

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA**



TEZĂ DE ABILITARE

REZUMAT

CONF. UNIV. DR. SÎRBU IOAN OVIDIU

DIN LABORATOR LA PATUL BOLNAVULUI SI ÎNAPOI: O POVESTE DESPRE MICROARN SI CERCETAREA TRANSLAȚIONALĂ

Sloganul „din laborator la patul bolnavului” a apărut în anii 90 (prima utilizare aparține cardiologului american Spencer King, în 1996), pentru a descrie transpunerea rezultatelor cercetării în practica clinică (screening, diagnostic, terapie, monitorizare, predicție etc.). Ca orice slogan atrăgător, începând cu secolul XXI, a început să fie utilizat abuziv uitând-se (în mod surprinzător) că face parte de fapt dintr-un citat mai lung „din laborator la patul bolnavului si înapoi”, care nu este altceva decât definiția propriu-zisă a medicinei translaționale. Acest lucru implică nu numai transferul rezultatelor cercetării în clinica, ci și utilizarea experienței / datelor obținute de medici pentru a (re)orienta și aprofunda cercetarea de laborator, un mecanism de feedback esențial pentru reușita a ceea ce este cunoscut generic ca medicină translațională.

Prezenta TEZA DE ABILITARE descrie eforturile colectivului autorului de a implementa un program de cercetare centrat pe microARN bazat pe relația biunivocă si bidirecțională dintre clinică si preclinică: cercetare fundamentală → clinică si clinică → cercetare fundamentală.

Cercetarea microRNA este unul din domeniile cu evoluție fulminantă, de la ignorarea lor (multă vreme au fost considerate simple artefacte experimentale) până la a fi considerate un centru nodal de prima mână în orice rețea de reglaj genic, cu implicații care ajung în cele mai diverse domenii ale medicinei (de la oncologie la chirurgie și psihiatrie) și biologiei (de la biologia celulară la biologia dezvoltării și ecologie).

Manuscrisul se deschide cu un capitol care delimitează într-un stil succint și cuprinzător datele actuale privind organizarea genomică, biosinteza, mecanismele de reglare a expresiei și transportul, precum și izolarea și cuantificarea microARN. Reglarea biosintezei microARN (atât la nivel transcripțional, cât și la nivel post-transcripțional) este prezentată în detaliu și include date încă nepublicate despre rolul acidului retinoic în activarea sau reprimarea expresiei locilor microARN în genomul de mamifere, în cursul etapelor de organogeneză de la mijlocul perioadei gestației la șoarece. Datele prezentate indică faptul că tranziția de la stadiul embrionar E8.0 la stadiul embrionar E8.5 este însoțită de o acumulare simultană de acid retinoic în țesuturile axiale și de activarea *de novo* a 40 de loci microARN, dintre care 50% sunt cartăți pe cromozomii 2, 7 și 12. Este important de observat că, în absența acidului retinoic (embrioni *Raldh2^{-/-}*), tocmai această activare *de novo* a locilor de microARN este cel mai afectată! O analiză Ingenuity a țintelor microARN dependente de acidul retinoic a identificat mai multe căi de semnalizare dintre care, majoritatea sunt implicate în fiziologia și patologia cardiacă, sugerând că, pe lângă extensia axială, reglarea morfogenezei cardiace este cel mai important rol al RA pe parcursul organogenezei din cursul tranziției E8.0-E8.5. Subcapitolul privind reglarea biogenezei se încheie cu o scurtă descriere a influențelor dietei asupra expresiei microARN, prezentând rezultatele experimentelor noastre privind impactul suplimentării dietei cu soia asupra miRnomului și transcriptomului la șoarecii masculi tineri.

Înțelegerea impactului ansamblului modificărilor expresiei microARN asupra homeostaziei transcriptomice necesită o bună cunoaștere a țintelor microARN în contextul celular/tisular fiziologic/patologic specific. Prin urmare, o problemă centrală a cercetării microARN a fost și este predicția de precizie a țintelor microARN. Subcapitolul privind identificarea țintelor microARN discută principalele instrumente bioinformatiche predictive utilizate, subliniind apariția algoritmilor de învățare automată/inteligență artificială. Partea centrală a acestui capitol este reprezentată de analiza microARN în contextul unei noi abordări analitice bioinformatiche, bazată pe teoria sistemelor complexe a lui Albert-László Barabási. După o scurtă introducere în aceasta teorie, prezintă particularitățile rețelei de gene la

care participa activ si microARN, subliniind avantajele acestora față de abordările clasice ale rețelei de gene si evidențiind principalele sale aplicații în cercetarea biomedicală. Nu în ultimul rând, discut pe scurt despre fluxul analitic dezvoltat împreună cu colegii de la Universitatea Politehnică din Timișoara și Institutul de Oncologie „Prof. Dr. Ion Chiricuta” Cluj-Napoca, care implică (în ordine): identificarea țintelor microARN într-un transcriptom definit prin combinarea predicției țintelor prin algoritmi de inteligență artificială TarPmiR cu construirea rețelei STRING de interacțiuni genice, analiza topologică a rețelei genice urmată de analiza ontologică folosind platforma DAVID.

