

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI CLUJ-NAPOCA

Facultatea de Biologie și Geologie

Catedra de Genetică Moleculară

Doctorand Roxana Ola

Metilarea ADN și controlul genelor implicate în procesele maligne

Rezumatul tezei de doctorat

Coordonator științific

Acad. Prof. Dr. OCTAVIAN POPESCU

CLUJ-NAPOCA

2012

CUPRINS

PUBLIICAȚII	4
ABREVIERI	5
PARTEA TEORETICĂ	6
1 INTRODUCERE	7
1.1 Mecanismele epigenetice	7
1.1.1 Metilarea ADN	8
1.1.1.1 Reacția de ADN metiltransferază	10
1.1.1.2 Proteinele implicate în reacția de ADN metiltransferază	10
1.1.1.3 Proteina DNMT1	11
1.1.1.4 Pproteine DNMT2	11
1.1.1.5 Proteina DNMT3	12
1.1.1.6 Proteine de legare a metil citozinei	12
1.1.2 Factorii de remodelare ai cromatinei	14
1.1.2.1 Cromatina	14
1.1.2.2 Factorii de remodelare dependenți de ATP	15
1.1.3 Modificări ale histonelor și codul histonic	16
1.1.3.1 Asamblarea cromatinei	18
1.1.3.2 Complexele proteice Polycomb	18
1.2 Implicații ale metilării ADN	19
1.2.1 Metilarea ADN în timpul embriogenezei	19
1.2.2 Inactivarea Cromozomului X	20
1.2.3 Hipometilarea ADN și telomerii	21
1.2.4 Metilarea ADN în amprentarea genică	21
1.2.5 Metilarea ADN și elementele transpozabile	21
1.2.6 Metilarea ADN în diferențierea celulară	22
1.2.7 Demetilarea ADN	22
1.3 Mecanismele epigenetice în carcinogeneză	22
1.3.1 Metilarea ADN în cancer	24
1.3.1.1 Hipometilarea globală	25
1.3.1.2 Hipometilarea oncogenelor	26
1.3.1.3 Hipermetilarea genelor tumorale supresoare	27
1.3.2 Rolul mi-ARN-urilor în cancer	28
1.3.2.1 Reglarea mecanismelor de către miRNA-uri	28
1.3.2.2 Controlul miRNA-urilor prin mecanisme epigenetice	29
1.3.3 Metilarea ADN- marker în inițierea tumorală	30
1.3.4 Metilarea ADN în predicția tratamentului	30
1.3.5 Metilarea ADN ca și ținta terapeutică	31
1.3.6 Importanța clinică a mecanismelor epigenetice	31
1.4 Cancerul de plaman cu celule de tip non-small (NSCLC)	32
1.5 Glioblastoamele	33
1.6 Oncogene Igf-1r	34
1.6.1 Strategii moleculare pentru inhibarea IGF	35
PARTEA EXPERIMENTALA	36
2 OBIECTIVELE STUDIULUI	37
3 MATERIALE SI METODE	38
3.1 Linii celulare și reactivi	38
3.2 Metoda MTT	38
3.3 Tratamentul celular	39
3.3.1 Tratamentul celular cu SAM	39
3.3.2 Tratamentul celular cu 5Aza-dC	39
3.4 Extracția ADN	39
3.5 Tratamentul cu bisulfit	40
3.6 PCR-ul specific metilării ADN	41
3.7 Măsurarea proteică	42

3.8	Tehnica de Western blot	43
3.9	Analize statistice	44
4	REZULTATE	45
4.1	Profilul de metilare al genei <i>igf-1r</i> în linii de NSCLC și GB	45
4.1.1	Identificarea regiunii promotoare a genei <i>Igf-1r</i>	46
4.1.2	Metilarea genei <i>Igf-1r</i> și expresia de proteină IGF-1R în liniile de NSCLC și GB	47
4.1.3	Efectul SAM asupra viabilității celulare a liniilor de NSCLC și GB	51
4.1.4	Efectul SAM asupra profilului de metilare al genei <i>Igf-1r</i>	57
4.1.5	Efectul SAM asupra expresiei de proteină IGF-1R	62
4.2	Profilul de metilare al genelor <i>p16</i> și <i>Rb1</i> în liniile de NSCLC și GB	67
4.2.1	Metilarea genelor <i>p16/Rb1</i> în liniile de NSCLC și GB	68
4.2.2	Expresia de proteine <i>P16</i> și <i>RB1</i> în liniile de NSCLC și GB	71
4.2.3	Efectul 5Aza-dC asupra viabilității celulare	73
4.2.4	Efectul tratamentului cu 5Aza-dC asupra expresiei de genă <i>p16</i>	79
4.2.5	Efectul tratamentului cu 5Aza-dC asupra expresiei de proteină <i>P16</i>	81
5	DISCUȚII	83
6	CONCLUZII	98
7	MULȚUMIRI	103
8	BIBLIOGRAFIE	104

Cuvinte cheie: metilarea ADN, receptorul factorului de creștere insulenic 1 (*Igf-1r*), cancer de plămân cu celule de mărime diferită (NSCLC), glioblastom (GB), carcinogeneză

Rezumat

Metilarea *de novo* în cadrul regiunilor promotoare ale genelor implicate în creșterea celulară poate induce inactivarea transcrierii ADN, oferind astfel avantajul inițierii și dezvoltării de tumori maligne. Pe de altă parte, schimbări în profilul de metilare al proto-oncogenelor reprezintă unul din mecanismele responsabile pentru proliferarea celulară necontrolată prin supraexprimarea oncogenelor.

