



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,  
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI  
PERSOANELOR VÂRSTNICE  
AMPOSDRU



Fondul Social European  
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
NAȚIONALE  
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA  
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
DIN CRAIOVA

**Investește în oameni !**

**FONDUL SOCIAL EUROPEAN**  
**Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane**  
**2007 – 2013**

**Axa prioritară 1**

**„Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii  
economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere”**

**Domeniul major de intervenție 1.5**

**„Programe doctorale și postdoctorale în sprijinul cercetării”**

**Titlul proiectului**

***„Creșterea calității și vizibilității rezultatelor cercetării științifice a  
doctoranzilor cu frecvență prin acordarea de burse doctorale”***

**Contract nr: POSDRU/107/1.5/S/82705**

**Beneficiar**

**Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova**

# UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA

Teză de Doctorat

Rezumat

## **Markeri genetici implicați în patologia inflamatorie digestivă**

Conducător doctorat  
Prof. univ. dr. Florica Popescu  
Cotutelă  
Prof. univ. dr. Francisc Mixich

Doctorand  
Elena-Raluca Nicoli

Craiova, 2013

## INTRODUCERE

Bolile inflamatorii intestinale (BII) reprezintă o povară grea atât pentru pacienți cât și pentru sistemele naționale de sănătate din cauza apariției lor la vârsta adolescenței sau adultului tânăr cu simptome potențial debilitante și evoluție cronică și nepredictivă, caracterizate de un risc crescut de dezvoltare a cancerului colorectal. (Høivik M., 2012).

În ciuda recentelor îmbunătățiri ale posibilităților terapeutice, există încă un număr surprinzător de mare de pacienți cu BII care trebuie să suporte intervenții chirurgicale determinate de complicațiile bolii (Podolsky D.K., 2002). Așadar, orice marker molecular care poate fi folosit pentru un diagnostic precoce în vederea aplicării unor strategii terapeutice non-invazive și evitării complicațiilor, cum ar fi cancerul colorectal (CCR), este benefic.

Cuvinte cheie: TPC2, boala inflamatorie digestivă, cancerul colorectal, autofagie

### **Partea I – Stadiul cunoașterii**

#### **Capitolul 1- Introducerea generală**

##### *Principali factorii de risc ai BII*

BII reprezintă o problemă de sănătate publică importantă deoarece afectează, în principal, adulții tineri și este marcată de episoade debilitante de remisie și recădere, cu efecte negative asupra statusului socio-economic și a calității vieții. Epidemiologia BII este într-o continuă schimbare, ceea ce sugerează că factorii precum infecțiile, dieta, stilul de viață și medicația joacă un rol major în modificarea progresiei bolii (Ng Siew C et al., 2013). La nivel mondial, incidența Colitei Ulcerative

(CU) și Bolii Crohn (BC) variază între 2,2 și 14,3 cazuri la 100.000 persoane/an pentru CU, și 3,1 și 14,6 cazuri 100.000 persoane/an pentru BC (Malani, P. N., 2012).

#### *Autofagia – o cale patogenică importantă*

În încercarea de a descoperi bazele genetice ale BII, studii realizate pe zone multiple ale genomului au identificat, alături de genele ce modulează imunitatea înăscută, un grup de gene implicate în autofagie . Acestea par a fi asociate cu susceptibilitatea la boala, în special BC (Nys K. et al., 2013; Van Limbergen J. et al., 2009). Genele autofagiei asociate unei susceptibilități crescute la BII (CU sau BC sau ambele) ce au fost identificate prin multiple studii genomice sunt ATG16L1, IRGM1 și LRRK2. A fost demonstrat pe mai multe modele knockout de animale că autofagia este modulată prin activitatea LRRK2: o activitate intensă a genei reduce fluxul autofagic în timp ce o activitate scăzută îl mărește (Gómez-Suaga P. et al., 2012). Patologia ce implică defecte ale genei LRRK2 depinde de mediul celular în care gena funcționează (Lewis P. A. & Manzoni C., 2012). Defectele și nivelul expresiei genei LRRK2 influențează numărul autofagozomilor într-o manieră dependentă de calciu: chelatorul de calciu BAPTA inhibă numărul lor, iar depleția de cauză genetică de depozite de calciu din RE blochează efectele LRRK2 pe numărul de autofagozomi, crește pH-ul unei populații de lizozomi și numărul de vacuole lipidice (Gómez-Suaga P. et al., 2012).

Un mecanism similar de acțiune a fost descris și în cazul NAADP, un mesager secund agonist-generat, capabil să declanșeze semnale complexe mediate prin calciu, inițiate din depozite acide și amplificate ulterior de eliberarea calciului din RE (Churchill G. C. et al., 2002; Patel S. et al., 2010; Morgan A. J. et al., 2011). A fost demonstrat că acțiunea principală a acidului nicotinic adenin dinucleotidfosfat

(NAADP) este la nivelul canalelor cu 2 pori de la nivel endolizozomal: TPC1 și TPC2 (Calcraft P.J. et al., 2009; Brailoiu E. et al., 2009; Patel S. et al., 2011), dar se pare că moleculele nu sunt direct atașate de TPC, ci există o asocieră cu o proteină cu greutate moleculară mică neidentificată, care face conexiunea dintre ele (Lin-Moshier Y. et al., 2012). Rolul canalelor TPC este acela de a elibera calciul sub acțiunea NAADP, o moleculă pentru care TPC2 prezintă situsuri de legare cu afinitate crescută și scăzută. Acest fapt sugerează că TPC2 este un canal de eliberare țintită a calciului lizozomal, NAADP-dependent, calciu-independent (Zhu M.X. et al., 2009).

