroARN în cancerul de prostată .....	30
II.4.2.1. Tipuri de microARN în țesut prostatic normal, canceros și în linii celulare.....	31
II.4.2.2. MicroARN ca biomarkeri în fluidele biologice .....	32

<b>III. PARTE SPECIFICĂ</b> .....	35
III.1. Scopul studiului .....	35
III.2. Obiectivele studiului .....	35
III.3. Estimarea in silico a fidelității de replicare a ADN; apariția mutațiilor punctiforme.....	36
III.4. Determinarea markerilor genetici de structură a ADN (mutațiile genei FLT3 în leucemia acută mieloidă) și de expresie genică în cancer (expresia genelor BAALC și WT1 în leucemia acută mieloidă) .....	44
III.5. Determinarea markerilor epigenetici în cancer; expresia microARN în țesut parafinat de cancer de prostată. Studiu pilot asupra expresiei microARN rezidenți pe cromozomul 21 în probe de cancer de prostată microdisecate .....	72
<b>IV. CONCLUZII</b> .....	97
<b>V. BIBLIOGRAFIE</b> .....	100
<b>ANEXE</b> .....	I

## Lista lucrărilor publicate

1. **A. Mihala**, A. A. Alexa, C. Samoilă, A. Dema, A-C. Vizitiu, A. Anghel, L. Tămaș, C. V. Marian, I-O. Sîrbu, A pilot study on the expression of microRNAs resident on chromosome 21 in laser microdissected FFPE prostate adenocarcinoma samples, Rom J Morphol Embryol 2015, 56(3):1063-1068, **IF=0.811 (2015)**
2. **A. Mihala**, L. Tămaș, H. Ioniță, E. Șeclăman, A. Anghel, BAALC, WT1 and FLT3 molecular diagnostic assays in cancer, Medicine in Evolution 2015, 1:70-75, **B+ journal**
3. **A. Mihala**, E. Șeclăman, C. Velicescu, L. Păcureanu, Z. Simon, S. Ursoniu, N. Mang, A. Anghel, Reliability analysis attempt for point mutations in DNA replication, Annals of West University of Timisoara, ser. Biology 2015, XVIII(1):27-32, **B+ journal**

## INTRODUCERE

O simplă căutare pe Google folosind termenul “cancer” va conduce în mai puțin de 0,5 secunde la incredibilul număr de 549 de milioane (549.000.000) de rezultate / pagini de internet independente. Dacă nu este boala secolului XXI, în mod cert cancerul este preocuparea numărul unu a omenirii din secolului XXI... după sex (3.290.000.000 de rezultate), sănătate (3.260.000.000 de rezultate) și moarte (1.370.000.000 de rezultate). Un număr impresionant din aceste link-uri conțin informații mai mult sau mai puțin corecte din punct de vedere științific despre cauzele apariției cancerului iar concluzia spontană în fața acestui ocean informațional este că știm foarte multe lucruri despre procesul de oncogeneză, dar în același timp ne dăm seama că sunt încă o mulțime de lucruri pe care nu le știm, deci în final concluzia ar putea fi că mai degrabă știm cât nu știm.

Începând cu secolul XVIII știm că un stil de viață nesănătos și anumite ocupații sunt asociate cu un risc crescut de apariție a cancerului, dar detaliile mecanismelor patogenetice subiacente rămân încă neclare.

Începând din secolul XIX știm că există (cel puțin în anumite tipuri de patologii) o componentă de transmitere transgenerațională a riscului apariției cancerului, dar încă suntem departe de a înțelege materializarea *de facto* a acestui risc prin prisma contribuției individuale și / sau colective a mutațiilor și polimorfismelor genice.

Începând din secolul XX cunoaștem (în bună măsură) mecanismele moleculare care guvernează expresia unei gene, interacțiunile intra- și intercelulare dintre gene, dar suntem încă departe de a putea folosi această informație pentru a individualiza corespunzător procedurile de screening, diagnostic și mai ales de terapie a cancerului.

În esență, istoria unui proces canceros e simplă: o celulă sau un set de celule acumulează mutații care îi / le conferă un avantaj de supraviețuire și de adaptare metabolică ce conduce la o proliferare celulară necontrolată local (invazie) sau la distanță (metastazare). Această “simplitate” este dezarmantă prin ea însăși, dar și prin numărul alarmant de cazuri noi în care această istorie continuă să se repete. Astfel unele prognoze ne arată noi date extrem de alarmante, de exemplu numărul estimat de noi cazuri de cancer pentru anul 2020 este de 15 milioane. Acest număr poate părea dezarmant dar este în același timp și suficient de motivant pentru miile de grupuri de cercetare a biologiei cancerului, inclusiv a celui din cadrul Departamentului de Biochimie și Farmacologie al Universității de Medicină și Farmacie “Victor Babeș” din Timișoara.