Cancerul pulmonar cu celule de tip non-small (NSCLC) și Glioblastoamele (GB) sunt printre cele mai letale forme de cancer. În ciuda existenței unui tratament multimodal, acești pacienți au un prognostic rezervat, justificând necesitatea descoperirii de noi abordări terapeutice.

O activitate crescută a oncogenei *Igf-1r* a fost observată în multe tipuri de cancer, inclusiv în cancerul pulmonar și în tumorile gliale. Dar, mecanismul molecular responsabil de supraexprimarea genei rămâne a fi elucidat.

În prima parte a studiului a fost investigat profilul de metilare al oncogenei *Igf-1r* în linii celulare de NSCLC și GB. Deasemenea, studiul a evaluat posibilitatea utilizării unor agenți de hipermetilare în tratamentul cancerului. Rezultatele obținute arată că oncogena *Igf-1r* este parțial metilată în toate cele 6 linii de NSCLC și în cele 2 linii de GB analizate. Pentru a

determina dacă creșterea profilului de metilare al genei *Igf-1r* poate induce scăderea nivelului de proteină IGF-1R, celulele canceroase au fost tratate cu un agent de metilare, S'Adenosil-metionina (SAM). S-a observat un răspuns diferențiat al viabilității celulare la tratamentul cu SAM pe liniile celulare studiate, fără ca agentul de metilare să influențeze profilul de metilare al oncogenei *Igf-1r*, sugerând faptul că efectul citotoxic indus de SAM nu este determinat de modificarea profilului de metilare al genei *Igf-1r*.

Modificări în exprimarea genelor tumorale supresoare *p16* și *Rb1*, implicate în reglarea ciclului celular sunt adesea întâlnite în cancer. Astfel, în a doua parte a studiului a fost analizat profilul de metilare al genelor *p16* și *Rb1* în aceleași linii tumorale. S-a observat metilarea genei *p16* în două linii celulare de NSCLC și într-o singură linie celulară de GB. În urma tratamentului cu agentul de demetilare, 5Aza-dC, nivelul de proteină P16 a fost restaurat în celulele cu gena *p16* inițial metilată, sugerând posibilitatea utilizării agenților de demetilare în oprirea creșterii tumorale prin reactivarea genelor dormante inhibate prin metilare *de novo*.

A. Introducere

Epigenetica face referire la mecanismul prin care informația genetică sau fenotipul celular pot fi transmise de la o generație la alta, de-a lungul diviziunilor celulare ('epi' în limba greacă înseamnă 'deasupra'). Odată cu creșterea puterii noastre de înțelegere a mecanismelor genetice, a devenit totuși evident faptul că funcționalitatea genelor nu este determinată numai de secvențele ADN din genom. Un interes major îl constituie descifrarea mecanismelor și a evenimentelor care au loc în interiorul unei celule eucariote și care nu sunt conținute în secvența ADN.

A.1. Mecanismele epigenetice în cancer

Cancerul este un grup heterogen de boli din punct de vedere clinic, anatomo-patologic și molecular, în care un grup de celule cu proprietăți biologice diferite de celulele normale din organism sunt caracterizate prin creștere și diviziune necontrolată, invazie și adesea metastazare.

Cuvântul 'cancer' provine de la Hippocrate - părintele medicinei, care a folosit cuvintele grecești, 'carcinos' și 'carcinom' (traducere-crab) pentru a descrie tumorile maligne.

Dezvoltarea procesului malign depinde atât de aberații genetice cât și de cele epigenetice. În ultimii ani, s-a arătat că metilarea ADN poate fi un indicator al activității genice, precum și al organizării întregului genom, aceste evenimente epigenetice având rol în inițierea neoplaziilor. Mecanismele epigenetice aberante se manifestă la nivel de cromatină, afectând regiunile promotoare ale genelor care influențează procesul de transcriere al unor factori importanți pentru creșterea și dezvoltarea celulară.

A.1.1. Metilarea ADN

Metilarea citozinelor în poziția 5' a inelului pirimidinic este o modificare adesea dar nu exclusiv întâlnită în ADN-ul mamiferelor la nivelul secvențelor CpG.

La mamifere, regiunile bogate în dinucleotide CpG sunt numite ‘insule CpG’; în genomul uman cel puțin 60% din regiunile promotoare ale genelor care codifică proteine sunt asociate cu o insulă CpG. În funcție de densitatea grupărilor metil din regiunile promotoare situate la capatul 5’ terminal sau în primul exon/intron al genei, metilarea ADN va dicta poziția și momentul când este inițiată expresia genelor. Metilarea ADN oferă deasemenea informații asupra locului unde regiunile codante se regăsesc în gene.

În celulele normale, insulele CpG sunt nemetilate, în timp ce dinucleotidele CpG sporadice regăsite în restul genomului sunt metilate. În timpul procesului de îmbătrânire, are loc o inversare treptată a profilului de metilare, care conduce la metilarea insulelor CpG și la o pierdere globală a nivelului de metilare; această schimbare este foarte pronunțată și în decursul procesului de carcinogeneză.