Astfel, demonstrarea și definirea rolului potențial al TPC2 în mecanismele fiziopatologice implicate în bolile defective autofagice, cum ar fi boala Parkinson sau BII, necesită studii mai elaborate pe modele de animale knockout asociate cu evaluarea nivelelor de expresie a genei TPC2 în țesutul afectat comparativ cu cel sănătos.

## **PARTEA a II-a - CONTIBUȚII PERSONALE**

### **Capitolul 2. Modelul de Șoarece TPC2 – rezultate preliminare**

Ținta acestui capitol este aceea de a descrie fenotipul și funcția limfocitelor din splină, ganglioni limfatici (inghinali) și timus al șoarecilor TPC2 KO comparativ cu șoarecii WT, și de a obține mai multe informații despre aceste modele animale. Aceste informații ar putea fi folositoare în studiile viitoare pentru a arăta rolul jucat de TPC2 în mecanismele fiziopatologice implicate în bolile cu defect autofagic cum ar fi bolile neurodegenerative, BII sau procesele tumorale.

#### ***Materiale și metode***

*Modelele animale.* Toate animalele studiate au fost șoareci TPC2 KO și WT furnizați de laboratoarele Parrington/Galione (Departamentul de Farmacologie,

Universitatea din Oxford). Laboratoarele Parrington, Galione si MRC Harwell au generat modelele de șoareci TPC2 KO folosind celule stem embrionare (CSE) 129P2 create prin capcana genica. Animalele au fost păstrate în condiții standard, în cuști de policarbon ventilate individual, la temperatura constantă (22°C), umiditate relativă de 45-65% și un ciclu zi-noapte de 12h fiecare. Apa iradiată și mâncarea le-a fost pusă la dispoziție *ad libitum*. Toate procedurile și experimentele desfășurate au fost în concordanță cu legea animalelor din Marea Britanie (Scientific Procedures, 1986) și aprobate de Biroul Central (Home Office) din Marea Britanie. Acest experiment a fost făcut pe un număr de 11 animale dintre care 5 erau TPC2 KO (2 femele și 3 masculi) și 6 TPC2 WT (3 masculi și 3 femele).

*Prepararea celulelor pentru citometria în flux (FACS).* Animalele au fost injectate în ventriculul stâng cu 20 ml soluție tampon fosfat salin (PBS) înaintea colectării de țesut pentru suspensia celulară. Suspensiile celulare din splină, ganglioni limfatici și timus au fost obținute în concordanță cu procedurile standard, fiind transferate pe lame folosind PBS. Probele au fost trecute prin filtre de 30 μm (Partec GmbH, Münster, Germany) și numărate folosind hemocitometre din plastic de unică folosință (Immune Systems Ltd, Paignton, UK) și albastru Trypan. Celulele au fost resuspendate la o concentrație de 1 milion de celule pe ml. Calculele au fost făcute pentru 1 milion de celule.

*Colorarea FACS.* Probele au fost fixate cu 1 μg de Mouse BD FC Block™ timp de 10 min înainte de adăugarea titrată a mix-ului de anticorpi colorați cu diferite culori. Celulele au fost spălate și resuspendate în 200 μl colorant vital (Live/Dead Aqua, Invitrogen, 1 în 1000 diluție în PBS) timp de 10 min la temperatura camerei, după care celulele au fost spălate din nou și citite. Anticorpii folosiți au fost: FITC-CD69,

PE-CD25 (IL2R $\alpha$ , p55), Alexa Flour-CD335 (NKp46), PerCP-Cy5.5-CD45, APC-H7-CD19 și Pacific Blue-CD3e.

*Citometria în flux.* Toate probele au fost analizate cu ajutorul unui sistem FACSCanto II (BD Biosciences) optimizat folosind BD Cytometer Setup și Tracking Beads.

### **Rezultate și Discuții**

În funcție de organul-sursă, în urma comparării celor două grupuri de șoareci TPC2 (KO și WT), s-au remarcat următoarele:

- în **splină**, expresia limfocitelor este semnificativ diferită pentru: **celulele T**, în special CD69 pozitive, **NK**, cele CD25 pozitive, în mod particular, și **B**, atât CD69 cât și CD25 pozitive,
- În **timus**, au fost detectate diferențe semnificative pentru **celulele T**, atât CD69 cât și CD25 pozitive și **B**, în special B CD69 pozitive. Nu s-au remarcat diferențe semnificative pentru **NK**,
- în **ganglionii limfatici** sunt observate diferențe semnificative pentru: **celulele T** CD25 pozitive, **NK** și **B**, atât CD69 cât și CD25 pozitive.

În acest studiu am folosit modelele de șoareci TPC2 KO și WT caracterizate anterior pentru a evalua expresia limfocitelor în splina, ganglionii limfatici și timusul animalelor TPC2 KO comparativ cu cele TPC2 WT. Analiza fenotipului limfocitelor și a altor celule derivate hematopoietic obținute din diferite țesuturi a devenit, de-a lungul ultimei decade, un instrument extrem de relevant în imunologie (Sheridan, B. S et al, 2012).

Evaluarea imună a modelelor de animale a arătat că atât limfocitele cât și celulele derivate hematopoietic sunt caracterizate de o heterogenitate semnificativă

în ceea ce privește morfologia, expresia antigenelor de suprafață și funcția (Croitoru K., et al, 1991).

Bazându-ne pe rezultatele preliminare de mai sus și pe compararea lor cu datele din literatură, putem spune că expresia celulelor imune în țesuturile studiate ale modelelor TPC2 KO pot fi diferite comparativ cu șoarecii TPC2 WT, sugerând că TPC2 ar putea fi un jucător important în răspunsul imun. Sunt necesare studii suplimentare pentru a putea înțelege și a caracteriza complet sistemul imun al animalelor TPC2 KO.