Modul în care transcripția genelor codante și non-codante este modificată (amplificată sau inhibată) în celulele canceroase a fost și rămâne unul dintre subiectele centrale ale cercetării oncologice. Analiza mecanismelor de reglare transcripțională și în special a interacțiunilor ADN - complex de transcripție - factori de transcripție este foarte importantă din perspectiva utilizării factorilor de transcripție drept ținte terapeutice, în condițiile în care doar aproximativ 20% din genomul uman este targetat din punct de vedere farmaceutic până în prezent. Căile de semnalizare de tipul căii receptorilor androgeni, Wnt sau TGFβ sunt profund alterate atât în cancerul sistemului hematopoietic cât și în cancerul solid precum cel de plămân, de sân sau de prostată. Cel puțin una din aceste căi de semnalizare modulează procese epigenetice precum metilarea insulelor CpG sau a resturilor de Lys din cozile histonelor, cu efecte profunde asupra topologiei cromozomiale. Similar, cel puțin una dintre aceste căi de semnalizare modulează transcripția, exportul, procesarea nucleară sau citoplasmatică și interacțiunea cu proteinele din complexul RISC al microARN, molecule de mici dimensiuni de ARN non-codant. Este un exemplu clasic al interacțiunii biunivoce dintre mecanismele transcripționale și post-transcripționale de reglare genică și al efectelor pe care aceasta le are la nivelul biologiei celulare. Un exemplu devenit clasic este cel al interacțiunii căii de semnalizare Wnt - microARN, interacțiune recurentă în dezvoltarea embrionară și diferențierea tisulară, dar și în oncogeneză. Concret, hsa-mirR-200 interacționează cu *beta-catenina* și inhibă proliferarea celulară în gliomul multiform, în timp ce p53 transactivează hsa-miR-34, microARN cunoscut pentru capacitatea de a reprima activitatea transcripțională a complexelor beta-catenina/TCF/LEF în cancerul colorectal.

Apariția microARN pe scena cercetării oncologice a însemnat nu numai o nouă perspectivă asupra mecanismelor oncogenetice de reglare post-transcripțională, dar și un nou capitol al biologiei biomarkerilor cancerului. MicroARN sunt molecule de ARN non-codant de mici dimensiuni (20-25 de nucleotide) capabile să moduleze concomitent stabilitatea a sute de molecule de ARN mesager țintă și cu o proprietate care le face candidați ideali pentru calificarea lor ca biomarkeri, anume aceea că prezintă o foarte mare stabilitate. Lista moleculelor de microARN din diferite țesuturi tumorale sau lichide biologice, asociate cu diferite tipuri de cancer aflate în diferite stadii de evoluție est deja impresionantă și așteaptă confirmarea în studii clinice.

Teza de doctorat de față se înscrie prin tematica sa în preocupările despre biologia moleculară a cancerului ale Disciplinei de Biochimie din cadrul Departamentului de Biochimie și Farmacologie al Universității de Medicină și Farmacie "Victor Babeș" Timișoara din ultimii 15 ani. Această teză cuprinde în principal următoarele aspecte:

- analiza și modelarea matematică a proceselor biologice, în cazul de față analiza fidelității procesului de replicare într-un model procariot. Analiza efectuată pe genomul tulpinii K12 de *E. coli* relevă probabilități semnificativ diferite de apariție a unei mutații punctiforme pe cele două catene, conducătoare și întârziată, în cursul procesului de replicare.

- analiza mutațiilor asociate proceselor oncogenetice, în cazul de față mutațiile genei FLT3 din leucemia acută mieloidă (LAM). De remarcat este faptul că majoritatea pacienților incluși în studiul nostru nu au prezentat mutații detectabile prin combinația de tehnici utilizată. Singurele mutații detectate au fost ITD și D835, ceea ce argumentează pentru existența foarte probabilă a altor mutații asociate.

- analiza expresiei genice din procesele oncogenetice, în cazul de față analiza expresiei genelor BAALC și WT1 din leucemia acută mieloidă (LAM). Concordant cu date din literatură, am documentat experimental creșteri modeste ale expresiei BAALC și creșteri importante ale nivelului expresiei WT1. Din păcate, dimenisunea relativ redusă a lotului de pacienți investigați nu permite corelarea acestor rezultate cu caracteristicile clinice și anatomo-patologice ale cazurilor incluse în analiza noastră.

- analiza mecanismelor post-transcripționale de reglare genică asociate proceselor oncogenetice (în cazul de față expresia speciilor de microARN rezidenți pe cromozomul 21 în cancerul de prostată). Activarea genelor rezidente pe cromozomul 21 în situații patologice este de interes, dată fiind propensiunea redusă a pacienților cu sindrom Down de a dezvolta tumori solide. Ipoteza noastră de lucru stipula o creștere a expresiei genelor microARN de pe cromozomul 21 ca mecanism de modulare (post-transcripțională) în cancerul de prostată. Această ipoteză a fost confirmată parțial pentru toți microARN investigați, cu excepția hsa-miR-155 iar analiza impactului transcripțional al acestei stări de fapt folosind programul miRWalk releva (deloc surprinzător) țințirea cu precădere a căilor de semnalizare implicate în cancer.

