

RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC

Etapa 2/2013

Conform Planului de realizare a proiectului, pentru etapa 2/2013, acesta a avut urmatoarele obiective:

- Conceperea de sonde specifice pentru structuri de tip array pentru cancerul de colon;
- Design al materialelor suport si al structurilor de tip array; fabricarea de prototipuri pentru cancerul de colon. Monitorizarea parametrilor tehnici si fizico-chimici si realizarea de teste preliminare;
- Design al materialelor suport si al structurilor de tip array pentru cancerul de san;
- Diseminarea rezultatelor: publicarea rezultatelor în reviste nationale si internationale si prezentarea de comunicari stiintifice;
- Workshop intermediar de analiza critica a proiectului;
- Pregatirea si prezentarea raportului de faza.

Obiectivele mentionate au fost realizate, datele si rezultatele concrete obtinute in cursul derularii fazei fiind prezentate in continuare.

Conceperea de sonde specifice pentru structuri de tip array pentru cancerul de colon

Cancerul de colon (denumit si "cancer sau carcinom colorectal" - CRC) este unul dintre cele mai frecvente cancere, ocupând, la total (ambe sexe), pe plan mondial, locul trei între neoplazii si reprezentând a cincea cauza de deces prin cancer - date din GLOBOCAN / IARC Lyon / Organizatia Mondiala a Sanatatii, 2008 care estimeaza o incidenta de 1.235.000 cazuri noi anual si o mortalitatea de 609.000 cazuri; vezi pentru detalii, raportul de faza pe anul 2012 al proiectului. Pentru diverse tari inasa, situatia poate fi diferita, putand reprezenta situatii mai dramatice; o astfel de situatie se intalneste si in cazul Romaniei, in care atat la total, cat si la ambele sexe (barbati / femei), atat la incidenta, cat si la mortalitate se situeaza pe locul doi (vezi acelasi raport), ceea ce justifica, inca o data realizarea prezentului proiect.

În cancerogeneza colorectala, ca urmare a alterarilor genetice, celulele epiteliale ale mucoasei își pierd stabilitatea genetica si apare predispozitia spre boala, în special adenocarcinoame. Ca si in cazul multor altor forme de cancer, CRC poate fi generat si controlat de afectari ale materialului genetic. Astazi s-a dovedit relatia dintre pierderea stabilitatii genetice si predispozitia spre cancer, care include: deficientele de reparare a acidului dezoxiribonucleic (ADN), mutatiile, metilari aberante ale promotorilor unor gene, pierderea punctelor de control în ciclul celular si disfunctii ale functionalitatii proteinei p53 si a altor proteine cheie.

Problema implicării factorilor genetici în cancer este deosebit de complexă, datorită numărului extrem de ridicat al schimbărilor genetice, deoarece genomul uman conține aproximativ 30.000 de gene umane, fiecare dintre ele având cel puțin două forme, ceea ce conduce la cel puțin 2^{30000} sau 10^{9031} combinații posibile ale genelor normale. Dacă se adaugă și mutațiile produse la nivelul ADN - extrem de numeroase uneori, spre exemplu în cazul genei supresoare p53 au fost decelate peste 300 de mutații punctiforme, rezultă un număr imens de modificări cu potențial oncogen. Deși nu toate modificările structurale ale ADN conduc la boala canceroasă, rămâne un număr ridicat de situații de risc, fiecare dintre ele producând un număr mare de schimbări genetice alternative care pot genera cancer sau interveni în evoluția și controlul bolii, fiecare cu specificități particulare. Deoarece problema este complexă, ea trebuie studiată cât mai intens posibil, nu numai din motive științifice - identificarea mecanismelor/cailor de apariție/evoluție a bolii, ci și pentru detalierea diagnosticului/prognosticului și nu în ultima instanță, pentru atingerea unui obiectiv extrem de dorit, acela de individualizare a tratamentului.

CRC își are originea în celulele epiteliale ale captuselii tractului gastrointestinal (colon, rect și apendice). Multe dintre cancerurile colorectale se presupune că se dezvoltă din polipii adenomatoși și hamartomatoși din colon. Acești polipi au aspectul unor ciuperci și, de obicei, sunt benigne. Însă de-a lungul timpului, netratați, pot evolua în cancer. Cea mai răspândită formă de cancer colorectal o reprezintă adenocarcinomul - aproximativ 95% dintre cazuri.

Printre cauzele de risc în CRC se numără: vârsta, dieta, sedentarismul/lipsa activităților fizice/sportive, fumatul și alcoolul, rasa, factorii de mediu, sexul - atât femeile cât și bărbații pot dezvolta canceruri colorectale; se pare însă că bărbații au o ușoară predispoziție în a dezvolta canceruri de rect, iar femeile canceruri de colon, zona geografică - CRC este considerat că fiind specific zonelor dezvoltate - țările vestice/zona urbane, starea de sănătate generală a bolnavului.

Din punct de vedere genetic se consideră că CRC este mai degrabă o boală familială / mostentită, decât una rezultată spontan; peste 15% din cancerurile colorectale sunt sindroame familiale, mostenite și ele reprezintă factorii cu riscul cel mai ridicat de incidență al tumorilor tractului gastrointestinal. Numărul de gene implicate în cancerul colorectal este foarte mare numărând, printre altele: APC (*adenomatosis polyposis coli*), unele din genele implicate în repararea ADN (ex. MYH), LKB-1, BMPR1A, SMAD4, ENG, PTEN, PTCH, p53, bcl-2, myc, BRAF, GST, majoritatea acestora făcând parte din categoria genelor supresoare tumorale, pierderea funcției acestora (ex. prin mutații) putând astfel explica instalarea caracterului malign.

Unele dintre principalele oncogene implicate în multiple forme de cancer, inclusiv CRC sunt cele care aparțin familiei ras, în special K-ras.

K-ras (**K**irsten **R**at **S**arcoma) conține instrucțiunile necesare pentru sinteza proteinei Kras, implicată în reglarea diviziunii celulare. **K-ras** codează o oncoproteină asociată cu membrana celulară ce aparține familiei de GTP-aze Ras și care este activată în etape timpurii ale unor cai de transducție a semnalului molecular. Ea acționează ca un "switch on/off" molecular care, odată pornit recrutează și activează proteine necesare propagării factorilor de creștere (FGF, VEGF, etc). Ca parte a cascadei de semnalizare RAS/MAPK (**R**at **S**arcoma/**M**itogen **A**ctivated **P**rotein **K**inase), proteina amplifică semnalele primite din mediul extracelular, jucând un rol important în transmiterea acestora în nucleul celulei. Aceste semnale dau instrucțiunile necesare celulei pentru a se divide și a crește sau pentru a se maturiza și diferenția. Proteina Kras acționează ca un comutator molecular și este activată sau inactivată de GTP (guanozin-5'-trifosfat) și GDP (guanozin-5'-difosfat) - atunci când este legată de GDP, nu transmite semnale către nucleu.

O semnalizare crescută a Kras este implicată în cancerogeneza colorectală și progresia tumorii. Mutațiile la nivelul genei KRAS sunt întâlnite în 30-60% în cadrul cancerului colorectal.

(Wicki, 2010). Aproximativ 90% dintre mutatii apar la nivelul codonilor 12 si 13, din exonul 2 al genei KRAS, care sunt critici în activitatea biologica a proteinei transcrise. Mutatii mai putin frecvente au loc la nivelul codonilor 61 si 146 (cu o frecventa de aproximativ 5%). Mutatiile produse in structura genei KRAS conduc la transcrierea unei proteine cu activitate GTP-azica pierduta si o activare constitutiva a semnalizarii Kras. Aceste mutatii reprezinta tinta terapiei cu Cetuximab în cancerule coloretale.

Mutatiile identificate in exonul 2 al genei KRAS se pot subdivide in transversii si tranzitii. Ambele evenimente determina schimbarea aminoacidului glicina cu un alt aminoacid în structura proteinei codificate. Tranzitia implica inlocuirea unei baze purinice (A, G) sau pirimidinice (C, T) cu o baza de acelasi tip, în timp ce transversia presupune inlocuirea unei baze purinice cu o baza pirimidinica sau vice versa. In cancerul coloretal apar ambele tipuri de mutatii.

Unul dintre obiectivele principale ale proiectului este realizarea de structuri de tip array capabile sa deceleze rapid mutatii ale genelor normale.

Investigarea profilurilor de expresie genica este o metodologie noua de caracterizare a cancerelor la nivel molecular, ceea ce tinde sa fie un instrument foarte util, datorita potentialului de îmbunatatire al interventiilor clinice.

Au fost realizate mari progrese în dezvoltarea diferitelor tehnici si echipamente, proiectate pentru a detecta si evalua prezenta modificarilor în expresia genica si în special, pentru a decela între probele normale si maligne. Una dintre tehnicile utilizate în studiul expresiei genice este tehnologia microarray, care a avut o evolutie rapida în ultimii ani.

Tehnica microarray este reprezentata de o colectie de spoturi ADN, microscopice, atasate de o suprafata solida. Una dintre aplicatiile tehnicii este masurarea simultana, a nivelului de expresie a unui numar mare de gene. Fiecare spot ADN contine cantitati mici, de ordinul pM dintr-o secventa ADN specifica, denumita *sonda*. Secventele tinta, marcate fluorescent, care se leaga de sonda, genereaza un semnal care depinde de gradul de hibridizare determinat de numarul de perechi de baze, de conditiile de hibridizare si de etapa de spalare dupa hibridizare. Intensitatea semnalului depinde de cantitatea de proba, atasata la nivelul sondelor prezente în spot.