### **Capitolul 3. Cercetări histopatologice și de biologie moleculară în inflamația indusă experimental pe tubul digestiv la modelul de șoarece TPC2**

#### *Obiective*

În acest capitol este analizat modul în care șoarecele TPC2 KO răspunde la colita acută indusă cu sulfură sodică de dextran (DSS) comparativ cu animalele sănătoase (TPC2 WT).

#### *Material și metodă*

*Modelele animale.* Animalele studiate au fost colonii de șoareci TPC2 KO și WT furnizate de laboratoarele Parrington/Galione (Department of Pharmacology, University of Oxford). Studiul pe animalele în cauză a fost făcut folosind protocoale aprobate de UK Home Office (Animal scientific Procedures Act, 1986) și în concordanță cu autorizația PPL 30/2524. Un număr de 24 de animale au fost incluse în acest studiu. Pentru inducerea colitei, celor 12 animale (6 TPC2 KO și 6 TPC2 WT), raport 1:1 masculi/femele, cu vârsta de 6 săptămâni, le-a fost administrată sulfură sodică de dextran (DSS) 2% în apa de băut timp de o săptămână, după care s-a administrat din nou apă normală. În plus, au fost incluse în studiu alte 12 (6 TPC2



KO și 6 TPC2 WT) animale, ca lot control, respectându-se toți parametrii (vârstă, sex, greutate, etc.). La 10 zile după prima zi de administrare a DSS, animalele au fost sacrificate prin intoxicare cu CO<sub>2</sub> urmată de decapitare/exsangvinare, fiind colectat țesut pentru analizele histopatologice și moleculare.

*Administrarea substanțelor farmaceutice.* DSS (MP Biomedicals, Nr. Catalog.: 160110, 500g, Greutate moleculară.=36,000-50,000) a fost dizolvat în apă până la o concentrație de 2% și administrat animalelor prin intermediul apei de băut timp de 7 zile începând cu ziua 0 (Z0). Animalele din lotul control au primit un volum echivalent de apă normală. Tuturor animalelor le-a fost oferită fără nici o restricție apă de băut normală sau 2% DSS.

*Evaluarea bolii.* În cursul celor 10 zile de inducere a colitei, au fost evaluate și documentate zilnic greutatea, condiția fizică, scaunul, și prezența de macro sau micro sângerări în fecale sau la nivelul anusului șoarecilor. Pierderea în greutate a fost evaluată prin monitorizarea zilnică a pierderii în greutate comparativ cu Z0.

*Analiza histopatologică.* Evaluarea schimbărilor histologice și a apariției inflamației în colon a fost făcută pe segmente de colon fixate în formaldehidă 10%. Prepararea probelor: acestea au fost incluse la parafină, ulterior tăiate cu ajutorul unui microtom Leica RM2126. Secțiunile de țesut (4 μm) au fost colorate cu hematoxilină- eozina (HE). Au fost evaluate 5 secțiuni făcute la o distanță de 50 mm pentru fiecare colon și repetate pentru toți șoarecii din grup.

#### *Prepararea probelor*

*Protocolul de includere la parafină.* Toate probele au fost păstrate în formaldehidă timp de 7 zile înainte de a fi procesate.

*Protocolul de colorare HE.* Colorarea cu hematoxilină (Harrison Hematoxylin, Sigma UK) a fost realizată prin imersarea directă a secțiunilor în hematoxilină,

urmată de spălare cu apă și re-imersare în acid alcool (1% HCL in 70% etanol) și 30 secunde în apă Scott. Ulterior probele au fost colorate cu eozină. Secțiunile au fost deshidratate cu alcool, clarificate cu soluție HistoClear (alternativa la Xilen) și montate în mediu permanent (DePeX).

*Colectarea țesutului.* Animalele au fost sacrificate prin intoxicație cu CO<sub>2</sub> urmată de decapitare/exsangvinare. Sângele a fost îndepărtat prin puncție cardiacă. Țesutul periferic a fost perfuzat cu soluție salină 0,9% cu un debit de 20 ml/minut timp de 1-2 minute. Întregul ficat a fost disecat, un volum fiind păstrat în formaldehidă 10% și restul fiind păstrat înghețat în izopentan sau gheață carbonică (-78°C). Țesutul intestinal a fost prelucrat pentru analize histopatologice și moleculare.

*Colectarea țesutului pentru analiza histopatologică.* Greutatea și aspectul histologic sunt cei mai importanți parametri de evaluare a bolii. Colonul, intestinul subțire, splina, timusul și o parte din ficatul șoarecilor sacrificați au fost disecate cu atenție, îndepărtate și cântărite. Porțiuni din colonul distal, transvers și proximal, cec, ileon, jejun, duoden și stomac au fost colectate în formaldehidă 10%, după care au fost incluse la parafină. Au fost tăiate secțiuni de 4 μm și colorate cu HE.

*Colectarea țesutului pentru Real-Time RT-PCR cantitativ.* Probele (~1 mm) colectate din colonul mediu, distal și proximal, din jejun, ileon, duoden, stomac și ficat, au fost înghețate în azot lichid și depozitate la -80°C până la etapa de purificare a ARN-ului total.

*Extragerea ARN-ului total din țesutul intestinal.* Specimenele intestinale (~10mg de țesut per probă) aflate în soluție de liză celulară (Buffer RLT, Qiagen) cu 1%β-MCE (mercaptoetanol, Sigma, UK) au fost omogenizate folosind un dispozitiv automat. Extracția ARN-total a fost realizată în conformitate cu instrucțiunile producătorului Qiagen, RNEasy Mini Kit.

