

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL DE BIOCHIMIE ȘI FARMACOLOGIE**

SALA-CÎRTOG MARIA



REZUMAT

TEZĂ DE DOCTORAT

**TRANSFERUL DE MATERIAL GENETIC DIN
PLANTE – UN NOU MECANISM DE ACȚIUNE AL
PLANTELOR MEDICINALE UTILIZATE ÎN TERAPIE**

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. ANGHEL ANDREI

**Timișoara
2019**

INTRODUCERE

MicroARN-ul (miARN) face parte din clasa ARN-ului non-codant, fiind compus dintr-un fragment scurt (între 21-25 de nucleotide), monocatenar. Moleculele de miARN joacă un rol important în reglarea expresiei genice la nivel post-transcripțional atât la plante cât și la animale prin recunoașterea unor secvențe specifice din regiunile 3'UTR de care se leagă prin complementaritate. În acest mod și ținând cont că un singur tip de microARN poate influența expresia a sute/mii de gene simultan, microARN sunt implicați în controlul unor procese celulare importante, cum ar fi: diferențierea, proliferarea, apoptoza, migrarea celulară, etc

Atât microARNul din regnul vegetal cât și cel din regnul animal îndeplinesc același rol în reglarea expresiei genice de la nivel post-transcripțional. Totuși, există unele discrepanțe între cele două la nivel de sinteză, stabilitate și mecanism de acțiune. Pe departe cele mai semnificative diferențe sunt cele legate de stabilitate și a modului de legare la secvențele-țintă. Metilarea miARN vegetal efectuată de HEN1 la capătul 3', îi conferă în primul rând o protecție suplimentară împotriva exonucleazelor, iar în al doilea rând facilitează recunoașterea microARNului de către AGO1 din complexul RISC. MicroARN animal se leagă prin complementaritate parțială de țintă, rezultând o inhibare a translației ARNm, în schimb, în regnul vegetal se observă cel mai adesea o legare prin complementaritate totală, care va duce la degradarea ARNm.

Oamenii au utilizat plantele în scop terapeutic încă din timpurile vechi, în Antichitate și în Evul Mediu din ele se obțineau majoritatea remediilor pentru tratarea bolilor. Niciodată însă mecanismul de acțiune privind efectul lor curativ asupra diverselor patologii nu a fost pe deplin elucidat.

În 2012 însă, a apărut un articol care susținea existența unui transfer de microARN vegetal în organismul animal/ uman în urma ingestiei, chiar mai mult decât atât, acești microARN exogeni pot supraviețui în corpul gazdei, având un rol în reglarea expresiei genice a acesteia. S-a formulat următoarea

concluzie : microARNul vegetal poate îndeplini același funcții ca și cel al celulei gazdă, în alte cuvinte, poate modula procesele celulare specifice.

Pornind de la această premisă, studiul de față și-a propus investigarea transferului de material vegetal din plantele medicinale administrate pe cale orală la organismul consumator. În acest sens, am caracterizat noi specii de microARN din gălbenele (*Calendula officinalis*) și am realizat experimental n model de investigare al transferului de microARN vegetal la organismul animal (șoarece de laborator).

OBIECTIVELE GENERALE ALE STUDIULUI

1. Evaluarea transferului de microARN vegetal la animale de experiență (șoareci)
2. Identificarea de novo a speciilor de microARN în plantele medicinale (*Calendula flos*)
3. Stadiul actual al cunoașterii în ceea ce privește transferul de microARN din plante în organismul animal

STUDIUL I

DETECȚIA ȘI ANALIZA TRANSFERULUI miR166a DIN PLANTE ÎN ORGANELE ANIMALELOR DE EXPERIENȚĂ (ȘOARECI) ÎN URMA INGESTIEI

INTRODUCERE

Acest studiu investighează ipoteza transferului de microARN vegetal în organismul animalelor de experiență (șoareci). Pentru aceasta, șoarecii masculi adulți au fost hrăniți prin gavaj cu miR166a, unul dintre cei mai abundenți microARN din regnul vegetal, fie purificat din semințele de in (plantă cu rol medicinal), fie sintetic sub formă de LNA (Locked nucleic acid), care datorită structurii specifice sunt rezistenți nucleazelor.