Rezultatele obținute în cursul experimentelor descrise în teza de față sunt în concordanță cu rezultatele studiilor similare publicate internațional (analiza mutațiilor FLT3 și a expresiei genice BAALC și WT1 în leucemia acută mieloidă) sau reprezintă noutăți absolute la momentul publicării (expresia microARN cartăți pe cromozomul 21 în celulele canceroase prostatice).

În lucrarea de față am prezentat concis dar cuprinzător metodele matematice și statistice folosite, programele bioinformatic (NEBcutter 2.0, Primer3, miRWalk), precum și tehnicile de biochimie și biologie moleculară utilizate (purificarea ADN și ARN din probele biologice proaspete sau arhivate; electroforeza; amplificare PCR și Real-Time PCR în sisteme SYBR-Green/TaqMan). Insist în a sublinia că prin îmbinarea tehnicii de microdisecție laser (care permite izolarea precisă, sub microscop, a celulelor/grupurilor de celule de un anumit tip) și a tehnicii de Real-Time PCR am reușit cuantificarea expresiei microARN cartăți pe cromozomul 21 în celulele adenocarcinomatoase prostatice și (la fel de important) comparația cu țesuturile adiacente.

## SCOPUL STUDIULUI

În ultimul timp personalizarea actului medical a devenit o orientare prioritară. În acest context, analiza cat mai completa a caracteristicilor unei boli devine esențială în vederea încadrării într-un diagnostic corect și a alegerii unei terapii cat mai eficiente.

În cazul cancerului, maladie inițiată și amplificată de modificări tot mai profunde la nivelul moleculei de ADN, analiza structurii cat și mai ales al transferului de informație pe relația ADN – ARNm – proteină, devin elemente esențiale în înțelegerea fenomenelor de carcinogeneză.

Studiul de față își propune analiza unor markeri moleculari, legați atât de structură (mutații genice) cât și de expresie (microARN), markeri reprezentativi pentru perturbarea unor căi metabolice și de semnalizare celulară cu semnificație deosebită în carcinogeneză.

## OBIECTIVELE STUDIULUI

1. Estimarea *in silico* a gradului de robustețe al metodelor de investigație folosite, utilizând ca model de studiu analiza replicării ADN
2. Identificarea de noi markeri ADN (expresia genei BAALC, expresia genei WT1, mutații ale genei FLT3) în leucemia acută mieloidă.
3. Analiza expresiei speciilor de microARN rezidenți pe cromozomul 21 (miR-Ch21) în probele de țesut glandular și stromal disecate prin tehnica laser sub microscop (LCM - laser capture micro-dissected) din probe fixate în formol și incluse în parafina (FFPE - formalin fixed paraffin embedded) de adenocarcinom de prostată.

# 1. ESTIMAREA IN SILICO A FIDELITĂȚII DE REPLICARE A ADN; APARIȚIA MUTAȚIILOR PUNCTIFORME

Unele procese biologice, cum ar fi replicarea ADN sau răspunsul imun, prezintă o serie de similitudini cu mecanismele de bază ale funcționării sistemelor automatizate. Urmarea acestei observații a fost introducerea termenului de *robustețe biologică* și astfel a fost recunoscută relevanța aplicării metodelor de analiză a fiabilității sistemelor automatizate la astfel de procese biologice. Prezintă aici o încercare de abordare a unui asemenea tip de analiză pentru mutații punctiforme în replicarea ADN la *E. coli*, fără a ține cont de corecțiile postreplicare operate de mecanismele de reparare a ADN-ului (*mismatch repair*).

Vitezele proceselor enzimatice și mecanochimice corecte și eronate sunt luate în considerare pentru calculul probabilităților de includere primară falsă a deoxinucleotidelor în lanțurile ADN în creștere cât și pentru verificarea defectuoasă a nou-formatelor perechi de baze de către complexul ADN - polimerazei. Probabilitatea de a nu exista inserții false în întregul helix de lungime  $N$  într-o nouă catenă de ADN corect sintetizată este calculată la  $0.63 \times 10^{-5}$  și  $10^{-2}$  pentru probabilitățile de includere defectuoasă a unor baze, respectiv rată de scăpare și pentru o lungime de  $4.6 \cdot 10^6$  pb a cromozomului tulpinii K12 de *E. coli*.

## REZULTATE

Se introduce următoarea notație a evenimentelor:

A – includerea de către ADN polimerază a unui nucleotid greșit în catena conducătoare sau în catena întârziată.

B - identificarea includerii greșite unui nucleotid și corectarea erorii prin substituirea nucleotidului fals, folosind activitatea  $3' \rightarrow 5'$  exonucleazică a ADN polimerazei.

În acest model, evenimentele posibile sunt notate cu A, complementul (sau contrarul) lui A notat  $\bar{A}$ , B și complementul lui B notat  $\bar{B}$ . Combinația celor 4 evenimente poate fi deci scrisă:

$$\Omega = \{(A \cap B) \cup (A \cap \bar{B}) \cup (\bar{A} \cap B) \cup (\bar{A} \cap \bar{B})\} \quad (1)$$

unde  $\Omega$  reprezintă spațiul evenimentelor.

Se iau în calcul următoarele probabilități considerate a fi cunoscute:

$P(A) = p_1$  – probabilitatea de includere greșită a unui nucleotid.