*Sinteza ADNc din țesutul intestinal.* Pentru a determina nivelele de activare ale diferitelor gene în țesutul colonic al șoarecelui, s-a utilizat o reacție cantitativă de revers-transcripție - polimerizare în lanț cu detecție în timp real (q Real-Time RT-PCR) în două etape (Two Step). În prima etapă s-a sintetizat ADNc pentru toate tipurile de ARNm prezente inițial în fiecare dintre probe. A fost folosit kitul de revers transcripție High Capacity cDNA Reverse Transcription, Applied Biosystems, Marea Britanie.

*qRT-PCR din țesutul intestinal.* Cuantificarea activității diferitelor gene prin determinarea nivelelor ARNm în țesutul colonic a fost realizată prin *q Real-Time RT-PCR* cu primeri și sonde TaqMan specific fiecărei gene (IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ , TLR4, TGF $\beta$ , Caveolin, ICAM, VCAM,  $\beta$ -Actin). Nivelul de expresie al fiecărui transcript (tip de ARNm) din cadrul diferitelor probe a fost cuantificat ca valoarea relativă raportată la una dintre genele constitutive (housekeeping genes),  $\beta$ -Actina. Primerii folosiți în reacția qRT-PCR au fost achiziționați de la compania Roche, Marea Britanie.

## **Rezultate si Discuții**

*Măsurători zilnice pe parcursul experimentului.* Analizând raportul greutate/lungime între cele două grupuri (TPC2 KO și WT) am observat o diferență semnificativa la nivelul colonului, nu și la nivelul intestinului subțire. În cazul raportului greutate/lungime de asemenea nu s-au înregistrat diferențe semnificative între cele două genotipuri în ceea ce privește splina.

### *Evaluarea secțiunilor colonice in hematoxilina si eozina (HE):*

La finalul experimentului, în grupurile de control (șoareci cărora li s-a administrat apă), nu s-au înregistrat diferențe sub aspect histologic între grupurile TPC2 WT și KO. În ceea ce privește grupurile tratate cu DSS (WT și KO), evaluarea

histologică a secțiunilor colorate cu HE provenite din colonul distal și mediu a evidențiat următoarele diferențe:

- pentru grupul TPC2 WT tratat cu DSS s-a observat o hiperplazie moderată asociată cu depleție celulară și pierderea arhitecturii criptelor intestinale. De asemenea a fost afectat 25% din țesut, cu un discret infiltrat leucocitar în lamina propria.
- la șoarecii TPC2 KO tratați cu DSS am observat o depleție a celulelor însoțită de o hiperplazie și pierdere celulară epitelială substanțială. De asemenea, am detectat mai multe semne histologice de inflamație severă, cum ar fi pierderea importantă a arhitecturii criptelor intestinale (de peste 50%), edem și abcese ale criptelor intestinale asociate cu inflamația submucoasei.

*Scorurile Histopatologice.* Scorurile histopatologice ale colonului proximal nu au fost semnificative atunci când au fost comparate cele două genotipuri. Datorită măsurării greutății și lungimii înainte de includerea țesutului în blocuri de parafină și marcarea cu HE, în multe din secțiuni s-au observat artefacte și astfel nu toate au putut fi înregistrate.

*Analiza comparativă a expresiei genelor ce codifică markeri ai inflamației la animalele TPC2 KO vs WT ulterior inducerii colitei ulcerative:*

- Rezultatele evaluării comparative ale expresiilor genice conduce către o posibilă confirmare a rezultatelor histopatologice. Sunt remarcate creșteri semnificative ale expresiilor relative atât pentru IL-6 cât și pentru IL-1 $\beta$  la șoarecii TPC2 KO tratați cu DSS.
- în grupul tratat cu DSS, expresia genelor caveolin și VCAM este crescută semnificativ statistic în grupul WT comparativ cu TPC2 KO.

- procentul relativ al expresiei ARNm TLR4 în grupurile de șoareci TCP2 KO tratați cu DSS a fost semnificativ crescut prin comparație cu grupurile TPC2 KO și WT ce primesc apă (\*p = 0.0189).
- la evaluarea nivelelor de activare ale genelor TGF- $\beta$  și ICAM nu s-au înregistrat diferențe semnificative între cele două grupuri WT/KO tratate cu DSS/apă.

În acest capitol am evaluat răspunsul celor două modele TPC2 KO și WT la colita DSS-indusă. De asemenea, am încercat să evaluăm dacă răspunsul lor la DSS alterează expresia genelor unor markeri cum ar fi IL-6, IL-1 $\beta$ , Caveolin, VCAM, ICAM, TNF- $\alpha$ , TLR-4 sau TGF- $\beta$  implicați în patogeneza BII (Carta, S. et al, 2013).

DSS este cel mai comun polizaharid folosit pentru a induce colita pe modele de animale în studiul patogenezei inflamației gastrointestinale și în studii preclinice (Neurath, M. et al, 2000; Wirtz, S., & Neurath, M. F. 2007; Wirtz, S. et al, 2007). În cazul șoarecilor, administrarea ciclică, a DSS dizolvat în apă determină inflamație acută sau cronică la nivel intestinal. În timp ce colita cronică indusă chimic este dependentă de limfocitele T, colita acută poate apărea în absența acestora (Wirtz S. et al 2007). Mai multe studii au arătat că factorii genetici modulează susceptibilitatea și răspunsul la modificările colitei induse de DSS la modelele de animale, un exemplu fiind modelul șoarecele cu deficitul IL-10 sau modelul C3H (Wirtz S. et al 2007; Berg DJ, et al, 2002; Perše, M. et al 2012; Mähler, M. et al 1998). Mai multe studii realizate între 1999-2005 au încercat să demonstreze implicarea factorilor genetici în modularea răspunsului inflamator la modelele animale (Stevceva, L. et al, 1999; Kitajima, S. et al, 2001; Melgar, S. et al, 2005).