MATERIALE ȘI METODE

- Extracția ARN total din semințele germinate de in folosind kitul mirVana RNA Isolation Kit

- Studiul experimental pe animale (șoareci): animalele folosite au fost șoareci albi, masculi, de rasă mixtă, menținuți în condiții corespunzătoare pe parcursul întregului experiment: ritm circadian lumină/întuneric 12/12 ore, temperatură și umiditate adecvate, hrană (Institutul Cantacuzino, București) și apă *ad libitum*.

Animalele de experiență au fost grupate în 3 loturi, a câte 3 șoareci/lot, după cum urmează:

Lotul I: lotul de control, căruia i-a fost administrat prin gavaj 12 μ l de scrambled LNA dizolvați în apă purificată, volumul total a lichidului ingerat fiind 100 μ l

Lot II: a fost administrat prin gavaj, într-un volum total de 100 μ l, 14 μ l de ARN total extras din semințele de in și dizolvat în apă purificată

Lot III: administrare prin gavaj, în același volum total de 100 de μ l, 10 μ l de microARN sintetic vegetal, LNA-miR166a, dizolvat în apă.

- Extracția ARNului total vegetal din ficatul de șoarec folosind mirVana RNA Isolation kit

- Analiza expresiei microARNului vegetal miR166a din ficat prin tehnica RT-qPCR: reacțiile s-au efectuat în triplicat, iar rezultatele RT-PCR au fost calculate prin metoda $\Delta\Delta CT$, folosind U6 pentru normalizare.

REZULTATE

Pentru a testa eficacitatea transferului în organismul animalelor de experiență în urma gavajului, am administrat atât ARN vegetal, cât și microARN sintetic sub formă de LNA, LNA-miR166a. Acizii nucleici blocați (Locked Nucleic Acids) sunt cunoscuți pentru rezistența lor la acțiunea de hidroliză a nucleazelor datorită punții oxi-metilenice între atomii de carbon din pozițiile 2' și 4'.

Pentru a verifica ipoteza transferului de material genetic vegetal la animal/om în urma ingestiei, s-a recoltat ficatul șoarecilor la 12 ore după gavaj și s-a izolat ARN total din țesut. S-a analizat apoi expresia relativă a lui miR166a existent în ficat folosind tehnica taqman RT-qPCR.

Semnificația în ceea ce privește nivelul expresiei relative a miR166a vegetal din ficatul de șoarec în urma gavajului s-a calculat cu T test (p-valoare). Prin compararea loturilor studiului experimental se observă o diferență statistică semnificativă între lotul II, în care animalele de experiență au primit ARN vegetal și celelalte două loturi, în schimb nicio diferență semnificativă între lotul control și cel în care animalele au primit miARN sintetic sub formă de LNA- miR166a.

DISCUȚII

În lucrarea de față, am decis să ne axăm pe microARNul vegetal liber (neîncapsulat în exozomi) miR166a, unul dintre cei mai conservați și abundenți acizi nucleici de mici dimensiuni din plante. Pentru aceasta, am ales să lucrăm cu semințele de in, în primul rând datorită conținutului bogat în miR166a, iar în al doilea rând pentru că face parte din categoria plantelor medicinale.

Ne-am pus întrebarea dacă într-adevăr microARNul vegetal este destul de stabil ca odată ingerat, să supraviețuiască procesului de digestie și să intre în circulația sanguină. Pentru a fi siguri că întreaga cantitate de ARN a ajuns în organismul animalelor de experiență, administrarea probelor s-a făcut prin gavaj.

La doisprezece ore după administrarea unei singure doze de ARN total din in (Lot II), în ficatul șoarecilor expresia miR166a a fost semnificativ crescută față de control ($p=0.015$). Pentru a vedea gradul de stabilitate și de rezistență împotriva enzimelor digestive a microARN vegetal din alimentație, l-am comparat cu analogul său sintetic, LNA-miR166a. În mod interesant, acesta din urmă s-a găsit într-adevăr într-o cantitate mai mare în ficat decât în lotul control, însă diferența a fost nesemnificativă din punct de vedere statistic

($p=0.282$). Putem presupune fie că microARNul sintetic este mai puțin absorbit la nivel intestinal comparativ cu cel vegetal, fie microARN din alimentație este mai bine protejat.

Cea mai semnificativă diferență a expresiei relative a miR166a din punct de vedere statistic a fost în schimb între loturile probă (II și III) cu un $p < 0.001$, deși din punct de vedere cantitativ, diferența de miR166a detectat în ficat nu a fost mare.