În cancer au fost descrise trei evenimente majore legate de nivelul de metilare al citozinelor din insulele CpG: (1) reducerea în întregul genom a conținutului de 5-metilcitozină–hipometilare ADN globală. Hipometilarea globală induce instabilitate genomică, activarea retrotranspozomilor, a proto-oncogenelor sau a microARN, precum și pierderea amprentării genomice.

Proto-oncogenele sunt activate în timpul perioadelor de diviziune și diferențiere celulară rapidă și sunt în general asociate cu mecanismul de control al creșterii.

(2) hipermetilarea insulelor CpG în numeroase gene tumorale supresoare este asociată cu inhibarea procesului de transcriere ADN. Hipermetilarea insulelor CpG este considerată a fi modificarea epigenetică majoră în cancer.

Hipermetilarea este caracterizată prin (3) stimularea exprimării ADN metiltransferazelor (DNMTs), enzime responsabile de stabilitatea și menținerea profilului de metilare la nivel de ADN.

A.2. Proto-oncogena *Igf-1r*

Receptorul 1 al factorului de creștere insulenic (IGF-1R) este un receptor tirozin kinazic codificat de proto-oncogena *Igf-1r* cu rol în promovarea transformării maligne, în creșterea și supraviețuirea celulelor tumorale. Supraexprimarea proteinei sau creșterea activității *Igf-1r* a fost observată în diferite tipuri de cancer: în cancerul de sân [1, 2], în cancerul de plămân [3, 4], în cancerul de colon [5], în cancerul de prostată [6], în melanoame [7] și în tumorile gliale [8].

Activarea receptorului IGF-1R determină activarea căii de semnalizare subadiacente, având ca rezultat transformarea și creșterea proliferării și supraviețuirii celulelor maligne.

Gradul de exprimare al genei *Igf-1r* este determinat în mare măsură la nivel de transcriere ADN. Caracterizarea moleculară a genei *Igf-1r* a arătat că ambele regiuni 5’ sunt bogate în dinucleotidele CG [9, 10].

Mecanismul molecular responsabil pentru activitatea crescută a genei nu este pe deplin elucidat. Amplificări ale locusului *Igf-1r* au fost întâlnite doar în câteva cazuri de melanom și cancer de sân [1].

A.3. Genele supresoare tumorale *p16/Rb1*

Proteina P16 este un inhibitor al Ciclinei D1 și este implicată în oprirea ciclului celular în fază G1 [11]. Inactivarea genei *p16* determină activarea Ciclinei D1 și a proteinei retinoblastoma (RB1), având ca rezultat accelerarea creșterii necontrolate. Inactivarea genei *p16* prin deleții sau mutații punctiforme este adesea întâlnită în cancer. Însă un mecanism alternativ de inactivare al genei *p16* este metilarea regiunii promotoare și a primului exon [12, 13]. Astfel metilarea ADN, pe lângă modificările genetice reprezintă o cale alternativă de inactivare a genelor *p16* și *Rb1* în cancer.

B. Obiectivele studiului

- identificarea profilului de metilare al genei *Igf-1r* în liniile celulare de NSCLC și GB.
- evaluarea posibilității că metilarea genei *Igf-1r* este mecanismul răspunzător de supraexprimarea genei în cancer
- descoperirea unor noi strategii de inhibare a funcționalității *Igf-1r* prin utilizarea unor agenți de metilare ca și potențiali agenți terapeutici
- identificarea profilului de metilare al genelor *p16/Rb1* implicate în reglarea ciclului celular în diferite subtipuri de NSCLC și GB.
- evaluarea eficacității agenților de demetilare în reactivarea genei supresoare a tumorilor *p16* și efectul asupra viabilității celulare *in vitro*.

C. Materiale și metode

C.1. Linii celulare și reactivi

În acest studiu au fost folosite 6 linii celulare de NSCLC: U1810, U1752 (stabilizate la Universitatea din Uppsala [14]), H157, H125, H23 and A549 (achiziționate de la American Type Culture Collection) și 2 linii celulare de GB (18, 38) (stabilizate din tumori la Spitalul Academic Universitar din Uppsala și au fost descrise anterior [15]).

Toate celulele în cultură au fost menținute în condiții specificate în studii anterioare.

C.2. Testul de viabilitate celulară- MTT

Acest test se bazează pe conversia sării galbene de tetrazoliu (MTT) la cristale mov de formazan în prezența enzimelor reducătoare mitocondriale prezente în celulele metabolic active. În cazul studiului *Igf-1r*, celulele au fost cultivate și incubate pentru 7 zile în mediu de cultură conținând concentrații crescătoare SAM (New England Bio-labs) variind între 0.1μM-200μM.

În cazul studiului *p16/Rb1*, celulele au fost cultivate pentru 5 zile în mediu de cultură conținând concentrații crescătoare de 5Aza-dC (Sigma-Aldrich), variind între 500nM-10μM.

Rezultatele au fost analizate ca și curbe de creștere a celulelor tratate, comparativ cu celulele netratate.

C.3. Tratamentul celular

Celulele în cultură au fost tratate cu concentrații crescătoare de SAM (50μM-200μM) pentru studiul *Igf-1r* sau cu 0.5-5μM 5Aza-dC pentru studiul *p16/Rb1*.