Bazându-ne pe rezultatele preliminare comparate cu datele din literatură putem concluziona ca modelul de șoarece TPC2 KO este mai susceptibil la colita indusa cu DSS în comparație cu TPC2 WT.

#### **Capitolul 4. Determinarea expresiei genelor TPCN in cancerul colorectal**

##### *Obiective*

Principalul obiectiv al acestui studiu este reprezentat de identificarea unei posibile corelații între expresia genelor TPCN1 si TPCN2 și caracteristicile clinicopatologice ale tumorilor maligne colorectale.

##### *Material si metode*

*Pacienți și probe.* 25 de pacienți ce au suferit intervenții chirurgicale in Spitalul Clinic Județean de Urgenta Craiova, Romania intre 2008 si 2012. Comisia de etica a Universității de Medicină si Farmacie Craiova, România a aprobat acest studiu. A fost obținut consimțământul scris de la toți subiecții. Vârsta pacienților incluși în studiu a fost în medie  $64,24 \pm 10,81$  iar raportul pe sexe este de 14:11 (b:f). Probele au fost recoltate de la toți pacienții, intraoperator atât din formațiunea tumorală (T) cat și din țesutul peritumoral (PT) de la nivelul mucoasei intestinale. Imediat după recoltare probele au fost transferate în soluție de stabilizare a ARN-ului (*RNA later*, Ambion, Life Technologies) și stocate la  $-80^{\circ}$  pana la izolarea ARN-ului.

Recoltarea și transferul probelor în soluție de stabilizare a ARN-ului

Depozitare la -80°



Examen histopatologic



Izolare ARN total



Evaluarea concentrației, purității și calității ARN-ului



Revers transcripția ARN-ului mesager in ADNc



Real-Time RT-PCR cantitativ



Analizarea rezultatelor folosind  $2^{-\Delta\Delta C_t}$

Programe statistice: GraphPad Prism 5, GraphPad InStat,

GenexPro 4.4.2.308©

**Fig. 4.1 Diagrama studiului**

### ***Rezultate și Discuții***

*Compararea expresiei TPCN in formațiunea tumorală și mucoasa colorectală peritumorală.*

Nivelele ARNm pentru genele țintă au fost normalizate prin raportarea la gena GAPDH (3—fosfat gliceraldehid dehidrogenaza/ Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), rezultatele fiind prezentate ca expresie genică relativă.

Diferențele dintre perechile de probe au fost calculate folosind metoda  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  fiind considerate semnificative atunci când nivelurile de ARNm au variat mai mult de

1,8 (>1,8 o mai mare expresie in tumora, <0,55 o mai mare expresie in mucoasa peritumorală, 0,55-1,8 - diferență irelevantă între tumora și țesutul peritumoral).

Gena TPCN1 a fost supraexprimată preponderent în probele din țesutul peritumoral în 17 cazuri (68%), în 3 (12%) cazuri expresia sa a fost mai pronunțată în țesutul tumoral iar în 5 (20%) cazuri diferența dintre probele pereche a fost irelevantă.

Gena TPCN2 a fost supraexprimată în 15 cazuri (60%) în țesutul peritumoral, în 3 (12%) cazuri expresia a fost crescută în probele din țesutul tumoral iar în 7 cazuri (28%) diferența dintre probele pereche a fost irelevantă.

Expresia genelor TPCN1 și TPCN2 a fost crescută semnificativ statistic în țesutul peritumoral în comparație cu țesutul tumoral ( $p=0.005$  și  $p=0.001$  Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

De asemenea, nivelele expresiei acestor gene diferă semnificativ în marea majoritate a perechilor de probe studiate ( $p<0.0001$ , Wilcoxon Signed Rank Test).

*Analiza expresiei genelor în funcție de trăsăturile patologice tumorale.* Analiza expresiei genelor TPCN1 și TPCN2 ținând cont de localizarea tumorii a arătat o scădere a nivelelor ARNm în cazul cancerului rectosigmoidian în comparație cu cancerul colonului ascendent și descendent ( $p=0.0210$ , respectiv  $p=0.0323$ , Kruskal-Wallis test).

Atunci când evaluarea se realizează pe baza stadializării Dukes (A, B, C, D) genele TPCN1 și TPCN2 au înregistrat un model similar al expresiei. Deși există o tendință de creștere a nivelelor ARNm în tumoră în primele două stadii (A+B) per total rezultatul fiind nesemnificativ statistic (N), ( $p=0.26$ , respectiv  $p=0.47$ , Kruskal-Wallis test). În funcție de stadiul tumorii (I, II, III, IV), nivelele de activare ale genelor



TPCN1 si TPCN2 au fost similare. Nivelele ARNm au fost similare în toate cele patru stadii, diferența nefiind statistic relevanta (NS, Kruskal-Wallis test).

În majoritatea cazurilor expresia celor doua gene a fost similara atât în cazul tumorilor bine diferențiate (G1), cât și celor moderat (G2) și slab diferențiate (G3) ( $p=0.74$ , respectiv  $p=0.55$ , Kruskal-Wallis test).

