

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL XIV – MICROBIOLOGIE**

**DOCTORAND  
IOANA VLAD**



**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT:  
METODE MOLECULARE DE CLASIFICARE  
A TUMORILOR MELANOCITARE –  
CARACTERIZAREA MIARN**

Conducător Științific

**PROF. UNIV. DR. CAIUS SILVIU SOLOVAN**

**T i m i ș o a r a**

**2 0 1 9**

## Contents

|                              |   |
|------------------------------|---|
| I. INTRODUCERE .....         | 3 |
| II. PARTEA GENERALĂ.....     | 4 |
| III. PARTEA SPECIFICĂ .....  | 5 |
| PARTEA EXPERIMENTALĂ.....    | 5 |
| 3.1 MATERIALE ȘI METODE..... | 5 |
| 3.2 REZULTATE .....          | 7 |
| 3.3 DISCUȚII .....           | 8 |
| IV. CONCLUZII.....           | 9 |

# I. INTRODUCERE

Melanomul este una dintre cele mai agresive tumori maligne ale zilelor noastre. Celula de origine a acestei malignități este melanocitul, care este prezent atât la nivel cutanat, cât și la nivelul organelor cum ar fi ochii, urechea internă, creierul (substantia nigra și locus coeruleus) sau a diferitelor mucoase (a leptomeningelui, a cavității orale, nazale, a sinusurilor paranazale, a laringelui, esofagiană, rectului, canalului anal, vaginului sau cervixului); fapt ce duce la posibilitatea apariției unei asemenea tumori la oricare dintre localizări pomenite.

În ultima perioadă, după decenii în care studiul acestor tumori s-a axat pe aspectele clinice, histopatologice și imunohistochimice, odată cu intrarea în era cercetării genomice, s-au încercat identificarea mutațiilor ADN care stau la baza apariției melanoamelor primare. Dintre acestea, mutațiile cel mai frecvent întâlnite în diferitele tipuri de melanom primar sunt mutațiile genelor: BRAF, KIT, NRAS, GNAQ, GNA11, PTEN, MITF, BAP1, etc. O parte dintre acestea au fost utilizate în sintetizarea unor terapii țintite cum ar fi inhibitorii BRAF sau ai căii MEK. Odată cu descoperirea importanței răspunsului imunologic în terapia diferitelor tumori maligne, s-au dezvoltat terapii imunologice specifice (anti-CTLA4 și anti-PD1) sau terapii folosind virusul herpes simplex oncolitic. Aceste terapii s-au dovedit eficiente doar în aproximativ 50% din cazuri, motiv pentru care cercetarea mai recentă s-a focalizat și pe factorii epigenetici.

Studiile epigenetice efectuate asupra acestei tumori urmăresc trei elemente cheie: metilarea ADN genomic, modificările post translaționale ale histonelor și profilele de miARN. Inițial, studiile epigenetice s-au axat în principal pe metilarea ADN-ului genomic dar în ultima vreme au apărut tot mai multe studii axate pe profilele miARN. Acestea din urmă s-au dovedit markeri tumorali cu potențial crescut în dezvoltarea terapiilor țintite și cu utilitate în determinarea prognosticului.

Scopul cercetării de față este reprezentat de studierea în paralel a modificărilor prezente în melanomul primar cutanat (MC), uveal (MU) și de mucoasă (MM) și compararea rezultatelor cu un grup de control reprezentat de nevi melanocitari. Rezultatele obținute vor servi la determinarea miARN-urilor care stau la baza apariției acestor tumori maligne de origine melanocitară. De asemenea, abordarea menționată va indica care dintre miARN-urile în cauză sunt specifice anumitor localizări, facilitând astfel o clasificare a tumorilor, și care în timp va conduce probabil la descoperirea factorilor de prognostic specifici fiecăreia. În ceea ce privește

scopul cercetării de față mai precizăm dorința determinării altor ținte terapeutice importante și în cele din urmă deschiderea drumului spre descoperirea unui tratament personalizat.

Teza de față are la bază prima cercetare publicată care utilizează array-uri specifice în detectarea modificărilor de expresie a miARN care s-au dovedit a fi implicate în reglarea căilor de semnalizare incriminate în apariția diferitelor cancere la om. Un alt element de inovație este reprezentat de aplicarea aceleiași metode de detecție și cuantificare a acelorași ținte în cadrul celor trei tipuri de melanom primar în comparație cu nevi. Astfel apărând posibilitatea comparării expresiilor diferitelor miARN-uri analizate între cele trei tipuri de melanom primar folosind tumorile melanocitare benigne ca și lot de referință.