C.4. PCR-ul specific metilării (MSP)

Profilul de metilare al probelor ADN a fost investigat prin reacția de PCR specifică metilării (MSP) în același mod cu cel descris în literatură [16]. ADN-ul extras a fost modificat cu ajutorul kitului CpGenome DNA modification kit (Chemicon, Sweden) urmând instrucțiunile din kit, urmat de PCR. Condițiile de PCR sunt descrise în amănunt în teză.

C.5. Reacția Western Blot

Cuantificarea proteinelor din soluția de liză s-a realizat cu metoda Bradford [17].

Pentru detecția expresiei proteice s-au folosit următorii anticorpii primari: anticorp policlonal reactiv pentru subunitatea β a IGF-1R, anticorp policlonal reactiv pentru P16 and RB1 (Santa Cruz Biotechnology) și un anticorp monoclonal produs în șoarece reactiv pentru β-Actină (Santa Cruz Biotechnology), iar anticorpii secundari au fost produși în șoarece sau iepure și conjugați cu HRP. Proteinele au fost apoi vizualizate folosind sistemul ECL (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suedia).

D. Rezultate

D.I. Profilul de metilare al genei *Igf-1r* în linii de NSCLC și GB

D.I.1. Identificarea regiunii promotoare a genei *Igf-1r*

1060 perechi de baze situate în regiunea 5' conținând regiunea promotoare a genei *Igf-1r* a fost scanată pentru insule CpG folosind softul MethPrimer [18]. Au fost identificate 2 insule CpG în regiunea promotoare, prima corespunzătoare nucleotidelor 49-278, iar cea de-a doua a fost regăsită între nucleotidele 711 și 937.

D.I.2. Metilarea genei *Igf-1r* și expresia de proteină IGF-1R în liniile de NSCLC și GB

Metilarea regiunii promotoare a genei *Igf-1r* a fost analizată în 6 linii celulare de NSCLC și 2 linii celulare primare de GB.

ADN-ul extras din liniile celulare a fost modificat cu bisulfite de sodiu, și amplificat cu ambele perechi de amorse. În toate liniile celulare s-a obținut amplificarea regiunii genice cu ambele perechi de amorse (Figura 1).

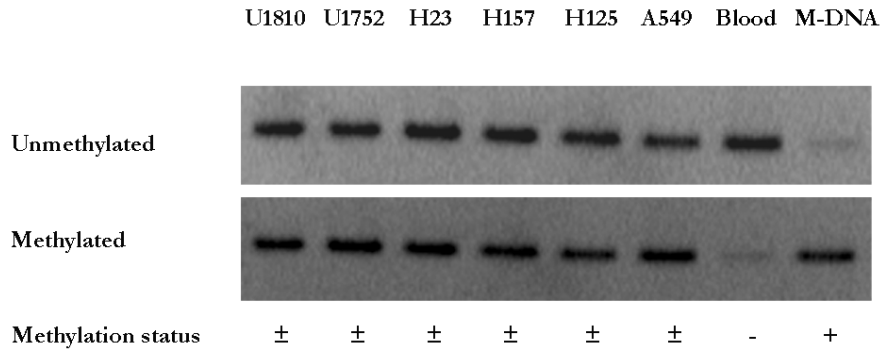


Figura 1. Profilul de metilare al genei *Igf-1r* în liniile de NSCLC. Producții PCR cu amorsele metilate (165nt), cu amorsele nemetilate (160nt); M-DNA—ADN-ul genomic total metilat (control pozitiv al fragmentului metilat); blood—ADN extras din sânge (control pozitiv al fragmentului nemetilat).

În acest studiu, nu a fost identificată nici o diferență în profilul de metilare al genei *Igf-1r* între diferitele subtipuri de cancer de NSCLC.

Amplificare atât cu amorsele metilate cât și cu cele nemetilate a fost obținută și în cazul liniilor primare de GB (Figura 2).

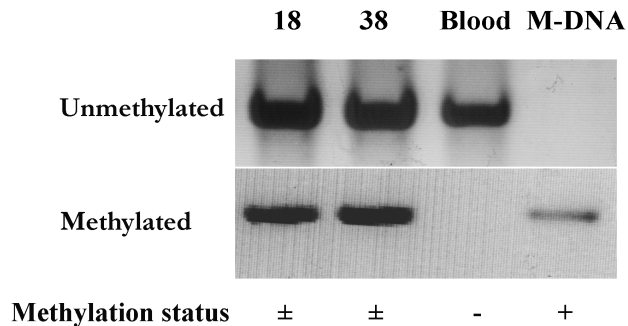


Figura 2. Profilul de metilare al genei *Igf-1r* în liniile de GB. Producții PCR cu amorsele metilate (165nt), cu amorsele nemetilate (160nt); M-DNA—ADN-ul genomic total metilat (control pozitiv al fragmentului metilat); blood—ADN-extras din sange (control pozitiv al fragmentului nemetilat).

Pentru determinarea corelației dintre expresia de genă și de protein, nivelul proteic al IGF-1R s-a determinat prin metoda Western Blot în toate liniile celulare luate în studiu.

Rezultatele obținute au arătat că toate liniile celulare luate în studiu exprimă proteina IGF-1R (Figura 3, Figura 4).