*Corelația dintre gene în țesutul tumoral și în mucoasa peritumorală.* A fost identificata o puternică corelație între expresia genelor TPCN1 și TPCN2 atât în țesutul tumoral ( $r=0.94$ ,  $p<0.0001$ ) cat și în cel peritumoral ( $r=0.97$ ,  $p<0.0001$ ). Atât în țesutul tumoral ( $r=0.60$ ,  $p<0.004$ ) cât și în cel peritumoral ( $r=0.64$ ,  $p<0.002$ ) coeficientul Spearman subliniază o agregare a nivelelor ARNm TPCN1 si TPCN2.

Prin intermediul canalelor TPC, calciul, mesager important pentru normalizarea traficului intracelular cu vezicule, și reciclarea din cadrul sistemului endo-lizozomal (Lloyd-Evans and Platt, 2011). poate fi eliberat de la nvelul lizozomal prin acțiunea unor mesageri secunzi precum ar fi acidul nicotinic adenin dinucleotidfosfat (NAADP) (Churchill et al., 2002).

În cazul subiecților cu cancer colorectal rezultatele arată o expresie crescută a genelor TPCN1 si TPCN2 la nivelul țesutului peritumoral neinvadat în comparație cu țesutul tumoral. Analiza comparativă ce a avut ca țintă expresia genelor TPCN la nivelul mucoasei și țesutului tumoral a evidențiat potențialul acesteia de a se constitui într-un parametru de prognostic independent de factorii clinicopatologici pentru estimarea riscului de apariție a cancerului colorectal. Aceste rezultate necesită o evaluare atentă în vederea elucidării unor întrebări cheie cu privire la implicarea TPC-urilor in carcinogeneză. Multe dintre aceste cercetări vor putea evidenția noi ținte ale terapiei neoplazice.

## **Capitolul 5. Evaluarea rolului polimorfismului T300A din gena ATG16L1 în cancerul colorectal**

### *Obiectiv*

Scopul acestui sub-studiu este acela de a evalua ipoteza că ATG16L1 T300A (898 A> G) influențează riscul de apariție a CCR. Acest polimorfism a fost selectat pe baza datelor funcționale privind rolul său potențial în autofagie și carcinogeneză, în special la nivelul tractului gastro-intestinal. (Deretic, V. et al, 2013; Gillen, C. D., et al, 1994; Boland, C. R. et al, 2010)

### *Material și metode*

*Pacienți și probe.* Un număr total de 351 de subiecți români (109 de pacienți diagnosticați cu cancer colorectal sporadic și 242 indivizi sănătoși) au fost incluși în acest studiu. Indivizii sănătoși (control) cu aceleași origini etnice și geografice au fost recrutați din rândul voluntarilor internați în același timp în spital, dar fără un istoric de tumori, boli inflamatorii sau infecțioase. S-au recoltat probe de sânge de la ambele grupuri. Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie din Craiova, România a aprobat acest studiu și toți subiecții au semnat formularul de consimțământ informat.

*Extracția de ADN și genotiparea.* ADN-ul genomic a fost extras din sângele periferic recoltat pe EDTA, utilizând Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Genotiparea s-a realizat utilizând TaqMan assay, Applied Biosystems (Foster City, CA, USA): ATG16L1 T300A (+898A>G, rs2241880, assay C\_9095577\_20).

## **Rezultate și Discuții**

### *Frecvența genotipului și riscul de cancer colorectal în populația din România.*

O asociere semnificativă a fost observată la subiecții de sex masculin cu genotip GG, care au avut un risc mai mare pentru cancer colorectal (OR 2.76, 95% CI: 1.12-6.79,  $p = 0,019$ ), comparativ cu cei cu genotip AA. În plus, nu s-a găsit nicio corelație între cazurile cu cancer colorectal și cazurile control la subiecții de sex feminin cu genotip GG (OR 1.19, 95% CI: 0.445 - 3.2,  $p = 0.722$ ) sau AG (OR 1.26, 95% CI: 0.51-3.15,  $p = 0.607$ ).

Asocierea polimorfismului ATG16L1 T300A (898 A> G) cu stadiul Dukes și subtipul histologic a fost evaluată separat (A, B, C, D). Într-o analiză stratificată asocierea a fost remarcată la subiecții cu genotip GG doar la cazurile moderat și slab diferențiate (OR 5.15, 95% CI: 1.47-18.06,  $p = 0,005$ ). Nu au fost observate diferențe semnificative între stadiul tumorii (A + B), localizare sau gradul de diferențiere și lotul control.

Autofagia este calea utilizată de celule în timpul privării de nutrienți (Naser, S. A et al, 2012). Autofagia este implicată în procesele infecțioase, ajutând celulele să scape de antigene străine prin distrugerea agentului patogen (Naser, S. A et al, 2012). Această cale poate fi, de asemenea, privită ca un mecanism de reperare și degradare controlată a organitelor și proteinelor deteriorate. Autofagia este o cale complexă, modulată de mai multe mecanisme moleculare care au rămas încă necunoscute. Au fost identificate aproximativ 30 de gene ATG implicate în autofagie, cu 2 proteine cu caracteristici ubiquitin-like cum ar fi, ATG 12 și ATG 8 (Read, S. et al, 2000; Mehrpour, M. et al, 2012). Proteina ATG16L1 este exprimată în colon, intestinul subțire, celulele epiteliale intestinale, leucocite și splină (Fujita, N. și colab 2008). În 2010, un studiu a arătat că o mutație a ATG16L: ATG16L1 - Thr300Ala

(rs2241880), localizată pe cromozomul 2, este asociată cu debutul bolii Crohn ileale, proteina codificată de această genă fiind prin urmare, o componentă cheie în elucidarea aspectelor genetice ale acestei boli (Sventoraityte, J . colab, 2010).