## II. PARTEA GENERALĂ

Melanomul este o tumoră malignă care apare datorită unei proliferări necontrolate a melanocitelor. Din punct de vedere embriologic aceste celule au origine comună cu cea a sistemului nervos și gliei, pornind din celulele crestei neurale neuroectodermice. Sub influența a diferiți factori melanocitele se diferențiază și migrează în diferite zone ale corpului uman. Melanocitele, după migrare, se cantonează în țesuturi și organe, unde îndeplinesc diferite roluri și sunt influențate de diferiți factori de mediu.

În zonele fotoexpuse, cum ar fi pielea și uvea, cauza principală a apariției melanoamelor primare este reprezentată de expunerea excesivă la radiații UV. Alți factori de risc sunt: fototipul deschis, incapacitatea de a se bronză, prezența a numeroși nevi tipici sau a mai mult de 2 nevi atipici, prezența unui nev congenital de talie mare, istoric personal sau familial de melanom, supresia genetică, mutația geneor BRAF, p16 sau MC1R și supresia imunitară. În cazul melanoamelor de mucoasă provenite din zone unde nu putem incrimina implicarea razelor UV ca factor etiologic putem incrimina prezența inflamației cronice sau a altor factori de mediu locali.

Din punct de vedere al metodelor de diagnostic folosite în această tumoră există metode non invazive cum ar fi dermatoscopia și mai recent microscopia confocală in vivo, însă gold standardul rămâne examenul histologic post excizional sau incizional asociat cu reacțiile imunohistochimice. Există reactivi de imunohistochimie care ajută chiar și în orientarea conduitei terapeutice.

După stabilirea diagnosticului de melanom, în cazul tumorilor invazive, pentru stadializarea acestei malignități, sunt necesare biopsia ganglionului sentinela, computer tomografia, sau computer tomografia cu emisie de pozitoni.

Pe de altă parte, melanomul se caracterizează prin o complexitate de modificări genomice. Aceste modificări stau la baza apariției tumorilor melanocitare maligne și diferă în funcție de localizarea tumorii primare. Unele dintre ele fiind folosite ca ținte terapeutice.

Studiile din ultimii ani s-au axat asupra determinării expresiei miARN, în special în melanoamele primare cutanate și uveal. Până în prezent există doar două studii care raportează modificările de expresie miARN în melanoamele primare de mucoasă, acestea axându-se pe melanoame conjunctivale. Nu există în literatură de specialitate până în prezent studii publicate care descriu modificările de expresia a miARN în melanoame primare de mucoasă cu alte localizări (intestinal, genital, etc) și nici studii care să descrie asemănările și diferențele de exprimare ale acestei molecule în toate cele trei tipuri de melanom primar.

### **III. PARTEA SPECIFICĂ**

MicroARN-urile reprezintă un tip de ARN endogen de dimensiuni mici (17-22 nucleotide în lungime) necodant al cărui rol principal este reglajul fin al expresiei genelor. Acestea s-au dovedit a juca un rol important în dezvoltarea a numeroase afecțiuni datorită controlului pe care îl exercită asupra a numeroase procese celulare: dezvoltarea celulară, diferențierea, proliferarea și apoptoza acestora. Se estimează că acest tip de ARN reglează expresia genică în proporție de 20-30%. S-a dovedit că expresia anormală a miARN este prezentă în numeroase tipuri de cancer inclusiv în melanom, tot odată având un rol central în clasificarea cancerelor de diferite tipuri, determinarea prognosticului și răspunsului terapeutic, fiind implicate în căile de semnalizare pro- și antioncogenice.

De asemenea, microARN-urile reprezintă un grup de mediatori esențiali în rețeaua de comunicare dintre celulele noastre și mediul lor înconjurător. În melanoame acestea pot facilita sau împiedica o gamă largă de procese, incluzând răspunsul imun sau metabolismul.

## **PARTEA EXPERIMENTALĂ**

### **3.1 MATERIALE ȘI METODE**

Cercetarea de față utilizează douăzeci și șapte de piese FFPE de melanom și cinci de nevi melanocitari. Mostrele sunt obținute din arhiva secției de Anatomie-patologică a Spitalului Clinic Municipal de Urgență din Timișoara, România. Piesele incluse în studiu sunt împărțite după cum urmează 10 melanoame primare cutanate (stadiu III-IV), 10 melanoame uveal, 7 melanoame de mucoasă (2 provin din mucoasa intestinală, 2 din mucoasa genitală, 1

din mucoasa nazală, și 2 din mucoasa bucală) și cinci nevi cutanați. Pentru a reduce modificările genomice și transcriptomice cauzate de expunerea la factori externi de mediu, am utilizat un grup de control reprezentat de 5 piese de nevi melanocitari excizate de la pacienți tineri.