Principalele obiective sunt reprezentate de optimizarea parametrilor care tin de o atasare buna a sondelor ADN si care sa permita procesul de hibridizare, pentru a trece apoi, la studiul secventelor oligonucleotidice corespunzatoare codonilor 12 si 13 din exonul 2 al genei KRAS si a principalelor substitutii nucleotidice aparute, care cresc predispozitia aparitiei cancerului coloretal.

Pentru atingerea obiectivului de realizarea de structuri array specifice pentru gena K-ras s-a pornit de la structura primara a acestei gene, care contine 33541 pb (perechi de baze) si codeaza o proteina de 189 aa. Din motive de spatiu se reprezinta numai structura exonului 2 al genei, exon ce contine 122 pb (se reda catena **5' - 3'**):

**5'GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAG
GCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGA
TCCAACAATAGAG 3'**

(sunt subliniate nucleotidele de interes din codonii 12 si 13).

In fig.1 sunt redete mutatiile identificate la nivelul acestor codoni; sunt posibile modificari ale unui singur nucleotid din codon (partea superioara a graficului), dar si schimbarea a doua sau chiar trei nucleotide din structura codonului.

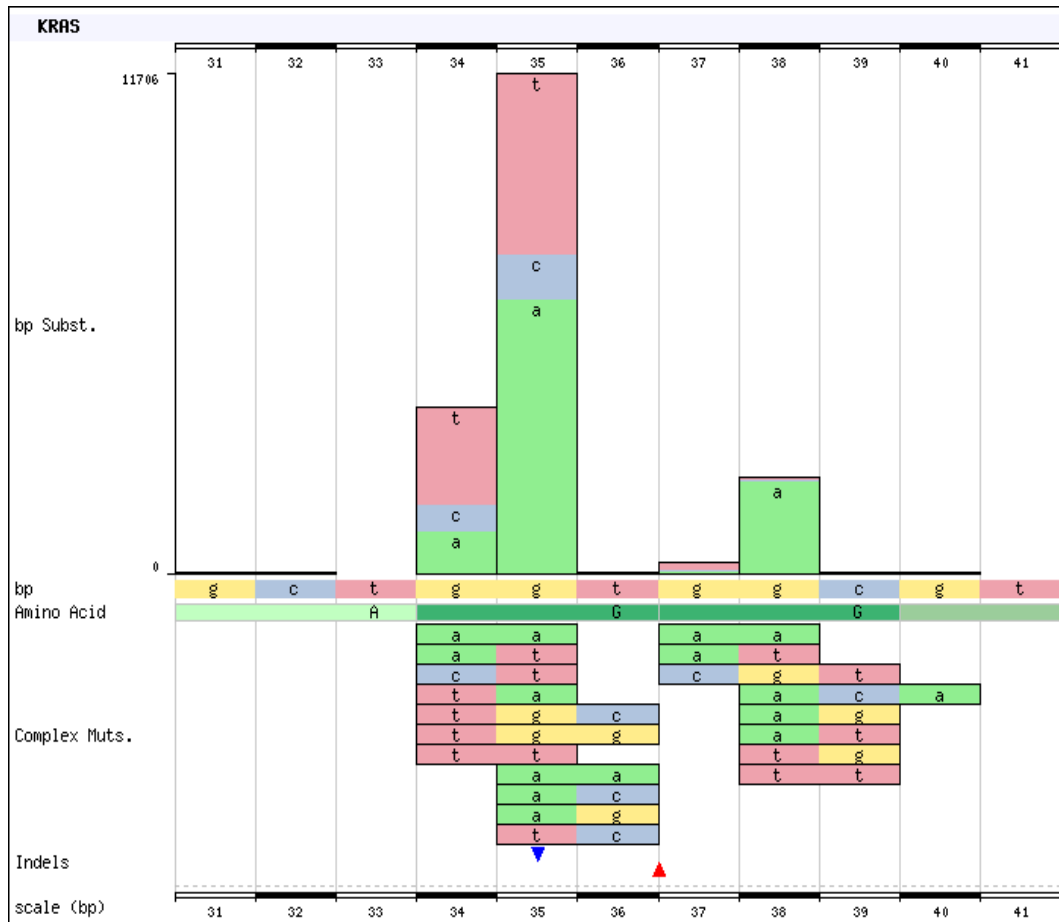


Fig.1. Mutatii la nivelul codonilor 12 si 13 din exonul 2 al genei Kras

Tinand cont de situatia prezentata, pentru constructia de sonde specifice si asigurarea unei specificitati cat mai ridicate, s-a decis realizarea unor sonde de 40 baze:

GGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACG

la capete fiind selectate baze aminice (G) care asigura o mai buna legare de suportul solid. S-a prevazut realizarea de sonde in care G sa fie inlocuit cu A, C, T, pentru primul nucleotid si al doilea nucleotid din codonul 12, respectiv, T, pentru primul nucleotid si A, pentru cel de-al doilea, din codonul 13. In mod corespunzator se realizeaza sonde pentru catena complementara.

Design al materialelor suport si al structurilor de tip array; fabricarea de prototipuri pentru cancerul de colon. Monitorizarea parametrilor tehnici si fizico-chimici si realizarea de teste preliminare

Principala componenta a Planului de activitate pe anul 2013 a vizat realizarea de structuri de tip array si efectuarea de teste preliminare privind prezenta unor modificari mutationale in probe provenite de la bolnavi cu cancer colorectal.

a. Obținerea de prototipuri de tip array

Materiale și reactivi

Studiile au fost realizate pe secvențe oligonucleotidice de tipul celor menționate anterior, (sens/antisens) care au fost achiziționate de la firma Biomers (Germania). Sondele au fost modificate la gruparea $-NH_2$ de la capatul 5' fiind marcate cu un agent fluorescent - Cy3.

Ca material suport solid s-au folosit lame de sticlă (25 x 76 mm), funcționalizate cu aldehida, lame provenite de la Arrayit Corporation (SUA).

Celelalte substanțe și reactivi folosiți au fost achiziționați de la Sigma Aldrich (SUA).

Fabricarea microarray

Pentru obținerea structurilor de tip array au fost parcurse mai multe etape:

Optimizarea concentrației de sonde ADN atașate pe suport

Pentru obținerea sondelor au fost realizate 4 diluții seriale în apă deionizată, pornind de la o concentrație a secvențelor oligonucleotidice de $0,2 \mu M$ (vezi tabelul următor, Tabelul 1).

Tabelul 1. Valori de concentrații de sonde utilizate

Varianta	Concentrații finale (μM)
A (C5)	0,2
C (C3)	0,05
D (C2)	0,033
E (C1)	0,025

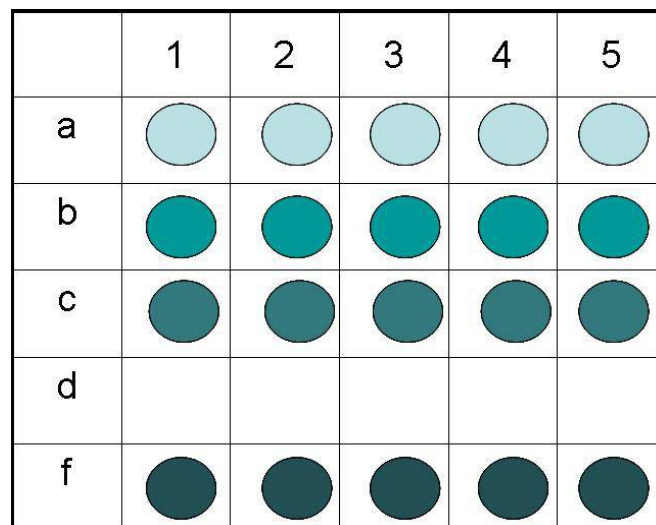


Fig. 2. Configurația concentrațiilor depuse pe suprafața

Imprimarea secventelor oligonucleotidice pe suport

Pentru fiecare dintre cele 4 concentratii diferite de secvente oligonucleotidice au fost realizate teste pe cate 2 lame de sticla, functionalizate cu aldehida, cu ajutorul Omni Grid Micro Printer (Genomic Solutions). Pentru fiecare concentratie au fost realizate cate 5 replici/array, cu distanta dintre spot-uri de 500 μm . Toate spot-urile au fost adaugate utilizând un singur vârful, pentru a elimina erorile induse de diferite tipuri de vârfuluri. Schema fabricarii micro-matricii este reprezentata în fig. 2. Timpul de printare al lamelor a fost de 20 min; dimensiunea vârfului folosit a fost de 200 μm ; umiditatea din incinta de imprimare a fost de 80% si temperatura de 25°C. Toate spoturile au fost depuse prin contactul intre pinul alimentat timp de 5s in solutie si suprafata funtionalizata de sticla. Timpul de depunere a fost stabilit la 10s pentru a se permite transferul de proba intre pin si suprafata. Imprimarea sondelor pe cele doua suporturi de sticla a fost urmata de incubarea peste noapte, la anumiti parametri de temperatura si umiditate.

Optimizarea etapei de legare a sondelor ADN pe suport

Parametrii precum: timpul de incubare, umiditatea si temperatura, sunt importanti în eficientizarea reactiei de legare a sondelor de ADN la suprafata functionalizata. Pentru optimizarea procesului de legare la suport, au fost testate mai multe variante: placutele cu secventele oligonucleotidice imprimate au fost incubate, la 4°C, respectiv, la temperatura camerei, la umiditate 80%, 21 de ore, pentru a permite formarea bazelor Schiff între gruparea 5'-NH₂ si aldehida de pe suprafata functionalizata.