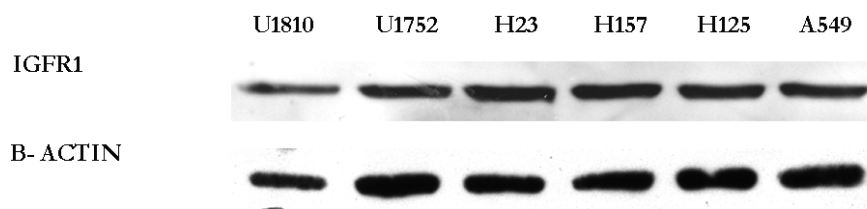


Figura 3. Nivelul de expresie proteică în liniile de NSCLC. Expresia proteinei IGF-1R în liniile de NSCLC: U1752, U1810, H23, H157, H125 și A549 prin metoda Western Blot. β-Actina –controlul de încărcare a gelului.

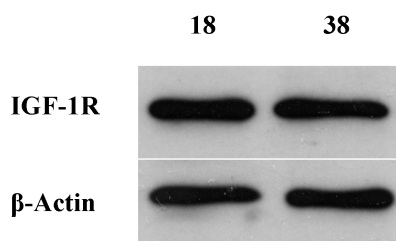


Figura 4. Nivelul de expresie proteică în liniile de GB. Expresia proteinei IGF-1R în liniile 18 și 38 prin metoda Western Blot. β-Actina –controlul de încărcare a gelului.

D.I.3. Efectul SAM asupra viabilității celulare a liniilor de NSCLC și GB

SAM este principalul donor de grupări metil în multe reacții biologice de metilare incluzând metilarea ADN la nivelul citozinelor din dinucleotidele CpG. Administrarea exogenă a SAM determină moartea celulelor maligne prin modificări produse la nivel de metilare ADN.

Pentru a determina efectul SAM asupra viabilității celulare, celulele în cultură au fost tratate cu diferite concentrații de SAM (0.1-200μM). Viabilitatea celulară a fost măsurată după 7 zile prin testul MTT. La concentrația maximă folosită (200μM), tratamentul cu SAM a indus reducerea viabilității celulare: 36% în linia U1810 (Fig. 5A), 18% în linia U1752 (Fig. 5B), 15% în linia H23 (Fig. 5C), 41% în linia H157 (Fig. 5D), 29% în linia H125 (Fig. 5E), și 22% în linia A549 (Fig. 5F) comparativ cu celulele netratate.

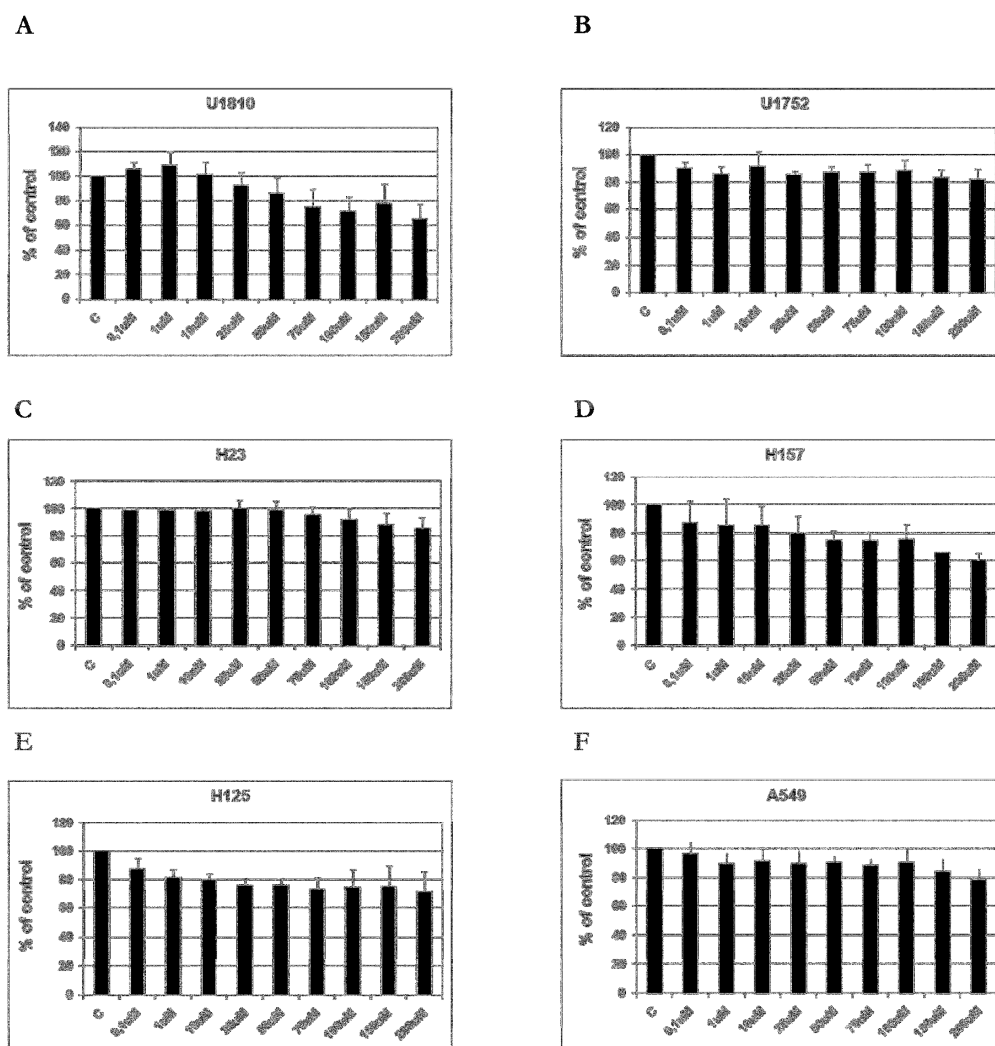
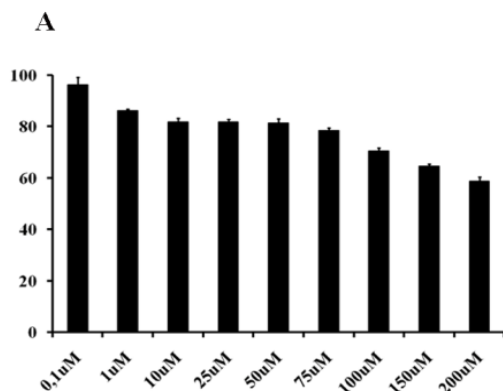