Alegerea pieselor din arhivă s-a efectuat în funcție de criteriile de includere prestabilite:

- Melanoame primare cutanate în nivel Clark III-IV de la nivelul trunchiului
- Melanoame primare uveale
- Melanoame primare de mucoasă
- Vechime de cel mult 3 ani
- Prezența celulelor epitelioide, fusiforme sau mixte
- Prezența zonelor care se pretează extracției miARN (80% celule tumorale)

Ca și metodă de cercetare a expresiei miARN-urilor în melanomale primare, am ales qRT-PCR în timp real asistată de array-uri cu sonde de detecție a miARN-urilor specifice, implicate în căile de semnalizare oncogenice la om. Această alegere se datorează atât specificității și sensibilității crescute a acestei metode de analiză, cât și faptului că pentru efectuarea experimentelor nu este necesară o cantitate foarte mare de miARN comparativ cu alte metode convenționale de detectare a acestei molecule. Un alt considerent este faptul că este mai puțin costisitoare decât alte metode noi de secvențializarea sau folosirea nano-matrialelor sau a nano-probelor.

Principiul care stă la baza acestei metode este unul simplu. Inițial se efectuează revers transcripția miARN în ADN complementar (cADN). Această etapă este urmată de amplificarea în timp real și analiza cantitativă. qRT-PCR este caracterizat de momentul în care un produsul amplificat al reacției de polimerizare în lanț este detectat pentru prima oară. Cu cât numărul de copii inițiale este mai mare, cu atât mai repede se poate observa o creștere semnificativă a fluorescenței.

Array-urile utilizate conțin sonde care pot identifica modificările de expresie miARN cunoscute a avea un rol important în dezvoltarea diferitelor tipuri de cancer la om. Matricile se utilizează în combinație cu SYBR Green. qRT-PCR asistat de matrici miARN permite și determinări cantitative.

### 3.2 REZULTATE

Singurele miARN-uri supraexprimate, conform rezultatelor, în toate tipurile de melanom primar în contrast cu leziunile melanocitare benigne studiate sunt miR-155-5p, miR-301a-3p, miR-9-5p, miR-142-5p, miR-19a-3p, miR-134-5p. De asemenea, cele subexprimate la nivelul celor trei grupuri de studiu în comparație cu grupul de control sunt miR-205-5p, miR-203a-3p, miR-27b-3p, miR-218-5p, miR-23b-3p. miARN-urile cu expresie modificată comune pentru populație de mostre utilizată reprezintă 18,5% din totalul miARN-urilor cu expresie modificată (11 miARN-uri).

Mai mult, se constată că majoritatea similitudinilor se regăsesc în expresia miARN din melanomele primare de tip uveal și mucoasă, în proporție de 29,6% (15 miARN-uri) din total miARN-uri cu expresie modificată: miR-133b, miR-196a-5p, miR-138-5p, miR-372-3p, miR-135b-5p, miR-206, miR-1-3p, miR-7-5p, miR-143-3p, miR-215-5p, miR-193b-3p, miR-183-5p, miR-200c-3p, miR-10b-5p, miR-149-5p.

Asemănările care s-au regăsit în expresia miARN în melanoamele primare studiate, exceptând modificările comune tuturor sunt:

- Între MC și MM: miR-127-5p, miR-146a-5p, miR-125b-5p reprezentând 5,5% din totalul miARN cu expresie modificată
- Între MC și MU: miR-130a-3p, miR-146b-5p reprezentând 3,6% din totalul miARN cu expresie modificată
- Între MU și MM sunt cele 15 prezentate anterior

La nivelul miARN-urilor studiate se remarcă, de asemenea, diferențe în expresie, în funcție de tipul de melanom primar. De exemplu 4 dintre acestea au expresie modificată doar în melanoamele cutanate (miR-92a-3p, miR-128-, miR-372-3p și miR-15a-5p), 13 au prezentat expresie modificată exclusiv în melanomul primar uveal (miR-335-5p, miR-96-5p, miR-184, miR-378a-3p, miR-29b-3p, miR-124-3p, miR-181d-5p, miR-29a-3p, miR-34a-5p, miR-214-3p, miR-100-5p, let-7i-5p, miR-10a-5p), iar 7 exclusiv în cel de mucoasă (miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-17-5p, miR-18a-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-140-5p).