Spalarea suportului solid

Urmatoarea etapa a fost reprezentata de spalarea suportului, pentru a se înlatura excesul de oligonucleotide (cele care nu s-au legat); spalarea s-a realizat cu apa deionizata sub agitare usoara, timp de 5 min.

Blocarea legarii nespecifice a secventei oligonucleotidice complementare la suportul solid

Etapa de blocare a ariei active ramase este necesara pentru evitarea unor legari nespecifice a secventei oligonucleotidice complementare la suportul solid. Blocarea ariei s-a realizat cu solutie de BSA 6%, pregatita în SSC 5X si SDS 0,1%.

Lamele au fost imersate în solutia de BSA 6%, timp de 30 min, la 40°C si 250rpm. Ulterior, lamele au fost spalate cu SSC 1X, 5 min, apoi cu apa deionizata, 5 min si uscate.

Hibridizarea

Etapa de hibridizare a probelor cu sondele atasate de lama a avut loc în camera umeda, pentru a fi evitata evaporarea tinteii. Pe fiecare lama s-au adaugat 5 μL de proba marcata fluorescent si ulterior, acoperite cu lamele de sticla. Lamele au fost incubate la 40°C, la 250 rpm, timp de 18 ore.

Detectia semnalului

Microarray-urile au fost scanate la o lungime de unda de 532 nm (canalul Cy3) la o rezolutie de 5 μm /pixel, utilizând un laser de scanare confocal (UC4 Microarray Scanner, Genomic Solutions). Pentru experimentul microarray, PMT gain a fost într-un interval de 20-40%. Imaginile au fost analizate prin cuantificarea densitatii de pixeli (intensitate) a fiecarui spot, utilizând Gene TAC Analyzer (Genomic Solutions).

Utilizând softul Gene TAC Integrator, s-au efectuat ajustari si prelucrari ale imaginilor (alinieri ale spot-urilor). Imaginea generata de scanner este analizata si convertita in valori numerice

corespunzatoare intensitatii florescente a fiecarui spot. Astfel softul genereaza un fisier de date ce contine informatii pentru fiecare spot (identificarea sporului fiind dupa un cod tip matrice) tinand cont de valoarea semnalului de background (fond).

Din analiza intensitatilor spot-urilor, care sunt în corelatie cu gradul de hibridizare al ADN, putem deduce ca imobilizarea sondelor a avut loc atât la 4°C, cât si la 25°C si umiditate de 80%.

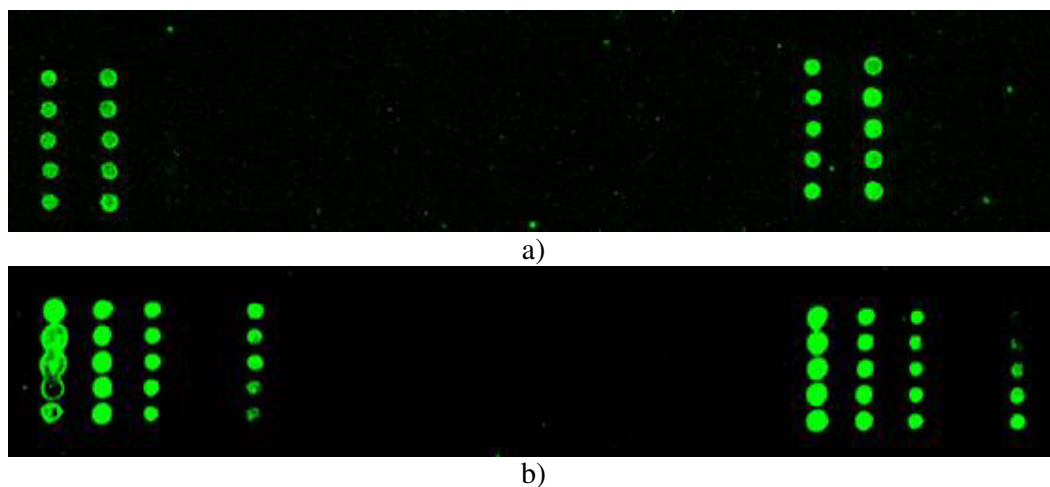
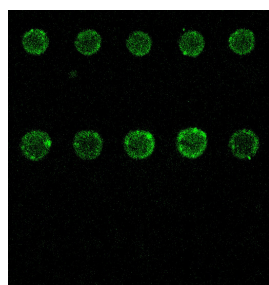
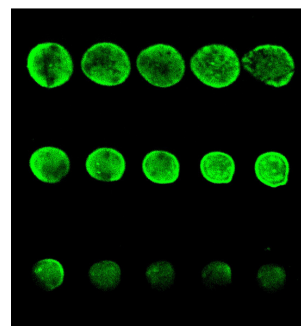


Fig. 3. Imagine a lamelor scanate dupa hibridizare pentru 2 arrayuri/ slide a) incubare la frigider, b) incubare la temperatura camerei (25°C)

În fig.3 se observa ca, în cazul incubarii lamei la 4°C, apar 2 rânduri de spot-uri, corespunzatoare celor mai diluate sonde ADN, pe când, în cazul incubarii lamei la 25°C si umiditate 80%, apar 4 rânduri de spot-uri, corespunzatoare concentratiilor depuse initial.



Incubare sonde la 4°C



Incubare sonde la 25°C

Fig. 4. Detalii pentru structuri array pentru evidentierea variatiilor de intensitate obtinute dupa hibridizare

S-a observat ca, la o concentratie mai mare de sonda ADN atasata de suport, procesul de hibridizare este inhibat, intensitatile fiind scazute, pe când la o concentratie mai mica de sonda ADN, are loc o hibridizare mai buna si mai uniforma.

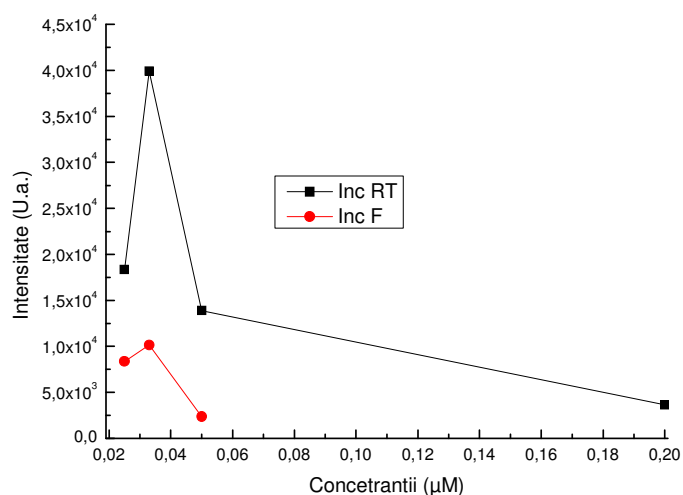


Fig. 5. Dependenta raspunsului florescent dupa hibridizare de concentratia de ADN imobilizata initial.

Graficul din fig. 5 prezinta dependenta concentratiei de ADN imobilizata pe suprafata in functie de intensitatea raspunsului florescent obtinut dupa hibridizare, mediata pentru cele 5 replici de aceeaasi concentratie.

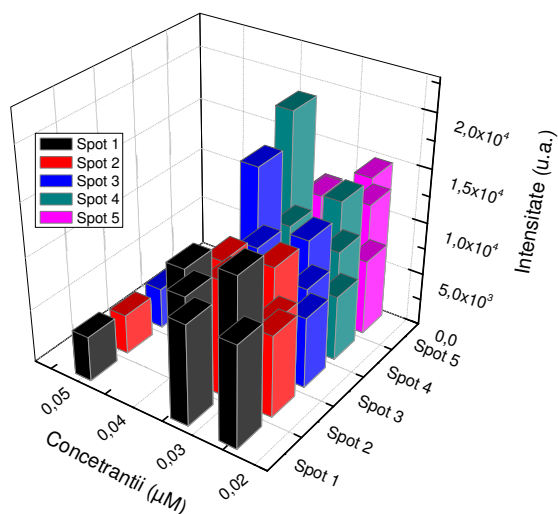


Fig.6. Omogenitatea raspunsului pentru array-ul incubat la 4°C

In fig. 6 se prezinta o evaluare a omogenitatii raspunsului pentru cele 3 arrayuri corespunzatoare lamei incubate 4°C, datele fiind folosite pentru selectia unor variante optime de structuri de tip array.

În concluzie, prin experimentele realizate au fost stabiliti parametri optimi ai procesului de atasare al primerilor de suportul de sticla functionalizata cu aldehida si concentratia acestora, care permite o buna atasare a probelor, inclusiv sub aspectul detectiei hibrizilor formati.

b. Studii preliminare ale unor probe de cancer de colon. Studiul mutatiilor KRAS prin secventiere automata

Secventierea ADN este considerata tehnica gold (de referinta) standard pentru detectia mutatiilor. Ea permite determinarea ordinii nucleotidelor in secventa ADN de interes. Secventierea automata se bazeaza pe o metoda enzimatica de secventiere dezvoltata de Sanger si colab in 1977 si este larg folosita in laboratoarele de diagnostic molecular. Metoda Sanger consta in utilizarea unor nucleotide modificate – 2',3'dideoxiribonucleotid trifosfati (ddNTP) – care joaca rolul de terminatori de lant in timpul reactiei de polimerizare enzimatica a ADN. Fiecare din cele patru ddNTP (A, T, C si G) sunt marcate cu fluorocromi diferiti fapt ce permite detectia lor individuala. Deoarece incorporarea ddNTP in catena DNA determina blocarea elongarii, in final se obtine un amestec de fragmente ADN de diferite lungimi. Fragmentele ADN nou sintetizate si marcate sunt apoi separate prin electroforeza capilara. Semnalele fluorescente sunt detectate de un analizor automat, iar ordinea nucleotidelor in ADN-ul de interes este prezentata sub forma unei electroferograme.