Figura 5. Testul de toxicitate celulară după tratamentul cu diferite concentrații de SAM în liniile de NSCLC. Aceiași număr de celule au fost cultivate în triplicat și expuse la concentrații crescătoare de SAM (0.1-200μM). Testul MTT pentru liniile: U1810 (A), U1752 (B), H23 (C), H157 (D), H125 (E) și A549 (F).

Pentru liniile de GB, profilul de inhibare al creșterii este descris în Figura 7. Linia celulară 38 a fost mai sensibilă la tratamentul cu SAM comparativ cu linia celulară 18. La concentrația de 200μM, moartea celulară indusă de SAM a fost de 52% în comparație cu linia celulară 18 (Figura 6A, 6B).

18



38

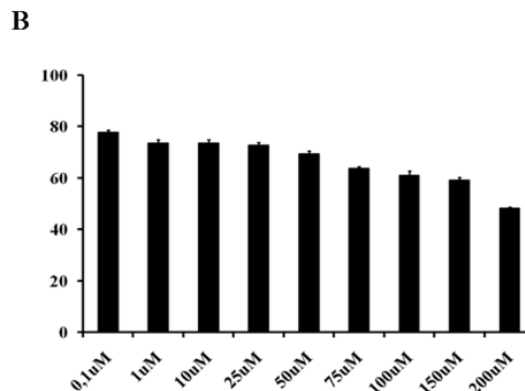


Figura 6. Testul de toxicitate celulară după tratamentul cu diferite concentrații de SAM în liniile de GB. Același număr de celule au fost cultivate în triplicat și expuse la concentrații crescătoare de SAM (0.1-200μM). Testul MTT pentru liniile: 18 (A) și 38 (B).

D.I.4. Efectul SAM asupra profilului de metilare al genei *Igf-1r*

Pentru a investiga dacă efectul SAM asupra viabilității celulare în liniile de NSCLC și GB se datorează hipermetilării regiunii promotore al genei *Igf-1r*, ADN-ul extras din celulele tratate a fost amplificat prin MSP cu ambele perechi de amorse iar profilul de metilare a fost comparat cu ADN-ul netratat. În mod neașteptat, SAM nu a determinat schimbări în profilul de metilare al genei *Igf-1r* în nici una din liniile celulare de NSCLC (Figura 7) sau de GB studiate (Figura 8).