Utilizând IPA (Ingenuity Pathway Finder) pentru fiecare set de date, se conturează țintele miARN-urilor care au fost semnificativ supra sau sub exprimate în rezultat (valoare  $p < 0,05$ ). Corelând baza de date IPA cu rezultatele obținute se obțin o serie de rețele de căi de semnalizare pentru fiecare set de date, și prin identificarea moleculelor comune, se obțin rețelele comasate care caracterizează fiecare tip de melanom. Țintele identificate ca fiind comune pentru toate tipurile de melanom sunt Smad2/3, Insulin, SIRT1 and TP53. Restul țintelor identificate pentru aceste tumori sunt fie unice pentru fiecare tip de melanom (35- MM,

29 – MC and 38 - MU), fie comune pentru cel puțin două dintre tipurile de melanoam testate (MM&MC – DKK1, GPSM2, ONECUT2, PRC1, RECK and SCAMP1; MC & MU - Akt și INSR; MU&MM - Interferon alpha, Pro-inflamator Cytokine, PTHLH, Rb and TERT )

### 3.3 DISCUȚII

În cadrul acestui studiu am descoperit elementele comune din punct de vedere al expresiei miARN celor trei tipuri de melanom primar, cele 11 miARN-uri menționate anterior din care miR-9-5p, miR-301a-3p, miR-27b-3p, miR-218-5p și miR-203a-3p care nu au mai fost raportate anterior pe acest tip de tumoră. Alte miARN care au prezentat expresie modificată în cel puțin unul din loturile față, nestudiate anterior pe melanom, sunt: miR-372-3p, miR-183-5p, miR-124-3p, miR-1-3p, miR-133b, miR-196a-5p, miR-215-5p, , miR-200c-3p, miR-125b-5p, miR-373-3p, miR-96-5p, miR-34a- 5p, miR-29a-3p, miR-181d-5p, miR-100-5p, miR-215-5p, miR-10a-5p, let-7i-5p și miR-196a-5p. Acestea fiind majoritatea studiate pe alte tipuri de tumori maligne și reprezentând ținte promițătoare pentru cercetarea viitoare și posibili markeri de prognostic sau chiar posibile ținte terapeutice.

Un fapt bine cunoscut este acela că cel mai frecvent întâlnit factor etiologic al melanomului cutanat este reprezentat de expunerile excesive la radiații ultraviolete (UV). Din acest motiv am creat un subcapitol în discuțiile acestei teze pentru a elucida ce efect are această expunere asupra expresiei miARN-urilor. De asemenea am dorit să observăm dacă miARN-urile raportate în literatură se regăsesc și în studiul de față și dacă diferențele regăsite în loturile studiate pot fi puse pe seama factorilor de mediu. Din miARN-urile studiate până în prezent pe această temă, 3 se regăseau și în array-ul utilizat, restul de 2 miARN-uri nefiind examinate în cercetarea de față. Dintre cele studiate, s-a observat faptul că miR-193b era subexprimat în MM și MU, iar miR-146a era subexprimat în MC și MM. Pe de altă parte miR130a-3p apare subexprimat în MC și supraexprimat în MU.

Un rezultat care trezește interes este faptul că în cercetarea de față, miR-193b și miR-146a au avut expresii conform celor raportate în studiul anterior și în cazurile de melanom de mucoasă. Acestea fiind prelevate din mucoase care nu au expunere la radiații ultraviolete.

Multe dintre miARN-urile descrise în studiul de față au fost anterior incriminate a avea un rol important în mecanismele care stau la baza dezvoltării melanomelor. Unelă dintre acestea fiind raportate a avea rol chiar și în comunicarea dintre celulele tumorale și stromă. Principalele trei mecanisme de comunicare sunt: tranziția epitelio-mezenchimală (TEM), infiltrarea imunologică și hipoxia.



Dintre miARN-urile cu expresie modificată în loturile noastre față de nevi se numără unele care influențează aceste mecanisme. Din categoria miARN care influențează TEM am regăsit modificările în expresia următoarelor: miR-205-5p, miR-200c, miR-18, miR-146a-5p și miR-125b. Pe de altă parte miR-222 care este unul dintre miARN-urile esențiale în procesul de tranziție epitelio-mezenchimală nu a prezentat modificări de expresie în loturile noastre de studiu în comparație cu lotul de control. Dintre miARN care s-au dovedit a avea rol important în răspunsul imun în studiul de față am regăsit modificări în expresia miR-21-5p, miR-29a-3p și miR-17-5p.

Trebuie menționat că datorită lipsei unui kit de reactivi axat pe acest domeniu de studiu numeroase dintre miARN-urile implicate în reglarea TEM și a răspunsului imunitar nu au fost investigate. De asemenea array-ul folosit nu prezenta reactivi pentru nici unul din miARN-urile implicate în reglarea răspunsului la hipoxie.