Valoarea neobișnuit de mare a ($C_t = 32$) a miR166a în lotul control poate sugera o eventuală contaminare. Ipoteza contaminării cu produse vegetale dietetice și non-dietetice este susținută și de faptul că nivelul expresiei de miR166a sintetic din ficat a fost semnificativ mai mică decât cel din in, când teoretic structura specifică LNA îi conferă o sensibilitate mai mare în ceea ce privește tehnica RT-qPCR. Mai mult decât atât, acest analog sintetic al microARNului vegetal poate fi detectat în concentrații mici în plasmă timp de câteva săptămâni de la administrare.

Ne-am axat apoi asupra dozei de ARN administrate în studiul experimental. Astfel, pentru ca un individ să ajungă să ingere o cantitate de ARN asemănătoare celei din experiment, ar trebui să consume 600g de semințe de in pe zi, doza zilnică recomandată fiind între 30-40g. Se poate ajunge la ipoteza că transferul de microARN vegetal exogen în organismul animal în urma ingestiei este un fenomen dozo-dependent.

CONCLUZII

Administrat în doză mare, prin gavaj, microARNul vegetal miR166a din in a putut fi detectat în ficatul animalelor de experiență (șoareci), deși rolul pe care-l îndeplinește acesta în celulele gazdei rămâne încă un subiect de dezbatere.

STUDIUL II

IDENTIFICAREA DE NOVO A TIPURILOR DE MICROARN DIN CALENDULA OFFICINALIS: UN POSIBIL NOU ÎNȚELES AL FITOTERAPIEI

INTRODUCERE

Inflorescența de gălbenele (*Calendula officinalis*) reprezintă partea cu principii active și este folosită pentru acțiunea sa antiinflamatoare, antibacteriană, antifungică, antioxidantă, cicatrizantă și imunomodulatoare. Cu toate acestea, niciun miARN nu a fost identificat în această plantă medicinală. Studiul de față își propune identificarea microARN din gălbenele, folosind o secvențiere de tip NGS (Next-generation sequencing) a ARN-ului total extras din plantă, cuplat cu analiza bioinformatică.

MATERIALE ȘI METODE

- Extracția ARN total din inflorescența de gălbenele folosind mirVana RNA Isolation Kit de la Ambion.
- Secvențierea de nouă generație (NGS) ARN de mici dimensiuni din inflorescența de gălbenele cu două platforme diferite: Tehnologia Ion Torrent și Platforma Illumina NextSeq500
- Analiza de date

REZULTATE

Pentru a identifica potențialii microARN din inflorescența de gălbenele, secvențele brute obținute au fost supuse unor filtrări în urma cărora au fost eliminați adaptorii, nucleotidele necunoscute și secvențele ale căror dimensiuni nu erau adecvate. Secvențele rămase au fost analizate din punct de vedere calitativ cu programul MySequence.

Absența cunoașterii genomului și transcriptomului gălbenelelor, precum și faptul că nu există nicio informație în ceea ce privește microARN din

planta studiată ne-a impus folosirea unui set de referințe format doar din microARNul matur, conservat din baza de date miRBase. Datele brute obținute în urma secvențierii și filtrării au fost apoi aliniate cu setul de referință. În total 4 microARN cu o rată de omologie de 100% au fost identificați în inflorescența de gălbenele: miR166a, miR166h, miR894 și miR8175.

Pentru a vedea frecvența pe care potențialii microARN identificați în gălbenele o au și în alte plante medicinale, am folosit programul BLASTn, cu ajutorul căruia am putut compara secvențele de interes cu secvențele din miRBase. Rezultatele obținute au arătat că doar omologii primilor doi microARN: miR166a și miR166h au fost identificați și în alte plante medicinale.

DISCUȚII

În studiul de față ne-am propus identificarea unor specii de microARN vegetal pentru care nu există o cartografie genică, deoarece genomul gălbenelelor nu a fost încă publicat. Soluția într-o astfel de situație a fost o folosirea unei secvențieri de tip NGS (Next-generation sequencing) a ARN-ului total extras din plantă, cuplat cu analiza bioinformatică pentru compararea secvențelor de ARN de mici dimensiuni rezultate cu microARNul vegetal matur, existent deja în bazele de date. Am ales să lucrăm cu inflorescența plantei, deoarece are un conținut ridicat în principiile active folosite în fitoterapie.