Mutatiile heterozigote, cum este cazul mutatiilor *hot spot* ale genei KRAS, sunt reprezentate in electroferograma sub forma unor peak-uri suprapuse (corespundatoare alelei normale si mutate), localizate in dreptul nucleotidului mutat.

Analiza automata a secventelor este o tehnica relativ scumpa, care necesita personal calificat. Studiile anterioare privind sensibilitatea acestei tehnici au demonstrat ca ea permite detectia a 10%-30% celule mutate intr-un amestec heterogen.

Scopul: Studiul si-a propus optimizarea protocolului de secventiere directa a exonului 2 al genei KRAS si analiza mutatiilor in probe de tumori colorectale avansate, a caror status mutational a fost determinat, anterior, prin metoda High Resolution Melting (HRM).

1. Materiale si metode

1.1. Procesarea probelor de tesut tumoral

Probele de tesut tumoral colorectal (n = 54) au fost obtinute prin excizie chirurgicala de la pacienti internati in Institutul Oncologic Bucuresti. Tesutul a fost conservat la -80 °C pana in momentul extractiei ADN.

1.2. Izolarea ADN

Pentru izolarea ADN genomic s-a folosit kitul de extractie QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) conform recomandarilor producatorului. Dupa incubarea omogenatului tisular cu Proteinaza K la 56°C peste noapte, ADN liber de RNA a fost obtinut prin adaugarea a 8 µl de 50 µg/ml RNase A (Qiagen). ADN a fost apoi eluat in 50 µl tampon AE (component al kitului de extractie). Concentratia ADN a fost determinata prin citirea absorbantei la 260 nm cu ajutorul spectrofotometrului Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies).

1.3. Amplificarea PCR

Un fragment de 237 pb, ce cuprinde exonul 2 al genei KRAS, a fost amplificat folosind primeri oligonucleotidici sens si antisens cu cozi M13 pentru a facilita reactia de secventiere ulterioara. Primerii au avut urmatoarele secvente KRAS-2F: 5'-tgtaaacgacggccagtTGTGACATGTTCTAATATAGTCACATT-3' si KRAS-2R: 5'-caggaaacagctatgaccACCAGTAATATGCATATTTAAACAAGA-3'. Reactia de amplificare s-a realizat in 25 µL continand 1× tampon PCR, 0,125 mM dNTP (fiecare), 2mM MgCl₂, 0,3 µM din

fiecare primer, 1 unitate AmpliTaq Gold DNA Polimeraza (Applied Biosystems) si 50 ng de ADN genomic. Programul de amplificare, derulat pe instrumentul Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf), a inclus o etapa de denaturare de 10 min la 94 °C, urmata de 35 de cicluri cu urmatorul profil: 94 °C pentru 30 sec, 58 °C pentru 45 sec si 72 °C pentru 45 sec, incheiate cu o etapa de extensie finala la 72 °C timp de 10 min. Produsii de amplificare au fost analizati in urma electroforezei in gel de 2% agaroză cu bromura de etidiu.

1.4. Purificarea produsilor PCR si reactia de secventiere ciclica

Produsii de amplificare au fost tratati cu compusul enzimatic ExoSAP-IT (USB Corporation) in scopul indepartarii primerilor PCR si a dNTP neincorporati, conform protocolului recomandat de producator.

Secventierea produsilor de amplificare a fost realizata in ambele sensuri.

Amestecul de reactie pentru secventierea ciclica a constat din 4 µL BigDye Terminators v3.1 mix 3,2 pmoli primer universal de secventiere (M12-F: 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3', respectiv M13-R: 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'), 1 µL produs PCR purificat si apa pana la volum de 10 µL. Programul de secventiere ciclica, derulat pe instrumentul Veriti Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems), a constat dintr-o etapa de denaturare la 96°C timp de 1 minut si 25 cicluri – 96°C pentru 10 sec, 50°C pentru 5 sec si 60°C pentru 2 minute.

Produsii reactiei de secventiere au fost purificati folosind kitul BigDye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystems) in scopul indepartarii excesului de ddNTP.

1.5. Electroforeza capilara si analiza automata a secventei

Produsii de secventiere purificati au fost analizati pe Analizorul Genetic 3500 (Applied Biosystems) utilizand modulul preconfigurat BDxRapidSeq50_POP7. Datele colectate au fost analizate cu ajutorul programului Variant Reporter v1.1 pentru identificarea mutatiilor in fiecare proba.

2. Rezultate

In lotul examinat au fost identificate 24,1% (13/54) probe cu mutatii in exonul 2 al genei KRAS prin secventiere automata si 37% (20/54) prin HRMA.

Dintre cele 12 tipuri de mutatii posibile care pot afecta codonii 12 si 13, cinci au fost prezente in probele analizate (Tabelul 2, fig.7). Toate mutatiile constatate au fost substitutii nonsens.

Tabelul 2
Tipuri de mutatii identificate in tumori colorectale

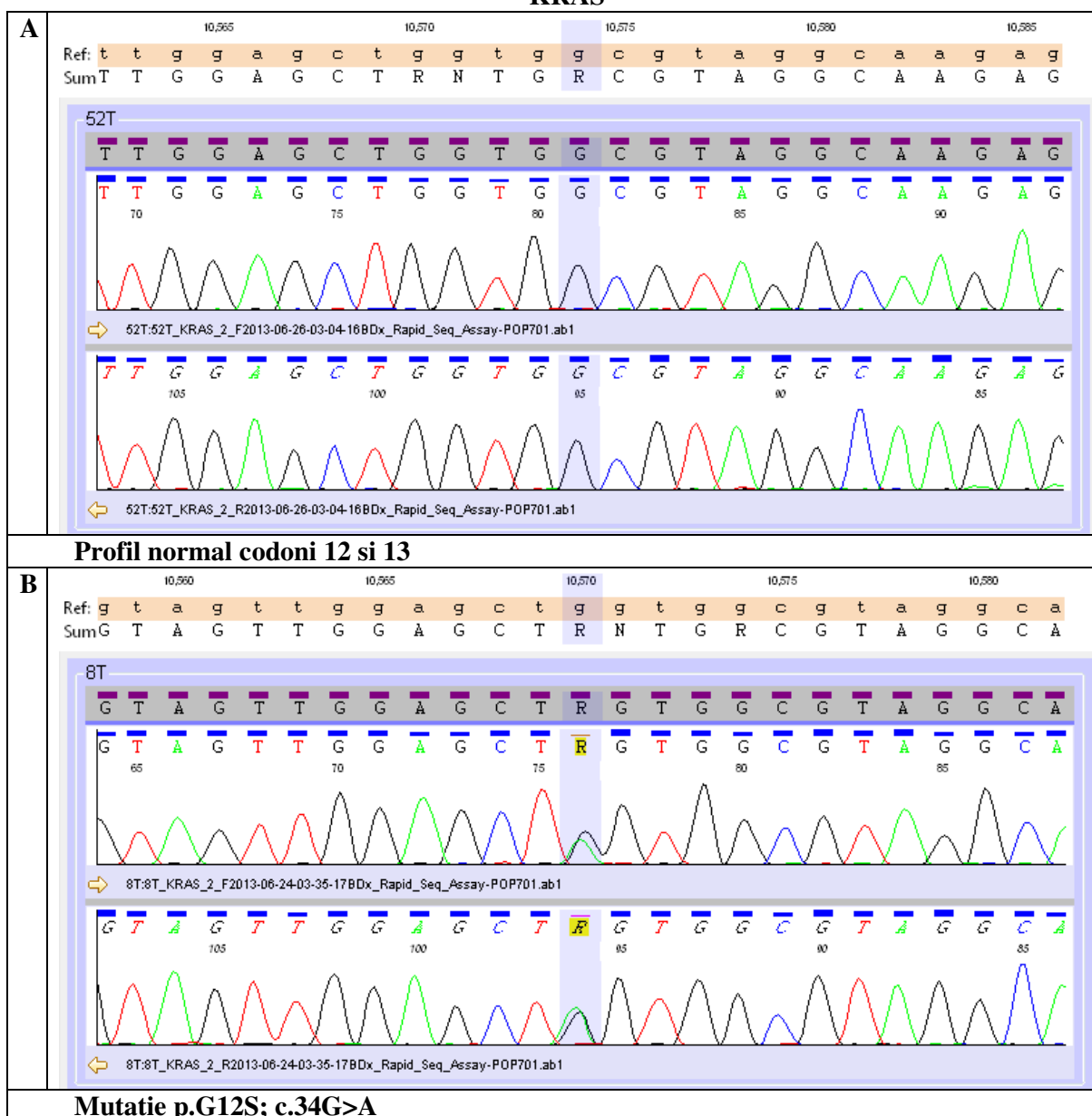
Codon	Baza	Tip normal	Mutat	Aminoacid	Cazuri (%)
12	1	GGT	<u>A</u> GT	Gly12Ser	4 (30,8)
		GGT	G <u>A</u> T	Gly12Asp	2 (15,4)
	2	GGT	G <u>T</u> T	Gly12Val	2 (15,4)
		GGT	G <u>A</u> C	Gly12Ala	1 (7,7)
13	2	GGC	G <u>A</u> C	Gly12Asp	3 (23,1)
22	1	CAG	<u>A</u> AG	Gln22lys	1 (7,7)