$P(\bar{B}/A) = p_2$  – probabilitatea de eroare apărută la verificarea includerii nucleotidelor în cursul replicării, ce se traduce prin absența substituției unui nucleotid greșit (condiționată de includerea greșită a unui nucleotid).

$P(A/B)$  – probabilitatea de includere greșită a unui nucleotid în cursul substituției (condiționată de substituție).

$P(A/\bar{B})$  – probabilitatea omiterii substituției unor nucleotide greșit inserate (condiționată de nonsubstituție).

$P(\bar{B}/\bar{A})$  – probabilitatea substituției unui nucleotid corect inserat cu un nucleotid greșit (condiționată de includerea corectă a unui nucleotid).

$P(\bar{A}/B)$  – probabilitatea substituției unui nucleotid corect inserat tot cu un nucleotid corect (condiționată de substituție). Aceasta din urmă se presupune a fi foarte scăzută.

Prezintă în continuare calculul probabilității de eroare în cazul probabilităților condiționate. Expresia evenimentului  $\bar{B}$  după cum rezultă din relația (1) este:

$$\bar{B} = (A \cap \bar{B}) \cup (\bar{A} \cap \bar{B}) \quad (2)$$

În acest caz se poate scrie:

$$P(A/\bar{B}) = P(A \cap \bar{B}) / P(\bar{B}) = P(\bar{B} \cap A) / [P(A \cap \bar{B}) \cup (\bar{A} \cap \bar{B})] = \\ [P(\bar{B}/A) * P(A)] / [P(\bar{B}/A) * P(A) + P(\bar{B}/\bar{A}) * P(\bar{A})] \quad (3)$$

Toate probabilitățile din relația (3) au fost deduse din relațiile (1) și (2).

Probabilitatea apariției unei mutații condiționată de nonsubstituție în cromozomul cu lungimea N, generată de sinteza catenei conducătoare va fi:

$$P_{m1} = P(A/\bar{B}) = \frac{p_1 p_2}{1 - (p_1 + p_2 - 2p_1 p_2)} \quad (4)$$

Probabilitatea ca această mutație să nu apară este  $1 - P_{m1}$  iar probabilitatea de a nu avea o mutație în oricare poziție este  $(1 - P_{m1})^N$ . În fine, probabilitatea de a avea cel puțin o mutație în întreaga catenă conducătoare este:

$$P_{M1+} = 1 - (1 - P_{m1})^N \quad (5)$$

Dacă lungimea cromozomului este de N perechi de baze și aceasta se împarte în  $m$  fragmente Okazaki ( $N = nm$ ), atunci probabilitatea de apariție a unei mutații în catena întârziată este:

$$P_{M1} = n(1 - p_1)^{n-1} * P_{m1} m(1 - p_1)^{n(m-1)} \quad (6)$$

Relația (6) se obține luând în considerare cazul în care o mutație apare într-un fragment Okazaki cu  $n$  perechi de nucleotide și nu apare în celelalte  $m-1$  fragmente, fiecare din ele avînd lungimea  $n$ .

Probabilitatea de apariție a unei mutații în urma sintezei ambelor catene de ADN va fi:

$$P_{Mit} = 2P_{M1+} - P_{M1}^2 \quad (7)$$

## CONCLUZII

Pentru valori tipice ale probabilității de falsă inserție  $p_1 = 10^{-5}$  și ale ratei de scăpare  $p_2 = 10^{-2}$ , probabilitatea de a avea cel puțin o mutație pe întreaga lungime  $N = 4.6 \cdot 10^6$  pb a cromozomului tulpinii K12 de *E. coli* este  $P_{M1+} = 0.37$ . În consecință, probabilitatea de a nu avea nici o mutație în întregul cromozom va fi de 0.63.

În cazul *E. coli*, fragmentele Okazaki au o lungime cuprinsă între 1000 și 2000 de nucleotide. Considerîndu-l pe  $n = 1000$  în relația (6), probabilitatea apariției unei singure mutații în catena întârziată este de  $10^{-7}$ .

În viitor, pe măsură ce procesele biologice vor fi din ce în ce mai bine înțelese, valabilitatea și utilitatea aplicării acestor modele de analiză a fiabilității va deveni tot mai evidentă. Rezultatele unor asemenea analize pot arăta dacă mecanismul de funcționare propus pentru un anumit proces biologic prezintă suficientă *robustețe* (o probabilitate de eroare suficient de mică) pentru a putea să asigure buna funcționare atât a procesului respective, cât și a întregului organism.

În ceea ce privește replicarea ADN, o anumită rată de eroare este necesară, pentru a asigura apariția mutațiilor benefice. De asemenea, o rată foarte scăzută de apariție a mutațiilor nu produce un beneficiu real din cauza costurilor energetice ridicate, necesare creșterii nivelului de expresie a enzimelor de reparare a ADN.