După o căutare în bazele de date existente bazată pe omologie au fost identificați 4 microARN maturi în planta medicinală studiată. Doi dintre microARN identificați fac parte din familia miR166, una dintre cele mai abundente familii din regnul vegetal. Mai mult decât atât, s-a putut observa prezența miR166a și miR166h în diferite plante folosite cu scop medicinal. miR166a ar avea un rol inhibitor asupra receptorului pentru Interleukina-1 (Interleukin 1 Receptor like protein), în alte cuvinte, are un rol antiinflamator și imunomodulator. Interesant este faptul că gălbenelele sunt folosite în mare parte pentru aceleași beneficii.

CONCLUZII

S-a identificat pentru prima dată patru posibili microARN din inflorescența de gălbenele, contribuind la îmbogățirea bazei de date a speciilor de microARN vegetali.

STUDIUL III

TRANSFERUL DE MICROARN VEGETAL ÎN ORGANISMUL ANIMAL – O METANALIZĂ

Majoritatea studiilor care s-au axat pe transferul materialului genetic vegetal în urma ingestiei în organismul consumator, au folosit plantele consumate cel mai frecvent, în multe cazuri fiind vorba despre cereale ca și orezul, porumbul sau ovăzul. Totuși, avem și dovezi despre existența unui transfer între specii al microARNul din plantele cu rol medicinal. Toate aceste descoperiri au ridicat următoarea întrebare: ar putea acest microARN exogen să exercite aceleași funcții ca și cel al celulei gazdă dacă într-adevăr are capacitatea de a traversa bariera gastro-intestinală?

În studiul de față am încercat să rezumăm stadiul actual al cunoașterii în ceea ce privește microARNul existent în plantele medicinale, precum și mecanismele moleculare prin care acest ARN de mici dimensiuni, odată consumat, poate influența procesele biologice active din organismul animal. Pentru a cuprinde totalitatea microARN identificați în plantele medicinale, au fost consultate bazele de date publice existente. Conform Enciclopediei Plantelor Medicinale (Encyclopedia of Medicinal Plants), 36 de plante al căror miRnom este cunoscut, sunt folosite în fitoterapie. Din câte cunoaștem, acesta este primul studiu din literatura de specialitate care înglobează informațiile cu privire la microARN existent în plantele medicinale. Totodată, actualul studiu leagă efectele terapeutice ale plantelor medicinale cu ingestia de microARN vegetal, demonstrând astfel rolul de modulator genic al microARNului exogen.

CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PROPRII

- Studiul de față este o primă încercare în România de a investiga un nou mecanism de interacțiune între plantele medicinale și organismul animal. Până acum efectul plantelor medicinale era explicat prin capacitatea substanțelor active de a traversa bariera gastro-intestinală, fiind apoi eliminate prin acțiunea antixenobiotică a ficatului, în momentul de față acest efect este studiat pe baza interacțiunii genom-transcriptom-metabolom între plantă și animal. Mecanismul prin care materialul genetic al plantei medicinale influențează procesele metabolice și celulare din organismul consumator poate sta la baza unei noi ramuri a farmacognoziei.
- Administrat în doze mari, microARN vegetal din alimentație sau din plantele folosite în scop medicinal poate într-adevăr să treacă de bariera gastro-intestinală în circulație și apoi în organe, deși efectul acestuia în celulele gazdei rămâne încă un subiect de dezbatere.
- Am realizat pentru prima dată identificarea unor specii de microARN din planta medicinală *Calendula officinalis* (gălbenele). Folosind secvențierea de nouă generație (NGS) am identificat patru microARN din inflorescența de gălbenele, printre care și miR166a, contribuind la îmbogățirea bazei de date a speciilor de microARN vegetali prin efectuarea unor studii comparative cu alte specii de plante medicinale.
- S-a efectuat o metanaliză privind stadiul actual al cunoașterii în ceea ce privește microARNul existent în plantele medicinale, precum și mecanismele moleculare prin care acest ARN de mici dimensiuni, odată consumat, poate influența procesele biologice active din organismul animal.
- Studiul are aplicații practice în terapie. Astfel, investigarea mecanismului molecular al acțiunii plantelor medicinale în organismul consumator poate servi la caracterizarea, obținerea și utilizarea unei noi clase de compuși bioactivi, netoxici.