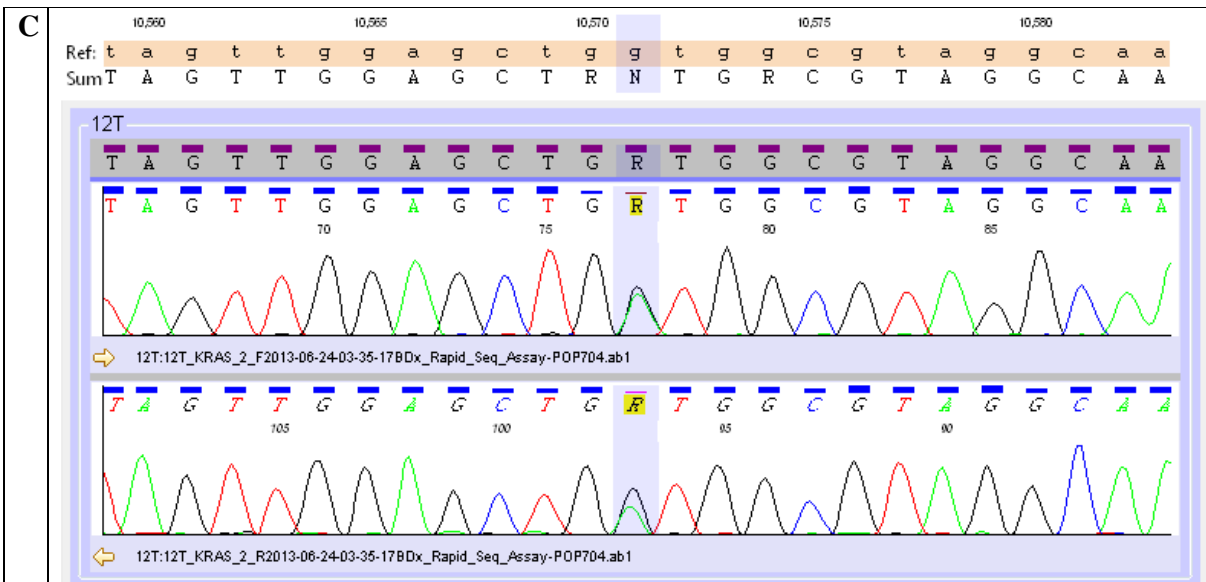
Mutatiile in codonul 12 au reprezentat 69,2% (9/13) din totalul mutatiilor detectate prin secventiere automata, mutatia G12[G,D] fiind cea mai frecventa, intalnindu-se in 30,8% dintre cazuri. In codonul 13 a fost observata doar mutatia G13[G,D].

Analiza HRM a permis identificarea unui numar de 18 probe (33,3%) cu mutatii in codonii 12 si 13, dintre care 12 (66,6%) au fost confirmate prin secventiere automata.

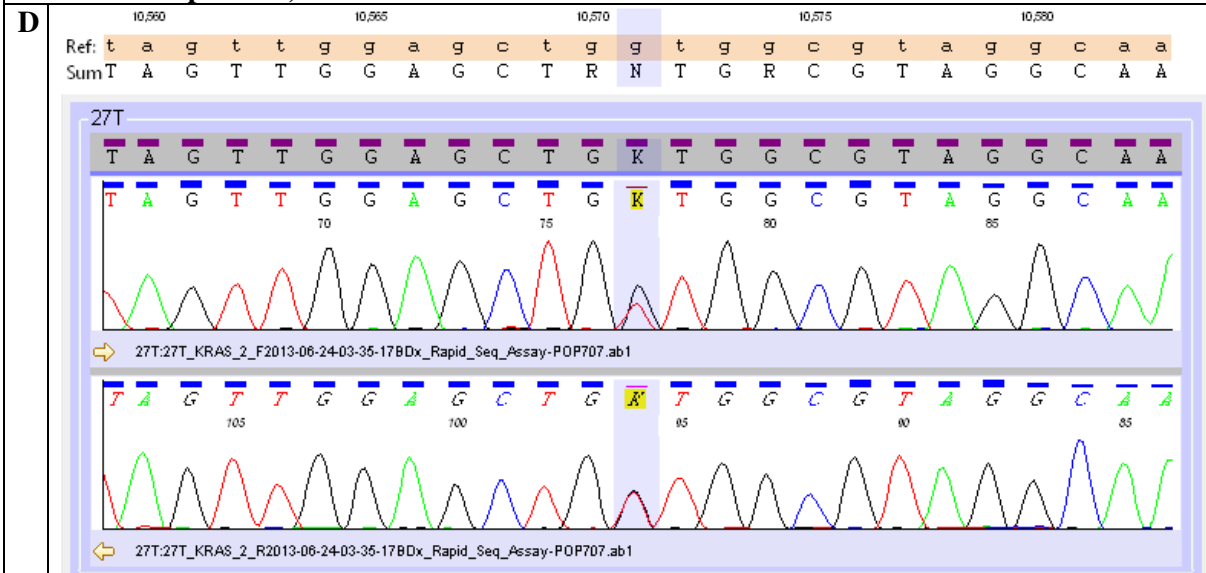
Fig. 7

Electroferograme corespunzatoare tipurilor de mutatii identificate in codonii 12 si 13 ai genei KRAS