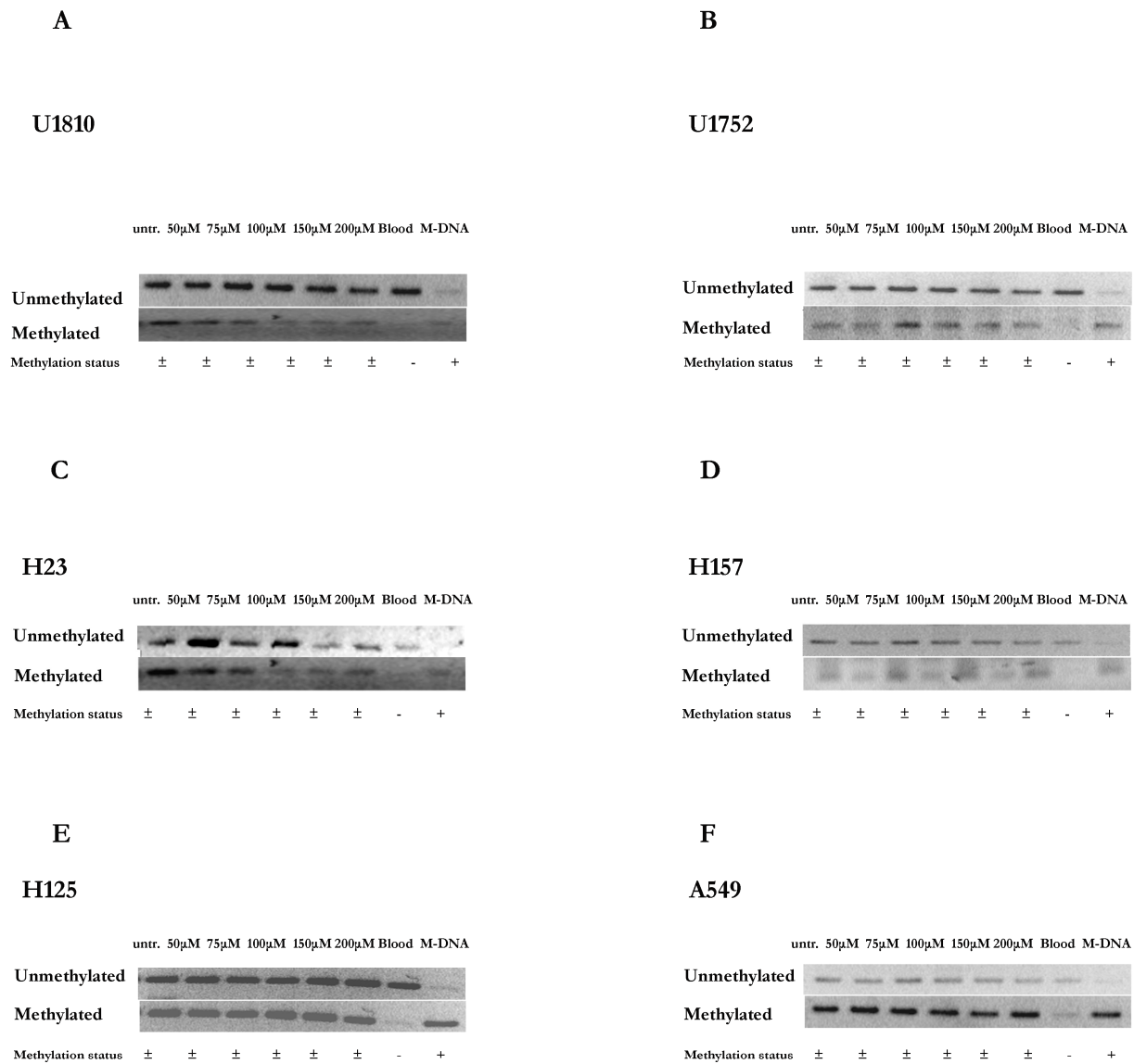


Figura 7. Profilul de metilare al genei *Igf-1r* după tratamentul cu SAM în liniile de NSCLC. Liniile celulare au fost tratate cu diferite concentrații de SAM (50-200 μ M). ADN-ul extras a fost tratat cu bisulfit de sodiu și amplificat prin metoda MSP. Metilarea parțială a genei *Igf-1r* a fost menținută în toate liniile celulare de NSCLC: U1810 (A), U1752 (B), H23 (C), H157 (D), H125 (E), A549 (F).

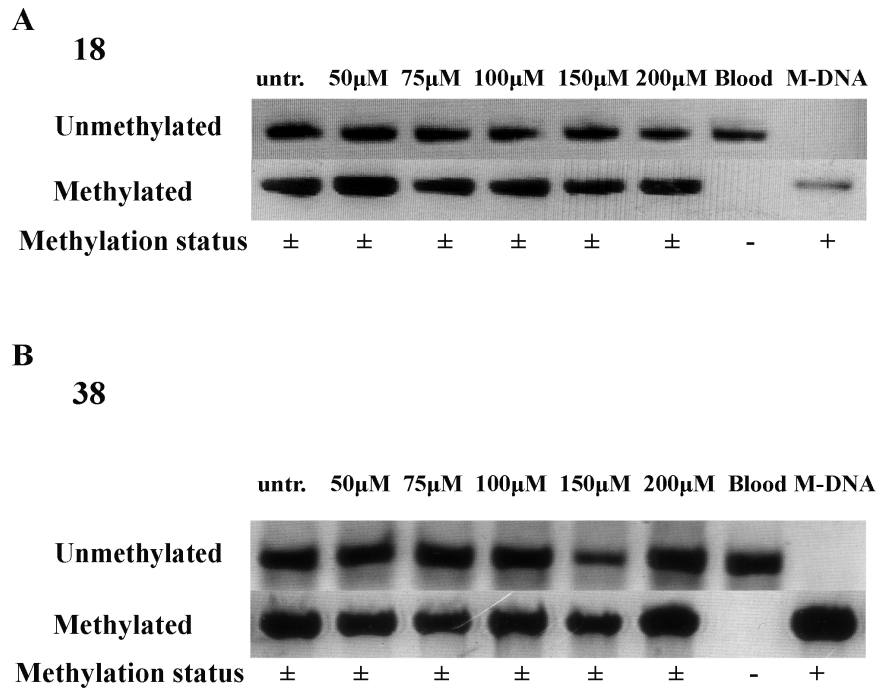


Figura 8. Profilul de metilare al genei *Igf-1r* după tratamentul cu SAM în liniile de GB. Liniile celulare au fost tratate cu diferite concentrații de SAM (50-200μM). ADN-ul extras a fost tratat cu bisulfite de sodiu și amplificat prin metoda MSP. Metilarea parțială a genei *Igf-1r* a fost obținută în ambele linii celulare de GB: 18 (A), 38 (B).

D.I.5. Efectul SAM asupra expresiei de proteină IGF-1R

Pornind de la ipoteza că SAM nu a avut efect asupra profilului de metilare al genei *Igf-1r*, în continuare nivelul de exprimare proteică a fost analizat în celulele în cultură tratate cu diferite concentrații de SAM. SAM nu a avut nici un efect asupra nivelului de expresie proteică al IGF-1R în nici una din liniile celulare de NSCLC (Figura 9) sau de GB (Figura 10).