## **2. DETERMINAREA MARKERILOR GENETICI DE STRUCTURĂ A ADN (MUTAȚIILE GENEI FLT3 ÎN LEUCEMIA ACUTĂ MIELOIDĂ) ȘI DE EXPRESIE GENICĂ ÎN CANCER (EXPRESIA GENELOR BAALC ȘI WT1 ÎN LEUCEMIA ACUTĂ MIELOIDĂ)**

Aproximativ jumătate din pacienții adulți cu LAM, cu vârstă mai mică 60 de ani, prezintă un tablou citogenetic normal. Cu toate că acest grup are un prognostic intermediar, mai puțin de jumătate dintre aceștia sunt supraviețuitori pe termen lung. Acesta fapt a condus la necesitatea investigării unei varietăți mai mari de markeri moleculari pentru a îmbunătăți caracterizarea profilului de risc al pacienților cu LAM și tablou citogenetic normal. Prezentăm în continuare trei dintre acești markeri moleculari:

**1. BAALC (Brain and acute leukemia, cytoplasmic)** este o genă implicată în hematopoieza normală iar proteina codificată de aceasta este exprimată aproape exclusiv în țesuturi derivate din neuroectoderm, celule progenitoare hematopoietice și în unele leucemii acute. Gena este localizată pe cromozomul 8q22.3 iar secvența proteinei nu a arătat nici o omologie cu orice alte proteine sau domenii funcționale cunoscute. În hematopoieză, BAALC se exprimă aberant într-un subgrup de leucemii acute și supraexpresia BAALC sa dovedit a fi un factor de risc negativ la pacienții cu LAM nou diagnosticați cu citogenetică normală.

**2. WT1 (Wilms' tumor gene)** codifică o proteină cu structură de tip "deget de zinc". A fost identificată inițial ca o genă implicată în predispoziția genetică la o formă de cancer renal (tumora Wilms) ce apare de regulă în copilărie. WT1 pare a fi utilă ca marker molecular la pacienții cu LAM în special pentru monitorizarea bolii minime reziduale. Expresia genei WT1 în celulele leucemice este mai mare decât în măduva osoasă normală sau în celulele sanguine periferice.

**3. FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3)**, cunoscută și ca FLK-2 (fetal liver kinase-2) sau STK-1 (human stem cell kinase-1) ar putea fi cea mai frecventă genă unică mutantă în LAM. Ea a fost clonată din celule stem hematopoietice CD34+ și codează un receptor de tirozin kinază tip III similar cu alți membri ai familiei de receptori de tirozin kinază clasa III (RTKIII) cum ar fi FMS, PDGFR (platelet derived growth factor receptor) și KIT.

Cele mai frecvente sunt mutațiile ITD (internal tandem duplication) și D835 (substituția Asp835Tyr).

## **REZULTATE**

Mutațiile de tip ITD ale FLT3 au fost analizate folosind primerii 11F și 12R concepuți pentru a amplifica exonii 11 și 12 ai genei. Profilul genic de tip normal (wild-type) generează fragmente de ADN de 330 pb vizibil pe gel – electroforeză sub forma unei singure benzi în timp ce mutațiile ITD generează produși PCR de dimensiuni mai mari.

Mutația D835 a fost detectată folosind primeri D835F și D835R. Fragmentul wild-type (cel care nu conține mutația) conține un situs de restricție pentru enzima EcoRV, în timp ce prezența mutației anulează situsul de restricție. În plus, primerul antisens (D835R) conține încă un situs de restricție EcoRV (de control), în scopul de a verifica activitatea enzimei de restricție. Astfel, dacă enzima este inactivă (nu digeră), se va obține produsul PCR complet nedigerat (un singur fragment de 150 pb).

În mod normal însă enzima este activă (digeră), caz în care produsul PCR wild-type va genera un mic fragment de 80 pb, în timp ce mutația D835 care desființează situsul de restricție EcoRV, va genera un fragment de 129 pb.

Pentru experimentul de real time PCR datele obținute pentru BAALC și WT1 au fost comparate prin raportare la nivelul de expresie al unei gene de referință denumită și housekeeping gene (despre a cărei nivel de expresie se știe că nu se modifică în LAM) GPDH.

Astfel, la proba 3, pentru gena BAALC, folosind formula de calcul  $\Delta\Delta CT$  s-a obținut o subexpresie de 21 de ori (adică nivelul de expresie pentru gena BAALC este de 21 de ori mai mic decât cel normal, raportat la GPDH - housekeeping gene) iar pentru proba 6, aceeași genă, o subexpresie de 5 ori. Supraexpresia genei BAALC este recunoscută ca fiind unul din cei mai importanți factori de risc în LAM, asociat cu reducerea duratei de supraviețuire.

Pentru gena WT1 la proba 2 s-a obținut o supraexpresie de 32 de ori.

## **DISCUȚII**

Pentru acești pacienți cu profil citogenetic normal este extrem de utilă identificarea unor noi markeri moleculari, care să permită o mai bună evaluare a gradului de risc și conceperea unor scheme terapeutice adaptate acestuia.

Supraexpresia genei BAALC este recunoscută ca fiind unul din cei mai importanți factori de risc în LAM, asociat cu reducerea duratei de supraviețuire.