Prima parte a manuscrisului continuă cu prezentarea datelor de cercetare a microARN publicate, trimise spre publicare sau nepublicate obținute prin utilizarea acestui flux analitic: microARN și boala Parkinson, microARN și fiziologia cardiacă la mamifere și microARN și cancerul.

Datele obținute în cadrul proiectului Parkinson descriu încercarea de a găsi un biomarker microARN plasmatic capabil să discrimineze între indivizii sănătoși și pacienții care prezintă semne de distrugere a neuronilor dopaminergici. Abordarea în două etape (descoperire și validare) a dus la identificarea a trei microARN asociați cu diagnosticul de boala Parkinson, indiferent de stadiul acesteia. Datele referitoare la validarea externă pe un lot de pacienți de la Harvard Neurodiscovery Center sunt discutate și analizate. În continuare am prezentat date experimentale de la pacienți, și experimente *ex vivo* și *in silico* care leagă unul din cei trei microARN de terapia cu Levodopa, subliniind importanța descoperirii unui marker de răspuns Levodopa în contextul mai larg al cercetării bolii Parkinson.

În încercarea de a înțelege care sunt posibilele surse ale microARN plasmatici identificați în experimentele proiectului Parkinson, am cuantificat expresia lor în organe (de origine embriologică diferită) de șoarece post-natal și am identificat modificări distincte și concordante legate de vârstă. Acest lucru indică faptul că vârsta ar putea fi considerată un factor de cuantificat în analiza biomarkerilor microARN la om. În continuare, am prezentat o analiză în profunzime a alterărilor funcție de vârstă a expresiei unuia dintre microARN și am prezentat date despre identificarea *in silico* a țintelor transcriptomice și a căilor de semnalizare țintă, urmată de validare experimentală (qRT-PCR și Western blot). Datele despre microARN cardiac sunt discutate în contextul de ansamblu al dezvoltării cardiace și al datele de patologie cardiacă, așa cum rezulta după screening-ul și analiza literaturii de specialitate (interogare Pubmed / HMM).

Capitolul se încheie cu analiza asocierii microARN cu cancerul la om, cu accent pe rolul microARN ca biomarkeri.

A doua parte a manuscrisului descrie succint realizările academice și profesionale pe parcursul celor douăzeci de ani de cercetare și prezintă principalele direcții de cercetare bazate pe colaborări (în curs de desfășurare) cu Prof. Mihai Udrescu (Universitatea Politehnică Timișoara), Prof. Radu Marculescu (Carnegie Mellon University) și Prof. Paul Bogdan (University of South California), în vederea dezvoltării de noi abordări analitice combinate complex network/inteligență artificială pentru analiza integrată multi-omică a datelor biomedicale.

FROM BENCH TO BEDSIDE AND BACK AGAIN: A COMPLEX MICRORNA NETWORK STORY OF TRANSLATIONAL RESEARCH

The “bench to bedside” slogan arose in the 90’s (first use in 1996, by the American cardiologist Spencer King) to describe the translation of research results into clinical practice (screening, diagnostic, therapy, monitorization, prediction, etc.). As any catchy slogan, beginning with the 21st century, it started to be overused, and, surprisingly, one has forgotten that it’s actually part of a longer quote “from bench to bedside to bench”, which is the actual definition of translational medicine. This implies not only the transfer of research results into clinics, but also making use of the experience/data gained by medical doctors to refine and deepen the laboratory research, a feedback mechanism essential for the success of what is generically known as translational medicine.

The present HABILITATION THESIS describes - to the best of the author’s means - the effort to implement a research program on microRNAs based on the biunivocal and bidirectional relationship between clinics and preclinic: fundamental research → clinics and clinics → fundamental research.

MicroRNAs evolved from being ignored and considered mere experimental artefacts to being considered a central, dominant hub in the gene regulatory networks, with implications reaching the most diverse areas of medicine (from oncology to surgery and psychiatry) and biology (from cell biology to developmental biology and ecology).