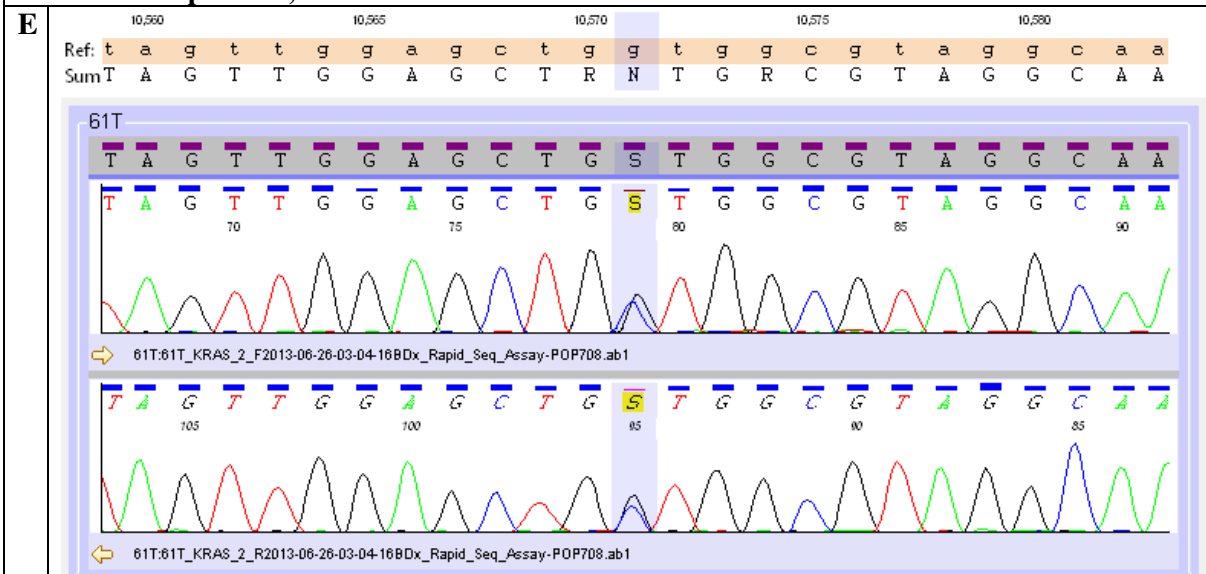




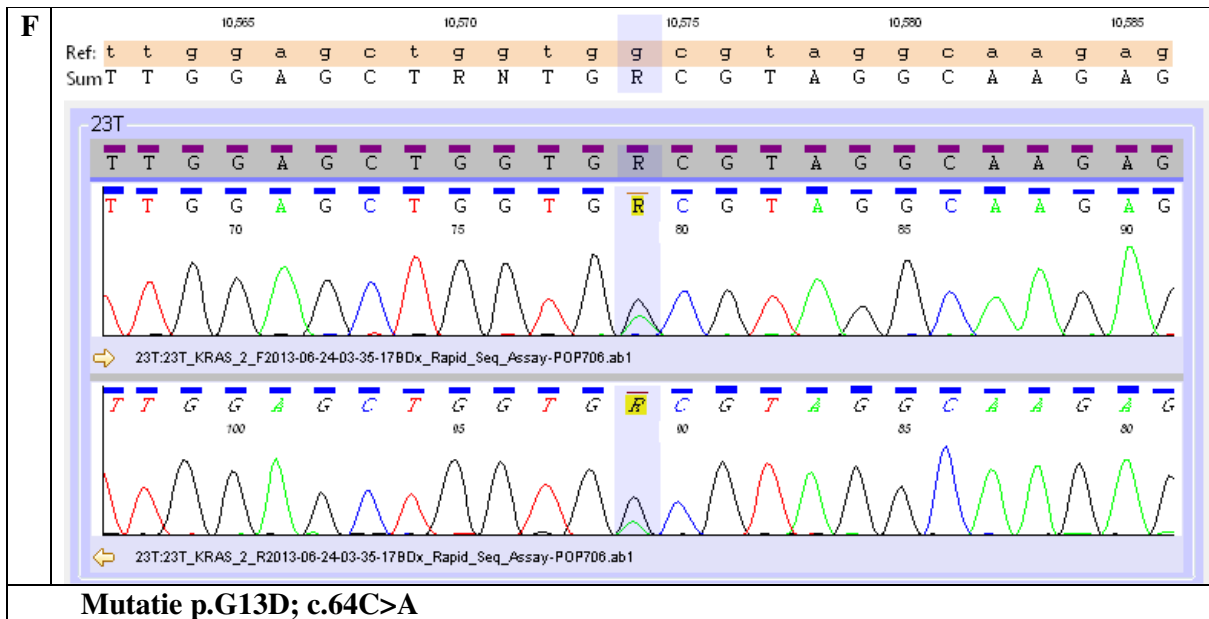
Mutatie p.G12D; c.35G>A



Mutatie p.G12V; c.35G>T

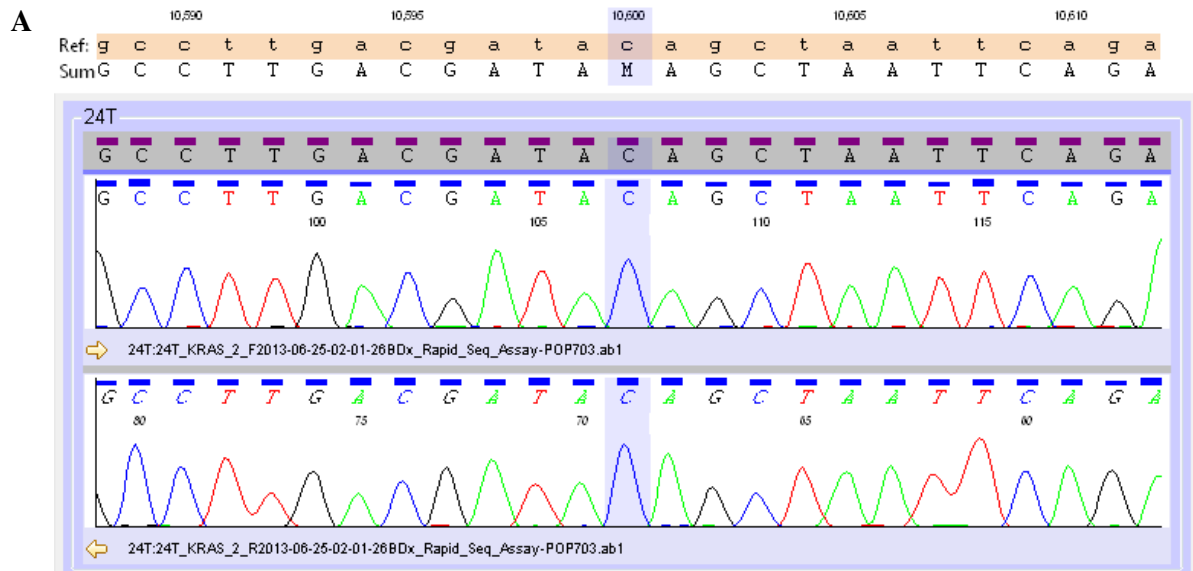


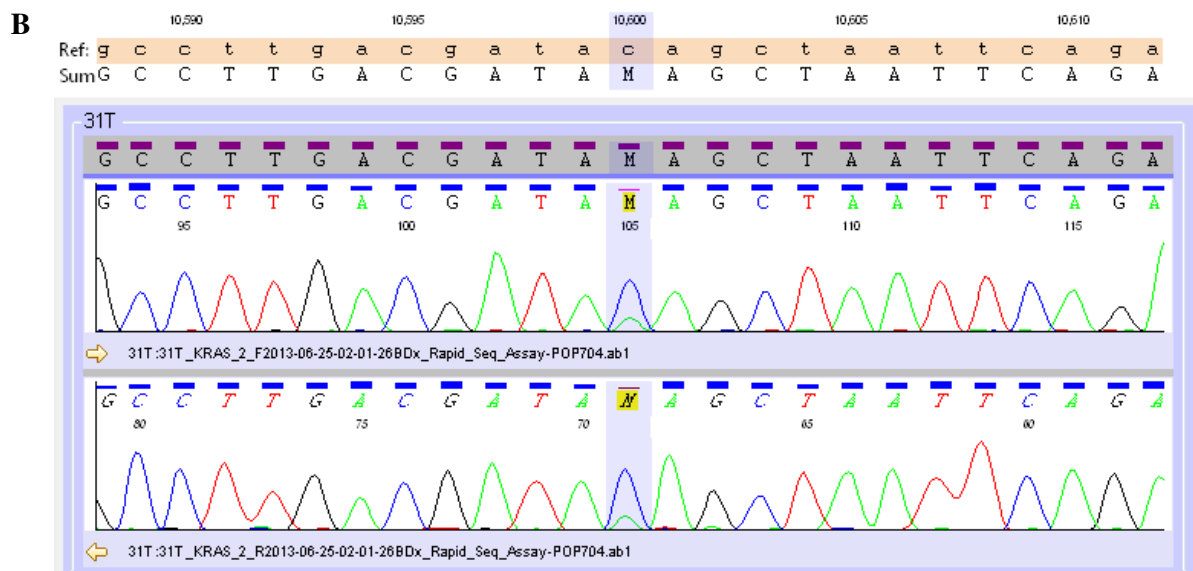
Mutatie p.G12A; c.35G>C



Cele 2 mutatii observate in afara codonilor 12-13, in regiunea amplificata si analizata prin HRM au fost localizate in codonul 22 prin secventiere, doar una fiind atribuita in mod automat (fig.8).

Fig. 8
Electroferograme ale probelor cu profil normal si mutat al codonului 22





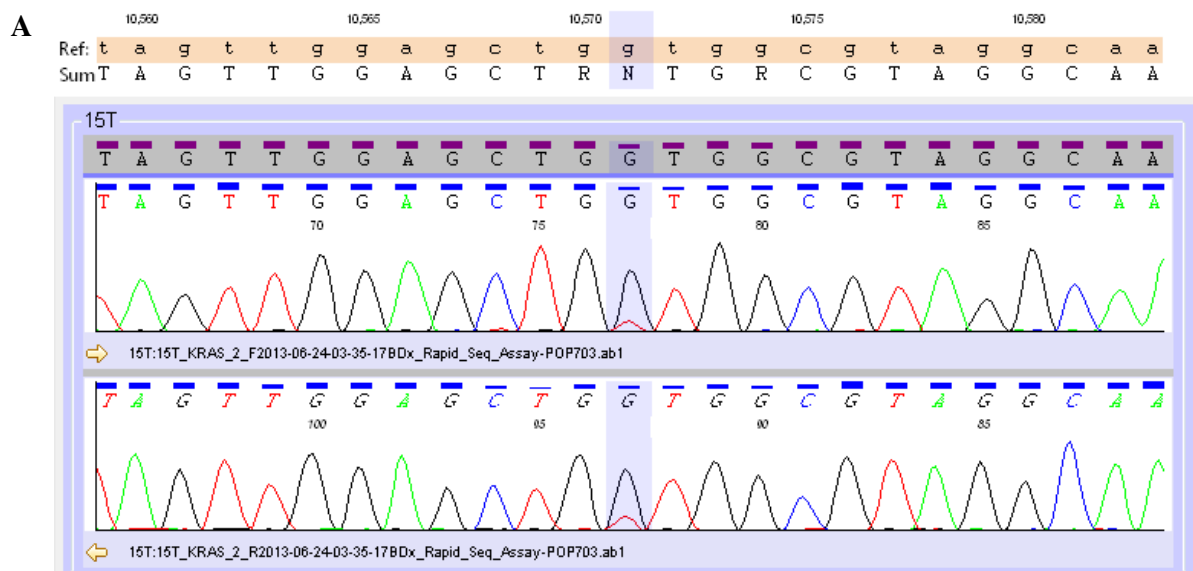
Mutatie p.Q22K; c.64C>A atribuita automat

In electroferogramele celor 7 probe detectate ca mutate prin HRM se poate observa prezenta peak-urilor suprapuse, dar mutatia nu e atribuita automat prin programul de analiza (fig.9). Dintre acestea, patru au fost prezente in codonul 12, doua in codonul 13 si una in codonul 22. Existenta peak-urilor suprapuse in secventele analizate, atat cu primerii sens, cat si cu cei antisens este un argument solid in favoarea desemnarii probelor drept mutate, in urma evaluarii rezultatelor de catre experimentator.

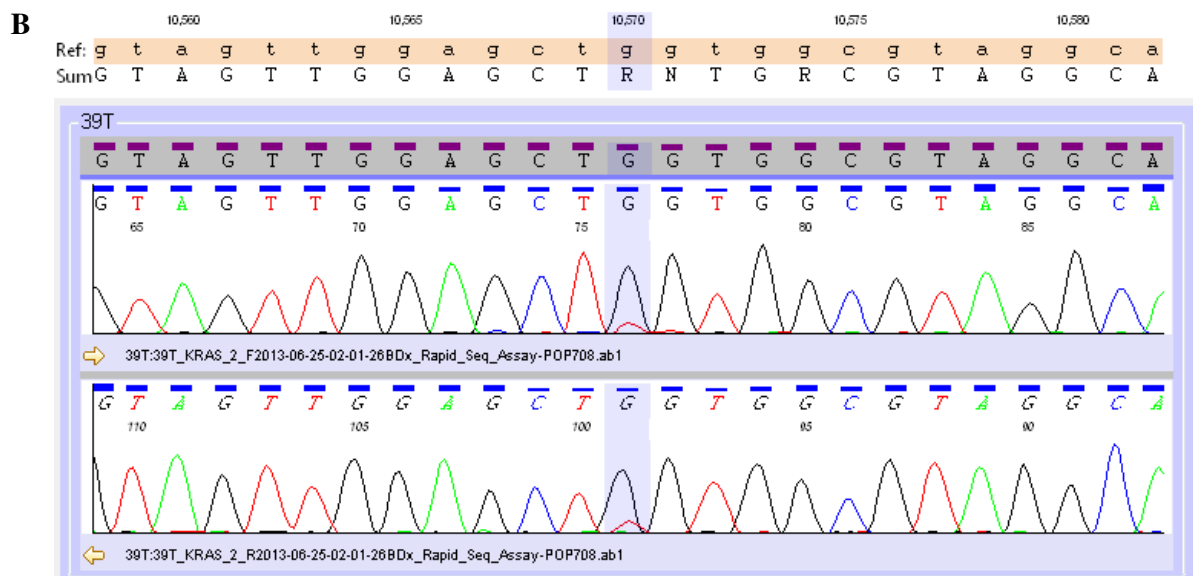
Discrepanta dintre rezultatele obtinute prin HRM si tehnica secventierii automate se datoreaza sensibilitatii mai mici, recunoscute, a acesteia din urma. Avantajul major al secventierii automate il constituie documentarea completa a tuturor mutatiilor prezente in fragmentul analizat.