ADN-ul a fost extras din sângele periferic integral al pacienților cu LAM, acesta conținând un amestec de celule normale și celule leucemice. Mutațiile FLT3 (ITD și D835), la cazurile la care au fost prezente, au fost vizibile pe gel-electroforeză împreună cu fragmentele wild-type (fără mutații). Mai mult decât atât, s-a constatat că există posibilitatea ca mutația ITD să producă un nou situs de restricție pentru enzima EcoRV. Apariția acestui fenomen, deși destul de puțin probabilă, poate genera produși de digestie EcoRV de dimensiuni mai mici.

## **CONCLUZII**

În acest studiu restrâns pe pacienți cu LAM care prezintă un cariotip normal, am identificat o supraexpresie modestă a genei BAALC în proba cu numărul 5 și o supraexpresie puternică a genei WT1 (de 33 de ori) în proba cu numărul 2.

Am găsit de asemenea subexpresia genei BAALC în proba cu numărul 3 și supraexpresii modeste ale genei WT1 în probele 3, 4, 5 și 6. Mutații ale genei FLT3 au fost identificate în două probe cu LAM (o probă cu ITD și o probă cu D835).

### **3. DETERMINAREA MARKERILOR EPIGENETICI ÎN CANCER; EXPRESIA MICROARN ÎN ȚESUT PARAFINAT DE CANCER DE PROSTATĂ. STUDIU PILOT ASUPRA EXPRESIEI MICROARN REZIDENȚI PE CROMOZOMUL 21 ÎN PROBE DE CANCER DE PROSTATĂ MICRODISECATE**

În ciuda progreselor remarcabile apărute în înțelegerea mecanismelor moleculare ale patogenezei sale, cancerul de prostată rămâne unul dintre cele mai letale tipuri de cancer.

Diferențele în incidența cancerului de prostată observate între țările Scandinave, Japonia și China pe de o parte și țările Europei de Vest pe de altă parte, susțin existența unui mecanism patogenetic multifactorial, care implică mecanisme genetice și factori de mediu.

Extraordinarul efort de cercetare al ultimelor decenii a adăugat un nou nivel, epigenetic, adăugând prin aceasta o și mai mare complexitate la imaginea deja complexă a patogenezei cancerului de prostată. Printre multe altele un fapt interesant și demn de semnalat este acela ca pacienții cu sindrom Down par a fi protejați împotriva dezvoltării tumorilor solide, mecanisme care par să implice DSCR1 (Down syndrome critical region gene 1), o genă care inhibă angiogeneza prin inhibarea căii de semnalizare legate de VEGF (factorul de creștere vasculară și endotelială).

Experimentele in vivo și ex vivo au identificat mai multe căi de semnalizare implicate în dezvoltarea cancerului de prostată, incluzând calea receptorilor androgeni (AR), căile PI3K/AKT și MAPK, TGFβ și Wnt.

Cel puțin una dintre aceste căi acționează prin modularea expresiei microARN, molecule de ARN de mici dimensiuni (20-25 de nucleotide), non-codante, capabile să moduleze expresia genelor la mamifere prin alterarea stabilității moleculelor de ARN mesager (ARNm) țintă.

MicroARN ies în evidență în cercetarea patogenezei cancerului de prostată datorită versatilității lor funcționale și a stabilității lor remarcabile în țesuturi proaspete sau arhivate sau în lichide biologice.

Analiza probelor de țesut fixate în formol și incluse în parafină a identificat mai multe molecule de microARN posibil asociate biologiei tumorale prostatice. De cele mai multe ori s-a observat diminuarea expresiei unor microARN (de exemplu, hsa-miR-143, hsa-miR-145), în timp ce creșterea expresiei este un fenomen mult mai rar întâlnit (hsa-let-7c, hsa-miR-221, hsa-miR-182-5p etc.).

Mai mult, microARN circulanți precum hsa-miR-141, hsa-miR-200b sau hsa-miR-375 au fost propuși ca potențiali biomarkeri pentru diagnosticul non-invaziv al cancerului de prostată.

În acest context, una dintre cele mai interesante întrebări care se ridică este dacă protecția împotriva tumorilor solide la pacienții cu sindromul Down se asociază cu o schimbare în tipurile de microARN de expresie rezidenți pe cromozomul 21 (miR-Ch21): hsa-let7c, hsa-miR-125b-2, hsa-miR-155, hsa-miR-802, hsa-miR-99a.

În acest studiu am folosit tehnica de Real-Time PCR (PCR cantitativ) pentru a investiga expresia speciilor de microARN rezidenți pe cromozomul 21 (miR-Ch21) în probele de țesut glandular și stromal disecate prin tehnica laser sub microscop (LCM - laser capture micro-dissected) din probe fixate în formol și incluse în parafina (FFPE - formalin fixed paraffin embedded) de adenocarcinom de prostată. Am comparat expresia miR-Ch21 cu cea a doi dintre microARN caracteristici celulelor stem cunoscute a fi asociați cu biologia cancerului de prostată, respectiv hsa-miR-372 și hsa-miR-373.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

După optimizarea duratei și intensității impulsului laser, am colectat de pe fiecare lamă, în triplicat, patru tipuri de țesut: glande tumorale (T), glande normale (N), stromă peritumorală (SPT) și stromă normală (SN). De notat, SPT a fost recoltată din imediata apropiere a glandelor maligne, în timp ce SN a fost recoltată din zone aflate la distanță de zona tumorală malignă.