The manuscript opens with a chapter delineating in a succinct, comprehensive style the up-to-date data regarding the genomic organization, biosynthesis, gene regulation mechanisms and transport of microRNAs, microRNAs isolation and quantification. The regulation of microRNA biosynthesis (both at transcriptional and post-transcriptional level) has been thoroughly presented and included yet unpublished data about the role of retinoic acid in activating or repressing the expression of microRNA loci in the mammalian genome during mid-gestation, organogenesis stages of mouse embryo development. We show data indicating that transition from embryonic stage E8.0 to embryonic stage E8.5 is accompanied by a simultaneous accumulation of retinoic acid in the axial tissues and *de novo* activation of 40 microRNA loci, 50% of which are mapped to chromosomes 2, 7 and 12. It is important to notice that in the absence of RA (Raldh2^{-/-} embryos), it is exactly this *de novo* activation of microRNA loci which is suffering the most! A crude Ingenuity Pathway Analysis of the retinoic acid-dependent microRNA targets identifies with an overwhelming majority signaling pathways involved in cardiac physiology and pathology, suggesting that besides axial extension, cardiac morphogenesis is the most important role of RA during E8.0-E8.5 transition. The subchapter on biogenesis regulation concludes with a short description of dietary influences on microRNA expression, outlining our result on soy diet supplementation impact on young male mice liver miRnome and transcriptome.

Understanding the impact of miRnome and miRnome changes upon transcriptome homeostasis requires a good knowledge of microRNA targets in the particular cellular/tissue, physiological/pathological context analyzed. Therefore, a central issue of microRNA research has long been and still is the accurate prediction of microRNA targets. The subchapter on target identification discusses the main bioinformatics tools used to predict the impact of a microRNA, emphasizing the rise of machine learning/deep learning algorithms.

The core of the chapter is represented by the analysis of microRNAs within the context of a novel bioinformatics, complex systems analytical approach opened by the work of Albert-László Barabási: the (complex) network theory. After a brief introduction into network theory,

I present the particularities of gene network and microRNA-gene network theory, emphasizing its advantages versus classical gene network approaches and underline its main applications in biomedical research. I briefly discuss the analytical workflow I have developed together with colleagues from Polytechnic University of Timisoara and The Oncology Institute "Prof. Dr. Ion Chiricuta" Cluj-Napoca, which involves (in order): identification of microRNA targets within a defined transcriptome by combining TarPmiR machine learning target prediction, STRING gene-gene network building, Complex Network Analysis and DAVID ontological analysis.

The first part of the manuscript continues with the presentation of already published, submitted or unpublished microRNA research data obtained by using this workflow: microRNAs and the Parkinson's disease, microRNA and the mammalian heart and microRNA and cancer.

The Parkinson data describe the attempt to find a plasma microRNA biomarker able to discriminate between healthy controls and patients with dopaminergic neurons destruction. The two-step (discovery and validation) approach led to identification of three microRNAs associated with the Parkinson's diagnostic, irrespective of the stage of disease. Data regarding a second validation on an external (Harvard Neurodiscovery Center) lot of patients are discussed next. I present experimental data from patient, *ex vivo* and *in silico* experiments linking one the three microRNAs to the therapy with LevoDOPA, emphasizing the importance of discovering a LevoDOPA response marker in the larger context of Parkinson disease research as depicted by Pubmed/HDMM literature screening.

In an attempt to understand the source of the plasma microRNAs discussed in Parkinson experiments, we have quantified the expression of the three microRNAs in post-natal mouse organs of different embryological origin and showed distinct and concordant age-related changes. This indicates that age could be regarded as a confounding factor in the analysis of microRNAs biomarkers in humans. Next we show an in-depth analysis of age-related change of one of the microRNAs and present data on *in silico* identification of its transcriptome and signaling pathways, followed by experimental validation (qRT-PCR and western blot analysis). The heart microRNA data are further discussed in the context of cardiac development, and cardiac pathology data as pictured after Pubmed/HDMM literature search.

The chapter concludes with a brief analysis of the association of microRNAs with cancer in humans, with an emphasis on the role of microRNAs as biomarkers.

The second part of the manuscript succinctly delineates the academic and professional achievements over the twenty years of research and outlines the main directions of future research, based on ongoing collaborations with Prof. Mihai Udrescu (Polytechnics University Timisoara), Prof. Radu Marculescu (Carnegie Mellon University) and Prof. Paul Bogdan (University of Southern California), towards developing novel Complex Network/Deep Learning approaches for multi-omics integrative analysis of biomedical data.