## IV. CONCLUZII

Cercetare de față aduce numeroase elemente de noutate în ceea ce privește expresia miARN în melanoamele primare cu diferite localizări. Prin faptul că s-a putut efectua comparația între aceste loturi am putut observa prezența asemănărilor și diferențelor între acestea. Astfel s-a putut observa prezența celor mai multe similitudini între melanoamele primare uveale și de mucoasă. De asemenea am putut identifica diferențele de expresie între cele trei tipuri de melanom primar comparativ cu nevii, identificând chiar elemente caracteristice fiecăruia. Astfel putem confirma faptul că deși aceste tumori au celula de origine comună, sunt totuși diferite din punct de vedere al expresiei miARN. MiARN-urile putând fi folosite în vederea clasificării tumorilor melanocitare.

Un alt element de noutate este reprezentat de miARN-urile cu expresie modificată în cercetarea de față, însă care nu au fost raportate până în prezent (enumerate anterior). Acestea reprezintă noi ținte de cercetare în acest domeniu pe melanomele primare.

În cadrul cercetării de față s-au îndeplinit toate obiectivele propuse inițial. Însă, este important de luat în considerare faptul că numărul de piese examinate este destul de redus. Prima direcție în care trebuie continuată această cercetare este reprezentată confirmarea expresiei noilor miARN-uri și validarea rezultatelor obținute. Rezolvarea este reprezentată de repetarea experimentul descris prin o altă metodă cantitativă de detectare a miARN-urilor de interes.

Unele miARN investigate explică o parte din mecanismele de evitarea a eforturilor de apărare ale corpului exercitate asupra melanocitelor maligne. Unele dintre ele având rol în

stimularea proliferării tumorale și a invaziei. Pe de altă parte putem observa faptul că alte miARN-uri au dinpotrivă rol de a suprima progresia tumorală având rol proapoptotic. De asemenea trebuie menționat faptul că aceste molecule s-au dovedit de-a lungul timpului a avea un rol important ca factori de prognostic și unele dintre ele, chiar ținte terapeutice.

De aceea descoperirea a noi miARN-uri caracteristice acestor tumori ne oferă oportunitatea, cu studii suplimentare de a descoperii eventuale noi ținte terapeutice. Din aceste motive, cercetarea de față deschide multiple direcții pentru viitoare studii pe această temă.

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL XIV – MICROBIOLOGIE**

**PHD STUDENT  
IOANA VLAD**



**PHD THESIS SUMMARY:**

**MOLECULAR METHODS OF CHARACTERIZING  
MELANOCYTIC TUMORS – MIRNA CLASIFICATION**

Scientific guidance by:

**PROF. UNIV. DR. CAIUS SILVIU SOLOVAN**

**Timișoara**

**2019**

**Contents**

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| I. INTRODUCTION .....          | 13 |
| II. GENERAL PART .....         | 13 |
| III. SPECIFIC PART .....       | 14 |
| EXPERIMENTAL PART .....        | 15 |
| 3.1 MATERIAL AND METHODS ..... | 15 |

|     |                   |    |
|-----|-------------------|----|
| 3.2 | RESULTS.....      | 15 |
| 3.3 | DISCUSSIONS.....  | 16 |
| IV. | CONCLUSIONS ..... | 17 |

## I. INTRODUCTION

Melanoma is one of the most aggressive forms of cancer nowadays. This tumor originates from melanocytes. These cells can be found in the skin but also in different organs like the eye, inner ear, brain (substantia nigra și locus coeruleus) or in different mucosal linings (leptomeninges, of the oral cavity, esophagus, rectum or anal canal, nasal cavity, or paranasal sinuses, larynx, vagina or cervix). For this reason melanomas can arise in any of the aforementioned sites. Most of the melanomas described in literature originate in the skin only about 5% of reported cases involve the mucosal linings, eyes and other organs.

Lately, after decades in which the study of these tumors was focused on the clinical, histopathological and immunohistochemical aspects, with the entry into the era of genomic research, attempts have been made to identify the DNA mutations underlying the appearance of primary melanomas. Of these, the mutations most commonly encountered in different types of primary melanoma are gene mutations: BRAF, KIT, NRAS, GNAQ, GNA11, PTEN, MITF, BAP1, etc. Some of these have been used to synthesize targeted therapies such as BRAF inhibitors or MEK pathways. With the discovery of the importance of the immunological response in the treatment of different malignancies, specific immunological therapies (anti-CTLA4 and anti-PD1) or therapies using herpes simplex oncolytic virus have been developed. These therapies have proven effective in only about 50% of cases, which is why more recent research has focused on epigenetic factors as well.