Fig. 9

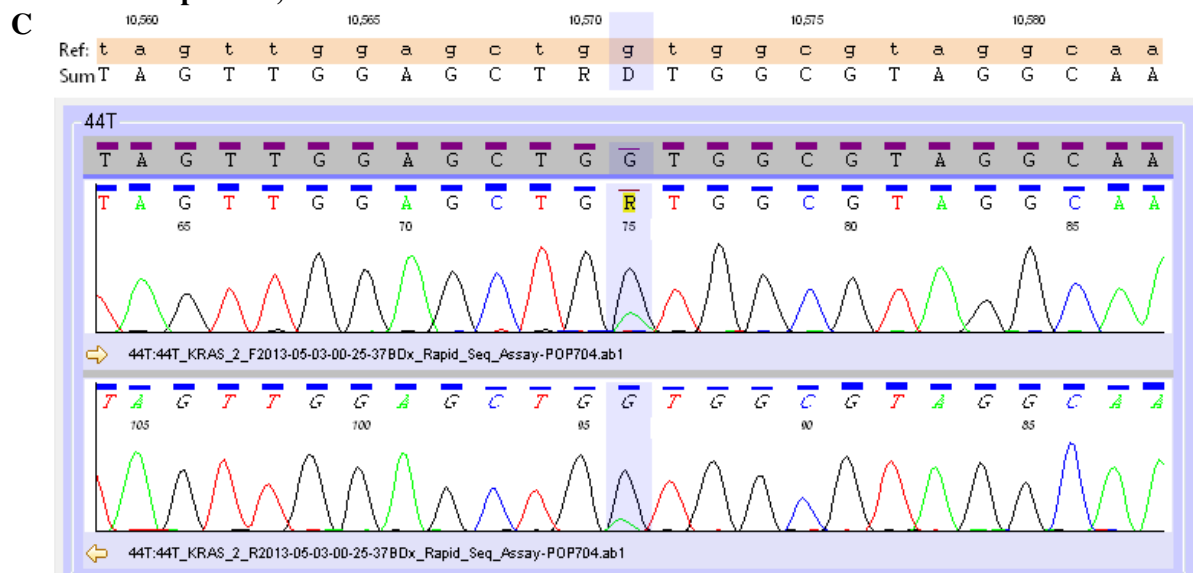
Cazuri in care mutatiile, desi vizibile, nu sunt atribuite automat prin programul de analiza



Mutatie p.G12V; c.35G>T



Mutatie p.G12S; c.34G>A



Mutatie p.G12D; c.35G>A

In concluzie s-a reusit dezvoltarea unei tehnici experimentale de investigare a prezentei unor mutatii ale codonului 2 din gena Kras, fiind decelata prezenta mai multor mutatii in probe prelevate de la pacienti cu cancer colorectal.

Design al materialelor suport si al structurilor de tip array pentru cancerul de san

Cancerul mamar (CM) reprezinta forma de cancer care afecteaza, cu cea mai ridicata frecventa, femeile din întreaga lume, aceasta forma de neoplazie aflandu-se pe primul loc, atat ca incidenta, cat si mortalitate. În tarile dezvoltate numarul de decese cauzat de aceasta maladie, a scazut semnificativ datorita depistarii precoce, în faze curabile, rezultat al introducerii screening-ului mamografic, dar si a utilizarii tot mai intense a unor forme mult mai eficiente de terapie (ex. terapia de substitutie hormonala); este inasa de mentionat ca si in aceste tari incidenta cunoaste curbe ascendente, situatia fiind si mai dramatica in tarile in curs de dezvoltare, inclusiv Romania (vezi detalii raport 2012).

Investigarea profilului expresiei genice reprezintă o metodologie relativ nouă pentru caracterizarea, la nivel molecular, a cancerului de sân. Această metodologie are tendința de a deveni un instrument extrem de util datorită potențialului său de a îmbunătăți managementul clinic al bolii. Studiul expresiei genice se dovedește a fi un criteriu nou, superior celor clasice, precum imagistica, gradul histologic, receptorii hormonalți, etc, de stadializare a bolii, de a prezice răspunsul la terapie a bolii și evoluția ulterioară, cum ar fi apariția metastazării. Din aceste motive, metodele de studiu ale expresiei genice (în special tehnica microarray) au cunoscut o dezvoltare rapidă în ultimii ani, încercându-se chiar anumite forme de stadializare bazate pe „spectrul” genetic. Unul dintre scopurile principale ale acestor studii îl reprezintă tentativa de individualizare a tratamentului, având ca rezultat creșterea răspunsului pozitiv la terapie. Prin identificarea pacientei la care terapia va avea efect, se dorește evitarea unui tratament inadecvat, de supra-tratament și cu manifestarea efectelor secundare. O cale importantă în particularizarea tratamentului este utilizarea tehnologiilor de înaltă performanță de analiză genomică, ceea ce permite caracterizarea unor noi subtipuri tumorale, cu extensia semnificativă a numărului de pacienți care pot beneficia de anumite forme de terapie, precum și creșterea răspunsului pozitiv la tratament.

Cancerul mamar este o boală heterogenă, extrem de complexă. Astfel se precizează că, din punct de vedere genetic, CM este multifactorial și depinde de interacțiunile și efectele unui număr mare de gene, unele cu implicare majoră, altele cu un rol mai scăzut. Deși există multe similitudini în acest sens, există totuși și anumite particularități determinate de specie. Astfel, cel puțin conform datelor existente până în prezent, la câine variabilitatea genetică este mai redusă, ceea ce, pentru studii științifice este un avantaj, fiind mai ușoară identificarea unor modificări la nivel genetic (mutații, etc), generate de factori de risc (exemplu cancerigeni de mediu), câinele reprezentând astfel o adevărată sentinela genetică - se apreciază, spre exemplu că probabilitatea de a identifica prezența unei modificări de tip SNP (*single-nucleotide polymorphisms*) este aproape de maxim: 97%.

Între factorii genetici deja recunoscuți ca având un rol major în apariția cancerului mamar se numără BRCA1 și BRCA2, gene implicate în controlul replicării și care, în mod normal, sunt gene de protecție, făcând parte din categoria genelor supresoare ale tumorii. Prin mutații, însă, această funcție este pierdută și, ca urmare, persoanele aflate în această situație prezintă un risc mult mai mare comparativ cu cele cu genom normal; foarte important este faptul că genele mutate se pot transmite ereditar; se apreciază că femeile care moștenesc mutații la nivelul genelor BRCA1 sau BRCA2 au un risc de a dezvolta cancer mamar, cu valori cuprinse între 56% și 84% față de persoanele purtătoare de gene normale. Deși frecvența cancerului mamar la bărbați este mult mai redusă, comparativ cu cel la femei (cca 1%), la acest sex, prezența de gene BRCA mutate conduce la un risc mult mai ridicat, comparativ cu cel înregistrat la femei și, în plus, conduce la un risc crescut de transmitere la descendenți a genelor mutate. În aceste condiții, depistarea prezenței unor mutații ale genelor BRCA, pentru persoanele sănătoase reprezintă una dintre căile principale de prevenție a cancerului - este de reținut, cum s-a menționat și anterior, că prezența unei gene modificate nu va conduce, în mod automat la transformare/malignizare, dar crește mult acest risc.

Până în prezent a fost detectat un număr mare de secvențe variate la nivelul BRCA1/2, dar pentru majoritatea acestora, efectele la nivelul fenotipului este puțin sau deloc cunoscut, fiind astfel necesare multe studii care să identifice semnificația lor clinică. Marea majoritate a mutațiilor BRCA1/2 determină truncheri proteice prin rupere, mutații nonsens, inserții aleatorii sau rearanjamente.