O a doua raportare a asocierii ATG16L cu boala Crohn s-a realizat în urma unui studiu caz-control efectuat în American de Nord pe 988 de pacienți cu boală Crohn și 1007 subiecți control (Rioux, JD et al, 2007). Având în vedere faptul că pacienții cu boli inflamatorii digestive, în special boală Crohn, au un risc de șase ori mai mare de a dezvolta cancer colorectal, au fost efectuate mai multe studii cu scopul de a descoperi o potențială legătură între genele implicate în autofagie și susceptibilitatea la acest tip de cancer (Brest P. et al, 2010). Astfel, un studiu realizat de Kang MR și colegii în 2009, indică faptul că mutații cu decalarea cadrului de citire în genele ATG, cu repetiții mononucleotidice, apar în carcinoamele gastrice și colorectale, sugerând că aceste mutații pot contribui la dezvoltarea cancerului prin dereglarea procesului de autofagie (Kang MR et al., 2009). În acest studiu caz-control realizat pe populația din România s-a urmărit dacă acest polimorfism cu rol în autofagie influențează dezvoltarea cancerelor colo-rectale sporadice și progresia lor.

Este necesară studierea existenței legăturii dintre gena ATG16L1, boala Crohn și predispoziția pacienților cu CD la cancer colorectal. Este dovedit faptul că unele variante ale acestei gene sunt asociate cu boala Crohn, autofagia având un rol critic în patogeneza bolii.

În acest studiu s-a observat prezența unei asocieri între polimorfismul ATG16L1 T300A (898 A> G) și riscul apariției CCR în populația din România. Indivizii de sex bărbătesc cu genotip GG au risc mai mare pentru cancer colorectal. Cu toate că acest studiu arată o asociere puternică în cazurile de cancer colorectal moderat și slab diferențiate, loturile de dimensiuni mici elimină concluziile certe. Sunt necesare

cercetări suplimentare în diferite grupuri etnice pentru a îmbunătăți nivelul de cunoștințe referitoare la rolul autofagiei în această patologie.

## Concluzii

- Rezultatele noastre au arătat că între modelele animale experimentale TPC2 KO și WT există diferențe semnificative în ceea ce privește expresia anumitor antigene de suprafață în populația limfocitară din splină, timus și ganglionii limfatici.
- De asemenea, am arătat că modelul experimental TPC2 KO este mai susceptibil la colita indusă prin DSS și că dezvoltă leziuni mult mai grave după administrarea DSS decât modelul WT.
- Mai multe gene implicate în inflamație par a avea un nivel de expresie mai mare la modelul TPC2 KO, comparativ cu modelul WT după ingestia DSS.
- Aceste rezultate sunt importante pentru dezvoltarea studiilor experimentale ulterioare, mai ales pe modelul TPC2 KO, în scopul îmbunătățirii managementului și terapiei bolilor inflamatorii cronice, cum ar fi boala Crohn, colita ulcerativă sau cancerul colorectal.
- Nivelul de expresie al TPCN1 și TPCN2 în țesutul peritumoral neinvadat este mai mare comparativ cu cel tumoral, indicând faptul că TPCN1 și TPCN2 pot constitui markeri utili în studiul CCR.
- În populația din România susceptibilitatea la cancerul colorectal este influențată de prezența polimorfismului ATG16L1 T300A (898 A> G) astfel: bărbații care au genotipul GG ar prezenta un risc mai mare pentru CCR.

- Îmbunătățirea cunoștințelor referitoare la rolul autofagiei în dezvoltarea cancerului colorectal necesită efectuarea de studii suplimentare pe diferite grupuri etnice. De asemenea, se impune realizarea unor studii experimentale care să arate dacă există o legătură puternică între TPCN, autofagie și dezvoltarea leziunilor inflamatorii cronice precum cele din boala Crohn, colita ulcerativă sau cancerul colorectal.

### **Bibliografie selectivă**

Berg, D. J., Zhang, J., Weinstock, J. V., Ismail, H. F., Earle, K. A., Alila, H., ... & Lynch, R. G. (2002). Rapid development of colitis in NSAID-treated IL-10-deficient mice. *Gastroenterology*, 123(5), 1527-1542.

Boland, C. R. (2010). Chronic inflammation, colorectal cancer and gene polymorphisms. *Digestive Diseases*, 28(4-5), 590-595.

Brailoiu, E., Churamani, D., Cai, X., Schrlau, M. G., Brailoiu, G. C., Gao, X., & Patel, S. (2009). Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling. *The Journal of cell biology*, 186(2), 201-209.

Brest, P., Corcelle, E. A., Cesaro, A., Chargui, A., Belaid, A., Klionsky, D. J. ... & Mograbi, B. (2010). Autophagy and Crohn's disease: at the crossroads of infection, inflammation, immunity, and cancer. *Current molecular medicine*, 10(5), 486.

Calcraft, P. J., Ruas, M., Pan, Z., Cheng, X., Arredouani, A., Hao, X., & Zhu, M. X. (2009). NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*, 459(7246), 596-600.

Carta, S., Lavieri, R., & Rubartelli, A. (2013). Different members of the IL-1 family come out in different ways: DAMPs vs. cytokines? *Frontiers in immunology*, 4.

Churchill, G. C., Okada, Y., Thomas, J. M., Genazzani, A. A., Patel, S., & Galione, A. (2002). NAADP Mobilizes  $Ca^{2+}$  from Reserve Granules, Lysosome-Related Organelles, in Sea Urchin Eggs. *Cell*, 111(5), 703-708.

Croitoru, K., & Ernst, P. B. (1991). Leukocytes in the intestinal epithelium: an unusual immunological compartment revisited. *Regional immunology*, 4(2), 63-69.