Epigenetic studies performed on this tumor follow three key elements: genomic DNA methylation, post-translational modifications of histones and miRNA profiles. Initially, epigenetic studies focused mainly on genome-wide DNA methylation but in recent times more and more studies focused on miRNA profiles. The latter proved to be tumor markers with high potential in developing targeted therapies and useful in determining prognosis.

The aim of the present thesis is to realize parallel study of the miRNA expression changes present in primary cutaneous (MC), uveal (MU) and mucosal (MM) melanoma, using melanocytic nevi as the control group. The results will serve to determine the miRNAs implicated in the appearance of malignant tumors with melanocytic origin. In addition to this, the chosen approach will indicate which of the miRNAs in question are specific to certain locations, thus facilitating a classification of the primary melanomas, in time, hopefully leading to the discovery of the prognostic factors specific to each one. Regarding the purpose of the present research, we also specify the desire to determine other important therapeutic targets and finally to pave the way for the discovery of a personalized treatment.

The present thesis is based on the first published research that uses specific arrays in detecting miRNA expression mutations that have been shown to be involved in regulating the main oncogenic signaling pathways incriminated in different human cancers. Another element of innovation is the application of the same method of detection and quantification of the same targets within the three types of primary melanoma compared to nevi. Thus, arising the possibility of comparing the expressions of the different miRNAs analyzed between the three types of primary melanoma using benign melanocytic tumors as a reference group.

## II. GENERAL PART

Melanomas are malignant tumors, which appear due to an uncontrolled proliferation of melanocytes. From the embryological point of view, these cells have a common origin with that of the nervous system and glia, starting from the neuroectodermal neural crest cells. Under the influence of different factors, melanocytes differentiate and migrate to different areas of the

human body. After migration, these cells are confined to different tissues and organs, where they fulfill different roles and are influenced by different environmental factors.

In the areas exposed to the sun, for example the skin and eyes the main predisposing factor for malignant transformation is the UV radiation. Other risk factors are: light phototype, inability to tan, the presence of numerous typical nevi or more than 2 atypical nevi, the presence of a large-sized congenital nevi, personal or family history of melanoma, genetic suppression, BRAF gene mutation, p16 or MC1R and immune suppression. In the case of mucosal melanomas from areas which were never exposed to UV radiation, other etiological factor that can be incriminated can be the presence of chronic inflammation or other local environmental factors.

Diagnostic methods used in this tumor can be non-invasive methods such as dermoscopy and more recently in vivo confocal microscopy, but the gold standard remains the post excisional or incisional histological examination associated with the immunohistochemical reactions. There are immunohistochemistry reagents that even help in guiding the treatment.

After establishing the diagnosis of melanoma, in the case of invasive tumors, for the staging of this malignancy the sentinel lymph node biopsy, computer tomography, or positron emission computed tomography are required.

On the other hand, melanoma is characterized by a complexity of genomic changes. These changes underlie the appearance of malignant melanocytic tumors and differ depending on the location of the primary tumor. Some of them are being used as therapeutic targets but are only effective in about 50% of cases.

For this reason, studies in recent years have focused on determining miRNA expression, especially in primary cutaneous and uveal melanomas. To date, there are only two studies that report changes in miRNA expression in primary mucosal melanomas, focusing on conjunctival melanomas. There are no published studies to date describing changes in miRNA expression in primary mucosal melanomas with other locations (intestinal, genital, etc.), nor studies describing the similarities and differences of expression of this molecule in all three types of primary melanoma.

### **III. SPECIFIC PART**

MicroRNAs are a type of small endogenous non-coding RNA (17-22 nucleotides in length) who have a major role in fine-tuning gene expression. These have been shown to play an important role in the development of many diseases due to the control they exert over many cellular processes: cell development, differentiation, proliferation and apoptosis. It is estimated that this type of RNA regulates gene expression in a proportion of 20-30%. It has been shown that abnormal miRNA expression is present in many cancers including melanoma, while also having a central role in classifying cancers of different types, determining the prognosis and therapeutic response, being involved in pro- and antioncogenic signaling pathways

Also, microRNAs represent a group of essential mediators in the communication network between our cells and their microenvironment. In melanomas they can facilitate or hinder a wide range of processes, including immune response or metabolism.