Analiza qRT-PCR a probelor prelevate de la trei specimene diferite de adenocarcinom de prostată prezintă o puternică diminuare a expresiei miR-CH21 în țesuturile tumorale comparativ cu glandele normale, cu valori variind de la 0,14 (hsa-miR-99a) la 0,58 (hsa-miR-802). Acest lucru este în conformitate cu unele dintre datele publicate anterior și ar putea explica, printre altele, creșterea PSA care însoțește majoritatea cancerelor de prostată. Modificarea expresiei miR-Ch21 în SPT față de SN este similară celei văzute în comparația T versus N, cu valori cuprinse între 0,04 (hsa-miR-99a) și 0,57 (hsa-miR-802). Rezultatele obținute arată o impresionantă diminuare a expresiei tuturor miR-Ch21 atât în epiteliul tumoral cât și la nivelul stromei din imediata vecinătate.

Așa cum era de așteptat, epiteliul tumoral prezintă un nivel al expresiei (cu excepția hsa-miR-155, fold change = 1) miR-Ch21 mai ridicat comparativ cu stroma din jur. În mod neașteptat însă, atunci când am comparat expresia miR-Ch21 în epiteliul glandular normal cu stroma adiacentă acestuia, hsa-miR-155 și hsa-miR-99a sunt subexprimați, în timp ce hsa-miR-125b-2 și hsa-miR-802 sunt supraexprimați.

Pentru a putea înțelege implicațiile biologice ale acestor modificări, am efectuat o analiză miRWalk și am constatat că din cele 22 de căi de semnalizare presupuse a fi influențate de cel puțin doi din microARN miR-Ch21 (la  $p < 0,05$ , corecție Bonferroni) 14 (63,63%) se referă la cancer în mod direct sau prin intermediul unei căi de semnalizare.

Rezultatele obținute sunt interesante, deoarece aruncă o nouă lumină asupra rolului acestui set de microARN în cancerul de prostata în special, dar și în cancer în general.

Pentru a investiga în continuare dacă modificarea nivelurilor microRNA în țesutul tumoral și peritumoral este specifică pentru miR-Ch21, am ales să extindem analiza noastră și să cuantificăm expresia hsa-miR-372 și hsa-miR-373, doi microARN cunoscuți ca fiind implicați în biologia cancerului de prostată și în modularea proliferării și pluripotenței celulelor stem la eutherieni.

Analiza expresiei acestora în epiteliile tumorale față de epiteliile normale prezintă rezultate divergente, cu o impresionantă creștere a expresiei hsa-miR-373 (de peste 200 de ori), în timp ce expresia hsa-miR-372 este scăzută de 100 de ori.

Interesant de remarcat este însă faptul că nu s-au găsit diferențe semnificative în expresia celor doi microARN atunci când am făcut comparația între epiteliul tumoral și stroma peritumorală, posibil datorită unui mecanism general, comun de reglare a expresiei în cele două țesuturi.

## CONCLUZII

Datele noastre indică o puternică inhibiție a expresiei hsa-let-7c, un microRNA cunoscut ca modulator al receptorului de androgeni prin modularea myc, ridicând semne de întrebare cu privire la posibila implicare a acestuia în rezistența la androgeni.

Rezultatele noastre care ilustrează o diminuare semnificativă a expresiei hsa - miR - 155 atât în epiteliul tumoral cât și în stroma adiacentă la micro-disecția cu laser (fold change 0,22 și respectiv 0,12 ) sunt în contradicție cu opinia generală care include hsa-miR-155 în așa-numita semnătură miRNA a cancerelor solide.

În afară de aceste două tipuri de microARN, studiul nostru avansează un nou miR-ch21 ca fiind specific subexprimat în epiteliul prostatic modificat malign: hsa-miR-802.

Scăderea generalizată, cu specificitate de țesut (T versus SPT), a expresiei miR-ch21 sugerează că acești microARN sunt mai degrabă sintetizați în epiteliul glandular proliferativ decât în stroma adiacentă.

În concluzie, diminuarea globală a expresiei miR-ch21 descrisă în analiza noastră nu deschide doar o nouă cale de cercetare a bazei moleculare a “protecției” conferite de sindromul Down față de apariția și dezvoltarea tumorilor solide, dar, mai ales, ridică mai multe semne de întrebare: care sunt mecanismele care stau la baza acestei diminuări a expresiei miR-ch21? Este acest fenomen specific cancerului de prostată? Care sunt principalele ținte moleculare (colective) ale miR-ch21?

Analiza noastră miRWalk oferă câteva indicii în acest sens, căile de semnalizare țintă vizate fiind Wnt, IGF (Insulin Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) și EGF (Epidermal Growth Factor).