În ceea ce privește cancerul la câine se consideră că, asemenea situației întâlnite la om, boala are un caracter heterogen, cu o origine multifactorială, generarea și evoluția bolii depinzând în mare

masura de interactiunile dintre factorii genetici si cei de mediu, existand multe similitudini intre cancerele mamare si cele animale, aspecte ce fac obiectul de predilectie al oncologiei comparate. Tumorile mamare reprezinta cea mai frecventa forma de neoplazie intalnita la catele (*canis familiaris*), reprezentand aproximativ jumatate din toate tumorile aparute la caine, circa jumatate dintre acestea fiind maligne. Similar situatiei intalinite la om, la catea, tumorile mamare se dezvoltă odata cu inaintarea in varsta, rareori aparand inaintea varstei de 25 de ani pentru femeie si respectiv 5 ani pentru catea. Varsta medie de aparitie, pentru catele, este de 10-11 ani; totusi, anumite rase dezvoltă cancer mamar la varste mai mici; spre exemplu, in Suedia, pentru rasa English Springer Spaniel, varsta medie de declansare a cancerului mamar este de 6,9 ani. Dezvoltarea tumorilor mamare este dependenta hormonal pentru ambele specii, atat cea umana cat si cea canina. La catele, incidenta cancerului mamar este de 0,05% daca sunt sterilizate inainte de primul estru, pentru ca ulterior sa creasca la 8% sau 26%, daca sterilizarea are loc dupa primul sau al doilea estru. Daca sterilizarea se realizeaza dupa cel de-al doilea estru, riscul de dezvoltare al tumorilor mamare maligne este acelasi cu catelele nesterilizate. Exista unele rase (spaniel, doberman, ciobanesc german sau boxer) a caror predispozitie pentru cancerul mamar este mai crescuta. Desi recunoscute toate aceste aspecte, este de retinut ca studiile la nivel de animal, in special cele genetice, chiar si in conditiile existentei unor specii/rase cu predispozitie mai ridicata, nu sunt foarte numeroase, datorita, in special, costurilor extrem de ridicate (numai o simpla investigare a unor mutatii la nivelul BRCA ridicandu-se la cateva mii de euro), astfel ca exista inca putine date referitoare la modificarile genetice si ca urmare, pana in prezent, nu este clara existenta unui caracter ereditar al afectiunii.

Carcinomul mamar canin are caracteristici epidemiologice, clinice, morfologice si de prognostic similare cu cancerul mamar uman, reprezentand astfel un veritabil model de tumora aparuta spontan. Exista o diferenta importanta intre om si caine – la aceasta ultima specie, datorita aparitiei relativ recente a multor rase, precum si datorita consangvinizarii, pentru pastrarea puritatii rasei, variatia genetica, in cadrul aceleiasi rase, este mult redusa, ceea ce face ca aparitia unui dezechilibru genetic sa mareasca mult predispozitia pentru anumite boli. Spre exemplu, la rasa English springer spaniel, in Suedia, s-a constatat o frecventa extrem de ridicata (36%) a cancerului mamar. *Pe de alta parte, datorita variatiei genetice mai reduse, cancerul mamar canin ar trebui sa aiba o baza genetica mai omogena in cadrul unei singure rase, comparativ cu cancerul de san la om, ceea ce ar trebui sa faciliteze identificarea factorilor de risc, in special, a celor de mediu - principalii factori generatori de alterari genetice. Datorita prezentei intr-un mediu de viata comun si afectand, in egala masura, si omul si animalul, factorii de mediu vor genera modificari genetice similare, dar datorita vitezei mai ridicate de raspuns biologic a animalului, acesta se va constitui ca o adevarata „sentinela” pentru om.*

Tinand cont de aspectele mentionate, proiectul si-a propus investigarea genelor BRCA la om si animale (caine); dincolo de informatiile generale referitoare la aceste gene, pentru Romania, aceste studii sunt chiar mai importante, in conditiile in care ca exista particularitati geografice ale modificarilor fata de genele normale, probabil, printre altele, datorita unor factori regionali specifici: alimentatie, mediu, mostenire genetica, iar in Romania, studiile la nivel uman sunt extrem de putine, iar la nivel animal, practic, absente.

In urma analizei structurilor genelor BRCA, respectiv a celor mai frecvente modificari mentionate la nivelul BRCA: 185delAG si 5382insC în BRCA1 si respectiv, 6174delT, in BRCA2, s-au selectat urmatoarele secvente oligomerice care sa fie utilizate ca sonde pentru structuri de tip array si respectiv, sa fie investigate alternativ prin metodele experimentale mentionate (secventiere, RT-PCR, rezolutie inalta, etc):

- 5'-TCTGCTCTTCGCGTTGAAGAA-3' si 5'-CACTCTTGTGCTGACTTACCA-3', pentru BRCA1 185delAG
- 5'-CAGCATGATTTTGAAGTCAG-3 'si 5'-AGGGAGCTTTACCTTTCTGTC-3' pentru BRCA1 5382insC
- 5'GGGAAGCTTCATAAGTCAGTC-3' si 5'-TTTGTAATGAAGCATCTGATACC-3' pentru BRCA2 6174delT.

Diseminarea rezultatelor

In cursul anului 2013 s-a participat la mai multe manifestari stiintifice, cele mai importante, de nivel national si cu participare internationala fiind: Conferinta Societatii Romane de Radioterapie si Zilele Medicale ale Institutului Oncologic *Prof.dr.Alex.Trestioreanu*, Bucuresti, 31 oct – 02. Nov. 2013, Conferinta *45 de ani de oncologie comparata in Romania (1968 – 2013)*, Bucuresti, 29 – 30 nov. 2013, Conferinta *3rd International Congress of Mediterranean Forum of Comparative Oncology*, Cordoba, Spania, 10-12 apr. 2013, Conferinta *14th edition of Trends in Nanotechnology (TNT2013)*, Sevilla, Spania, la care s-au prezentat peste 20 lucrari, dintre care mentionam urmatoarele:

- *Studiul mutatiilor KRAS si BRAF in cancerul colorectal prin secventiere directa*, autori: Daniela Murarasu, Corina Mihalcea, Sabin Cinca, Eugen Bratucu, Dan Straja, Bogdan Tanase, Liliana Puiu;
- *Particularitati genetice in cancerul mamar – date preliminare*, autori: Corina Mihalcea, Daniela Murarasu, Marieta Panait, Antonela Busca, Madalina Bolovan, Alexandru Blidaru, Cristian Bordea, Silviu Voinea, Sabin Cinca, Liliana Puiu;
- *Studiul unor neoplasme maligne la caine*, autori: Emilia Balint, Florin Dumitrescu, Daniel Lastofka, Nicolae Manolescu;
- *Diagnosticul citomorfologic – metoda imperativa in neplasmul mamar la caine*, autori: Emilia Balint, Nicolae Manolescu, Sabin Cinca, Corneliu Mateescu;
- *Rolul susceptibilitatii individuale in interrelatia genotip – expunere la cancerigeni din mediu*, autor: Maria Monica Nistoroiu;
- *Comparative oncology – the complex structure of comparative medicine*, autori: Nicolae Manolescu, Emilia Balint, Cornel Mateescu, George Predoi;
- *Relationships between human and animal cancers*, autori: Liliana Puiu, Marieta Panait, Antonela Busca, Daniela Murarasu, Corina Mihalcea, Nicolae Manolescu, Sabin Cinca;
- *Some Consideration on Mammary Malignant Tumors in Canine*, autori: Emilia Balint, Nicolae Manolescu, Cornel Mateescu, George Predoi, Dan Lastofka;
- *Oncological Casuistry Study in Canine and Feline during 2007 - 2012*, autori: Emilia Balint, Nicolae Manolescu, George Predoi, Cornel Mateescu, Dan Lastofka;
- *Finding the appropriate substrate for biosensors by monitoring the biomolecular recognition reactions using electrochemical impedance spectroscopy*, Mihaela Kusko, Monica Simion, Adina Bragaru, Iuliana Mihalache, Razvan Pascu.

De asemenea, este in curs de finalizare o lucrare care urmeaza a fi trimisa spre publicare.

Workshop intermediar de analiza critica a proiectului

Pentru a se realiza o verificare interna a modului de realizare a proiectului, precum si pentru identificarea unor aspecte ce se cer imbunatatite sau modificate, cei trei parteneri din proiect (IOB,

IMT si IMC) au organizat un workshop care s-a desfasurat in data de 18 nov. 2013. In cadrul acestuia fiecare dintre parteneri si-a prezentat rezultatele obtinute si au facut propuneri pentru etapa urmatoare. Principalele concluzii ale manifestarii au fost:

- pentru faza in curs (1/2013) au fost indeplinite obiectivele prevazute, dandu-se acordul pentru redactarea documentelor de faza, a raportului stiintific si a raportului financiar. Referitor la raportul financiar s-a constatat ca, pe capitole bugetare, unul dintre participanti (IOB) nu a folosit suma prevazuta pentru deplasari (3.000 lei), dar suma a fost realocata pentru capitolul Materiale, suma totala pentru anul in curs fiind astfel egala cu prevederile din Actul aditional nr. 1/2013 (411.000 lei), respectandu-se, la total, prevederile financiare pentru etapa 1/2013;
- s-a dat curs si s-a raspuns la termen la toate solicitarile Autoritatii Contractante - UEFISCDI;
- s-a actualizat pagina web a proiectului;
- pentru etapa urmatoare:
 - incheierea cat mai rapida a Actului aditional pentru anul 2014, astfel incat sa fie fie posibila declansarea mai rapida a procedurile de achizitie a materialelor necesare pentru realizarea proiectului, aceasta cu atat mai mult cu cat sunt prevazute si cheltuieli pentru achizitia de echipamente.
 - identificarea unor surse suplimentare de material biologic pentru extinderea numarului de cazuri investigate si asigurarea unei uniformitati (stadiu de boala) mai accentuate a probelor, atat pentru probe umane, cat si de origine animala.

Pregatirea si prezentarea raportului de faza

Conform acordului exprimat de toti partenerii si cu contributia efectiva a acestora, tinandu-se cont de indeplinirea prevederilor contractuale, atat pe plan stiintific, cat si financiar a fost elaborat prezentul raport de faza, care este inaintat spre evaluare si aprobare Autoritatii Contractante.