- Deretic, V., Saitoh, T., & Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(10), 722-737.
- Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell*, 19(5), 2092-2100.
- Gillen, C. D., Andrews, H. A., Prior, P., & Allan, R. N. (1994). Crohn's disease and colorectal cancer. *Gut*, 35(5), 651-655.
- Gómez-Suaga, P., Fdez, E., Blanca Ramírez, M., & Hilfiker, S. (2012). A Link between Autophagy and the Pathophysiology of LRRK2 in Parkinson's Disease. *Parkinson's disease*, 2012.
- Høivik, M. L., Moum, B., Solberg, I. C., Henriksen, M., Cvancarova, M., & Bernklev, T. (2013). Work disability in inflammatory bowel disease patients 10 years after disease onset: results from the IBSEN Study. *Gut*, 62(3), 368-375.
- Kang, M. R., Kim, M. S., Oh, J. E., Kim, Y. R., Song, S. Y., Kim, S. S., ... & Lee, S. H. (2009). Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *The Journal of pathology*, 217(5), 702-706.
- Kitajima, S., Morimito, M., Sagara, E., Shimizu, C., & Ikeda, Y. (2001). Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IQI/Jic mice. *Experimental animals*, 50(5), 387-395.
- Lewis, P. A., & Manzoni, C. (2012). LRRK2 and human disease: a complicated question or a question of complexes?. *Science Signaling*, 5(207), pe2.
- Lin-Moshier, Y., Walseth, T. F., Churamani, D., Davidson, S. M., Slama, J. T., Hooper, R., & Marchant, J. S. (2012). Photoaffinity labeling of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) targets in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), 2296-2307.
- Lloyd-Evans, E., & Platt, F. M. (2011). Lysosomal Ca<sup>2+</sup> homeostasis: Role in pathogenesis of lysosomal storage diseases. *Cell calcium*, 50(2), 200-205.
- Mähler, M., Bristol, I. J., Leiter, E. H., Workman, A. E., Birkenmeier, E. H., Elson, C. O., & Sundberg, J. P. (1998). Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 274(3), G544-G551.
- Malani, P. N. (2012). Harrison's principles of internal medicine. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 308(17), 1870-1879.
- Mehrpour, M., Botti, J., & Codogno, P. (2012). Deep Insight Section. <http://AtlasGeneticsOncology.org>, 165.

- Melgar, S., Karlsson, A., & Michaëlsson, E. (2005). Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(6), G1328-G1338.
- Morgan A. J., Platt F. M, Lloyd-Evans E. & Galione A. (2011). Molecular mechanisms of endolysosomal Ca<sup>2+</sup> signalling in health and disease. *Biochemical Journal*, 439(3), 349-374.
- Naser, S. A., Arce, M., Khaja, A., Fernandez, M., Naser, N., Elwasila, S., & Thanigachalam, S. (2012). Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 18(5), 412.
- Neurath, M., Fuss, I., & Strober, W. (2000). TNBS-colitis. *International reviews of immunology*, 19(1), 51-62.
- Ng, Siew. C., Bernstein, C. N., Vatn, M. H., Lakatos, P. L., Loftus, E. V., Tysk, C., ... & Colombel, J. F. (2013). Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut*, 62(4), 630-649.
- Nys, K., Agostinis, P., & Vermeire, S. (2013). Autophagy: a new target or an old strategy for the treatment of Crohn's disease?. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*.
- Patel, S., Ramakrishnan, L., Rahman, T., Hamdoun, A., Marchant, J. S., Taylor, C. W., & Brailoiu, E. (2011). The endo-lysosomal system as an NAADP-sensitive acidic Ca<sup>2+</sup> store: Role for the two-pore channels. *Cell calcium*, 50(2), 157-167.
- Patel, S., & Docampo, R. (2010). Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Trends in cell biology*, 20(5), 277-286.
- Perše, M., & Cerar, A. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *BioMed Research International*, 2012.
- Podolsky, D. K. (2002). The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 16(6), 933-943.
- Read, S., Malmström, V., & Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine*, 192(2), 295-302.
- Rioux, J. D., Xavier, R. J., Taylor, K. D., Silverberg, M. S., Goyette, P., Huett, A., ... & Brant, S. R. (2007). Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature genetics*, 39(5), 596-604.



Sheridan, B. S., & Lefrançois, L. (2012). Isolation of Mouse Lymphocytes from Small Intestine Tissues. *Current Protocols in Immunology*, 3-19.

Stevceva, L., Pavli, P., Buffinton, G., Wozniak, A., & Doe, W. (1999). Dextran sodium sulphate-induced colitis activity varies with mouse strain but develops in lipopolysaccharide-unresponsive mice. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 14(1), 54-60.

Sventoraityte, J., Zvirbliene, A., Franke, A., Kwiatkowski, R., Kiudelis, G., Kupcinskas, L., & Schreiber, S. (2010). NOD2, IL23R and ATG16L1 polymorphisms in Lithuanian patients with inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 16(3), 359.

Van Limbergen, J., Stevens, C., Nimmo, E. R., Wilson, D. C., & Satsangi, J. (2009). Autophagy: from basic science to clinical application. *Mucosal immunology*, 2(4), 315-330.

Zhu, M. X., Ma, J., Parrington, J., Calcraft, P. J., Galione, A., & Evans, A. M. (2010). Calcium signaling via two-pore channels: local or global, that is the question. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 298(3), C430-C441.

Wirtz, S., & Neurath, M. F. (2007). Mouse models of inflammatory bowel disease. *Advanced drug delivery reviews*, 59(11), 1073-1083.

Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., & Neurath, M. F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature protocols*, 2(3), 541-546.