## EXPERIMENTAL PART

### MATERIAL AND METHODS

The present research uses twenty-seven FFPE melanoma samples and five melanocyte nevi. The samples are obtained from the archives of the Pathology department of the Municipal Emergency Clinical Hospital in Timișoara, Romania. The samples included in the study are represented by: 10 primary cutaneous melanomas (stage III-IV), 10 uveal melanomas, 7 mucosal melanomas (2 come from the intestinal mucosa, 2 from the genital mucosa, 1 from the nasal mucosa, and 2 from the oral mucosa) and five cutaneous nevi. To reduce genomic and transcriptomic changes caused by exposure to external environmental factors, we used a control group represented by 5 melanocyte nevi samples from young patients.

The selection of the samples from the archive was made according to the pre-defined inclusion criteria:

- Primary cutaneous melanomas at Clark III-IV level from the trunk
- Primary uveal melanomas
- Primary mucosal melanomas
- no older than 3 years
- Presence of epithelioid, fusiform or mixed cells
- The presence of areas suitable for miRNA extraction (80% tumor cells)

As a method of investigating the expression of miRNAs in primary melanomas, we have chosen real-time qRT-PCR assisted by arrays with probes for the detection of miRNAs specific for human cancer pathways. This choice is due both to the increased specificity and sensitivity of this assay method, and to the fact that a large amount of miRNA is not required to perform the expression compared to other conventional methods of detection. Another consideration is that it was less expensive than other novel methods like sequencing or using nano-materials or nano-probes.

The principle underlying this method is a simple one. Initially miRNA is transcribed to complementary DNA (cDNA). This stage is followed by real-time amplification and quantitative analysis. qRT-PCR is characterized by the time when an amplified product of the polymerization reaction in the chain is first detected. The higher the number of initial copies, the faster a significant increase in fluorescence can be observed.

The arrays used contain probes that can identify changes in miRNA expression known to play an important role in the development of different types of human cancer. The matrixes are used in combination with SYBR Green. qRT-PCR assisted by miRNA arrays also allows quantitative determinations.

### RESULTS

The only miRNAs overexpressed, according to the results, of the present study, in all types of primary melanoma in contrast to the benign melanocyte lesions studied are miR-155-5p, miR-301a-3p, miR-9-5p, miR-142-5p, miR-19a -3p, miR-134-5p. Also, those under-expressed in the three study groups compared to the control group are miR-205-5p, miR-203a-3p, miR-27b-3p, miR-218-5p, miR-23b-3p. common modified-expression miRNAs for the sample population used represent 18.5% of total modified-expression miRNAs (11 miRNAs).

Furthermore, it is found that most of the similarities are seen in the expression of miRNA in primary melanomas of the uveal and mucosal type, in proportion of 29.6% (15

miRNAs) of total miRNAs with modified expression: miR-133b, miR-196a-5p, miR-138-5p, miR-372-3p, miR-135b-5p, miR-206, miR-1-3p, miR-7-5p, miR-143-3p, miR-215-5p, miR-193b-3p, miR-183-5p, miR-200c-3p, miR-10b-5p, miR-149-5p.

The similarities found in miRNA expression in the primary melanomas studied, except for the changes common to all are:

- Between MC and MM: miR-127-5p, miR-146a-5p, miR-125b-5p representing 5.5% of total miRNA with modified expression
- Between MC and MU: miR-130a-3p, miR-146b-5p representing 3.6% of total miRNA with modified expression
- Between MU and MM are the 15 previously presented

We also found differences of miRNA expression depending on the type of primary melanoma. For example, 4 of them had altered expression only in cutaneous melanomas (miR-92a-3p, miR-128-, miR-372-3p and miR-15a-5p), 13 had altered expression exclusively in primary uveal melanoma (miR-335-5p, miR-96-5p, miR-184, miR-378a-3p, miR-29b-3p, miR-124-3p, miR-181d-5p, miR-29a-3p, miR-34a-5p, miR-214-3p, miR-100-5p, let-7i-5p, miR-10a-5p), and 7 exclusively in the mucosal type (miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-17-5p, miR-18a-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-140-5p)

Using IPA (Ingenuity Pathway Finder) for each data set, the targets of miRNAs that were significantly over- or under- expressed in result (p value <0.05) are outlined. By correlating the IPA database with the obtained results, a series of signaling pathways are obtained for each set of data, and by identifying common molecules, the merged networks that characterize each type of melanoma are obtained. The targets identified as common for all types of melanoma are Smad2 / 3, Insulin, SIRT1 and TP53. The remaining targets identified for these tumors are either unique to each type of melanoma (35 targets for MM, 29 targets for MC and 38 targets for MU), or common to at least two of the types of melanoma tested (MM&MC - DKK1, GPM2, ONECUT2, PRC1, RECK and SCAMP1; MC&MU - Akt and INSR; MU&MM - Interferon alpha, Pro-inflammatory Cytokine, PTHLH, Rb and TERT)