Rezultatele obținute din probe LCM FFPE selectate cu mare atenție prezintă o imagine nouă a expresiei și a posibilei implicări a miR-ch21 în cancerul de prostată. În acest context, considerăm că o reevaluare sistematică a expresiei microRNA prin combinarea tehnicilor LCM FFPE și qRT-PCR va putea soluționa multe din controversele care există actualmente pe această temă.

## CONCLUZII GENERALE

1. Lucrarea de față are drept scop analiza unor markeri moleculari legați atât de structură (mutații genice) cât și de expresie (microARN), markeri reprezentativi pentru perturbarea unor căi metabolice și de semnalizare celulară cu semnificație deosebită în carcinogeneză.
2. Investigațiile în cazul LAM au relevat ca la momentul diagnosticului, aproximativ jumătate din pacienții adulți cu LAM nu prezintă aberații cromozomiale clonale. Cu toate că acest grup de pacienți are un prognostic intermediar, mai puțin de jumătate dintre aceștia sunt supraviețuitori de lungă durată. Pentru acești pacienți cu profil citogenetic normal este extrem de utilă identificarea unor noi markeri moleculari, de exemplu expresia genelor BAALC și WT1 sau mutații la nivelul genei FTL3, care să permită o mai bună evaluare a gradului de risc și conceperea unor scheme terapeutice adaptate acestuia. Supraexpresia genei BAALC este recunoscută ca fiind unul din cei mai importanți factori de risc în LAM, asociat cu reducerea duratei de supraviețuire. În acest studiu restrâns pe pacienți cu LAM care prezintă un cariotip normal, am identificat o modestă supraexpresie a genei BAALC în proba cu numărul 5 și o puternică supraexpresie a genei WT1 (de 33 de ori) în proba cu numărul 2. Am găsit de asemenea subexpresia genei BAALC în proba cu numărul 3 și supraexpresii modeste ale genei WT1 în probele 3, 4, 5 și 6. Mutații ale genei FLT3 au fost identificate în două probe cu LAM (o probă cu ITD și o probă cu D835).
3. Investigațiile în cazul cancerului de prostată au avut drept obiectiv expresia speciilor de microARN rezidenți pe cromozomul 21 (miR-Ch21) în probele de țesut glandular și stromal disecate prin tehnica laser sub microscop (LCM - laser capture micro-dissected) din probe fixate în formol și incluse în parafina (FFPE - formalin fixed paraffin embedded) de adenocarcinom de prostată. Am comparat expresia miR-Ch21 cu cea a doi dintre microARN caracteristici celulelor stem cunoscute a fi asociați cu biologia cancerului de prostată, respectiv hsa-miR-372 și hsa-miR-373. Datele noastre indică o puternică inhibiție a expresiei hsa-let-7c, un microRNA cunoscut ca modulator al receptorului de androgeni prin modularea myc, ridicând semne de întrebare cu privire la posibila implicare a acestuia în rezistența la androgeni. Rezultatele noastre care ilustrează o diminuare semnificativă a expresiei hSA - miR - 155 atât în epiteliul tumoral cât și în stroma adiacentă la micro-disecția cu laser (fold change 0,22 și respectiv 0,12 ) sunt în contradicție cu opinia generală care include

hsa-miR-155 în așa-numita semnătură miRNA a cancerelor solide. În afară de aceste două tipuri de microARN, studiul nostru avansează un nou miR-ch21 ca fiind specific subexprimat în epiteliul prostatic modificat malign: hsa-miR-802.

4. Scăderea generalizată, cu specificitate de țesut (T versus SPT), a expresiei miR-ch21 sugerează că acești microARN sunt mai degrabă sintetizați în epiteliul glandular proliferativ decât în stroma adiacentă.
5. Diminuarea globală a expresiei miR-ch21 descrisă în analiza noastră nu deschide doar o nouă cale de cercetare a bazei moleculare a "protecției" conferite de sindromul Down față de apariția și dezvoltarea tumorilor solide, dar, mai ales, ridică mai multe semne de întrebare: care sunt mecanismele care stau la baza acestei diminuări a expresiei miR-ch21? Este acest fenomen specific cancerului de prostată? Care sunt principalele ținte moleculare (colective) ale miR-ch21? Analiza noastră miRWalk oferă câteva indicii în acest sens, căile de semnalizare țintă vizate fiind Wnt, IGF (Insulin Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) și EGF (Epidermal Growth Factor).
6. Rezultatele noastre, obținute din probe LCM FFPE selectate cu mare atenție, prezintă o imagine nouă a expresiei și a posibilei implicări a miR-ch21 în cancerul de prostată. În acest context, considerăm că o reevaluare sistematică a expresiei microRNA prin combinarea tehnicilor LCM FFPE și qRT-PCR va putea soluționa multe din controversele care există actualmente pe această temă.
7. În cazul estimării *in silico* a fidelității de replicare ADN, analiză importantă în evaluarea impactului frecvenței mutațiilor în procesul de replicare al ADN, s-a constatat ca o anumită rată de eroare este necesară, pentru a asigura apariția mutațiilor benefice. De asemenea, o rată foarte scăzută de apariție a mutațiilor nu produce un beneficiu real din cauza costurilor energetice ridicate, necesare creșterii nivelului de expresie a enzimelor de reparare a ADN.