## DISCUSSIONS

In this study we discovered the common elements in terms of miRNA expression of the three types of primary melanoma, the 11 aforementioned miRNAs of which miR-9-5p, miR-301a-3p, miR-27b-3p, miR-218-5p and miR-203a-3p that have not been previously reported on this type of tumor. Other miRNAs that showed modified expression in at least one of the front groups, not previously studied on melanoma, are: miR-372-3p, miR-183-5p, miR-124-3p, miR-1-3p, miR-133b, miR-196a-5p, miR-215-5p, miR-200c-3p, miR-125b-5p, miR-373-3p, miR-96-5p, miR-34a-5p, miR-29a-3p, miR-181d-5p, miR-100-5p, miR-215-5p, miR-10a-5p, let-7i-5p and miR-196a-5p. These are the majority studied on other types of malignancies and represent promising targets for future research and possible prognostic markers or even possible therapeutic targets.

A well-known fact is that the most common etiological factor of cutaneous melanoma is the excessive exposure to ultraviolet (UV) radiation. For this reason, we created a subchapter in the discussions of this thesis to elucidate what effect this exposure has on miRNA expression. We also wanted to see if the miRNAs reported in the literature are also found in the present study and if the differences found in the studied groups can be accounted for by environmental factors. Of the miRNAs studied so far on this topic, 3 were also found in the array used, the remaining 2 miRNAs were not examined in the present research. Among those studied, it was observed that miR-193b was overexpressed in MM and MU, and miR-146a was overexpressed in MC and MM. On the other hand miR-130a-3p appears overexpressed in MC



and overexpressed in MU. An interesting result is that in the present research, miR-193b and miR-146a had expressions according to those reported in the previous study in the mucosal melanoma cases. These are taken from mucous membranes that have no exposure to ultraviolet radiation

Many of the miRNAs described in the present study were previously incriminated to play an important role in the mechanisms underlying melanoma development. Some of these being reported to have a role even in the communication between tumor cells and stroma. The three main communication mechanisms are: epithelio-mesenchymal transition (TEM), immunological infiltration and hypoxia.

Among the miRNAs with altered expression in the analyzed samples relative to the control samples there are some that influence these mechanisms. From the miRNA category that influences TEM, we found changes in the expression of the following: miR-205-5p, miR-200c, miR-18, miR-146a-5p and miR-125b. On the other hand, miR-222, which is one of the essential miRNAs in the epithelio-mesenchymal transition process, did not show expression changes in our study groups compared to the control group. Of the miRNAs that were shown to play an important role in the immune response in the present study, we found changes in the expression miR-21-5p, miR-29a-3p and miR-17-5p.

It should be noted that due to the lack of a reagent kit focused on this field of study, many of the miRNAs involved in the regulation of TEM and immune response have not been investigated. Also, the array used did not have reagents for any of the miRNAs involved in regulating the response to hypoxia.

## IV. CONCLUSIONS

This research brings many novel elements regarding miRNA expression in primary melanomas with different locations. Because the comparison between the studied melanoma samples was possible we could observe the presence of the similarities and differences between them. Thus, the presence of the most similarities between primary uveal and mucosal melanomas could be observed. We were also able to identify the differences in expression between the three types of primary melanoma compared to the nevi, identifying even the characteristic elements of each. Thus we can confirm that although these tumours have a common cell of origin, they are nonetheless different in terms of miRNA expression. MiRNAs can be used to classify melanocytic tumours.

Another novelty is represented by miRNAs with modified expression in the present research, but which have not been reported so far (listed above). These represent new research targets in this field on primary melanomas.

In this research, all the objectives initially proposed were met. However, it is important to note that the number of parts examined is quite small. The first direction in which this research must be continued is the confirmation of the expression of the newly identified modifications in miRNA and the validation of the obtained results. The solution is represented by repeating the experiment described by another quantitative method of detecting the miRNAs of interest.

Some investigated miRNAs explain some of the mechanisms of avoidance of the body's defense efforts on malignant melanocytes. Some of them play a role in stimulating tumor proliferation and invasion. On the other hand, we can see that other miRNAs have the opposite role of suppressing the tumor progression having a proapoptotic role. It should also be mentioned that these molecules have proven over time to play an important role as prognostic factors and some of them, even therapeutic targets.

Therefore, the discovery of new miRNAs characteristic to these tumors offer us the opportunity, with further studies to discover possible new therapeutic targets. For these reasons, the present research opens multiple directions for future studies on this topic.