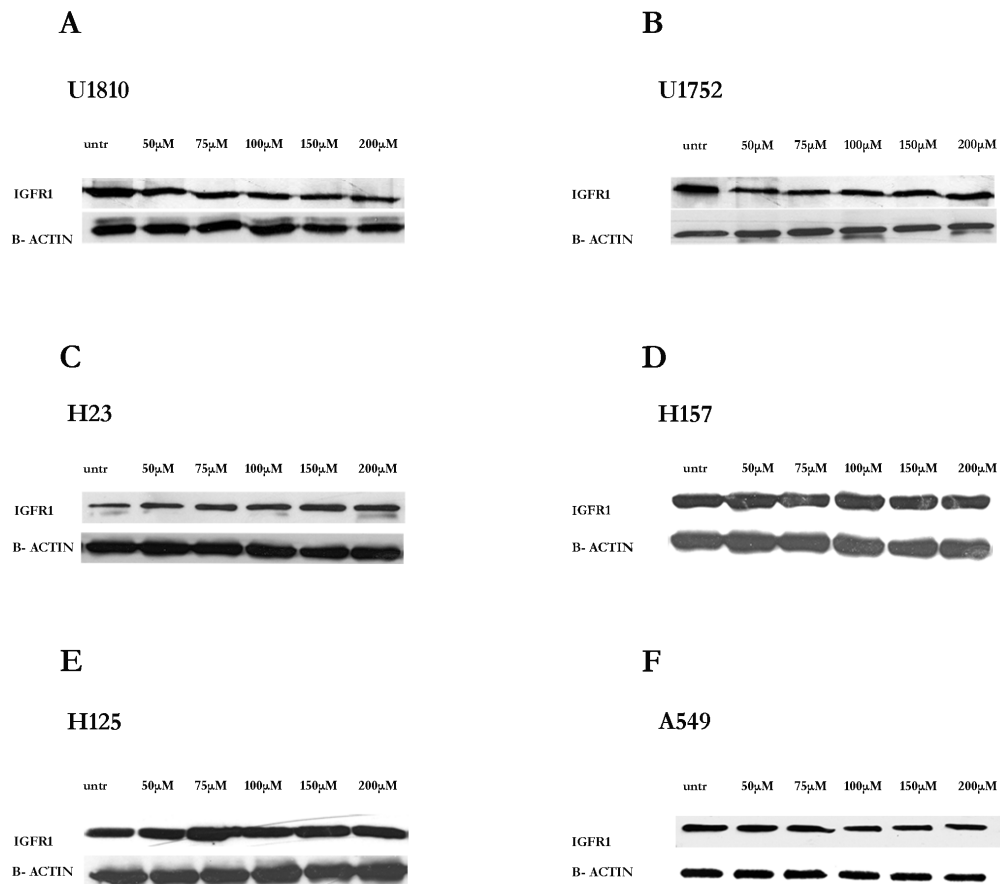


Figura 9. Expresia de proteină IGF-1R după tratamentul cu SAM în NSCLC. Expresia de IGF-1R în lizatele celulelor tratate în comparație cu cele netratate în liniile: U1810 (A), U1752 (B), H23 (C), H157 (D), H125 (E), A549 (F) ilustrată prin Western blot după tratamentul cu SAM pentru 7 zile. β -Actina a fost folosită ca și control de încărcare al gelului.

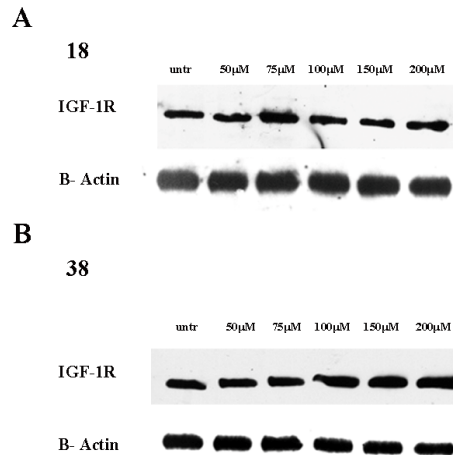


Figura 10. Expresia de proteină IGF-1R după tratamentul cu SAM în liniile de GB. Western blot al lizaturilor celulare după tratamentul cu SAM pentru 7 zile. Expresia de IGF-1R în celulele tratate comparativ cu cele netratate în liniile: 18 (A) și 38 (B).

D.II. Profilul de metilare al genelor *p16* și *Rb1* în liniile de NSCLC și GB

D.II.1. Metilarea genelor *p16/Rb1* în liniile de NSCLC și GB

În a doua parte a studiului, profilul de metilare al genelor tumorale supresoare *p16* și *Rb1* a fost investigată în aceleași linii celulare folosite în prima parte a studiului.

După tratamentul cu bisulfit, amplificarea cu amorsele metilate în cazul genei *p16* a fost obținută în 2 linii celulare de NSCLC: H23 și U1810 (Figura 11A) și în una din liniile celulare de GB: linia 18 (Figura 11B).

Amplificare cu amorsele care recunosc fragmentul nemetilat pentru *p16* a fost obținută în liniile celulare de NSCLC: U1752 și H157 (Figura 11A) și respectiv în linia 38 de GB (Figura 11B). Linia celulară A549 a fost caracterizată anterior prin deleția genei *p16* [19].

În cazul genei tumorale supresoare *Rb1*, s-a obținut amplificare numai cu amorsele care recunosc fragmentul nemetilat, atât în liniile de NSCLC, cât și în liniile de GB (Figura 11A,B).

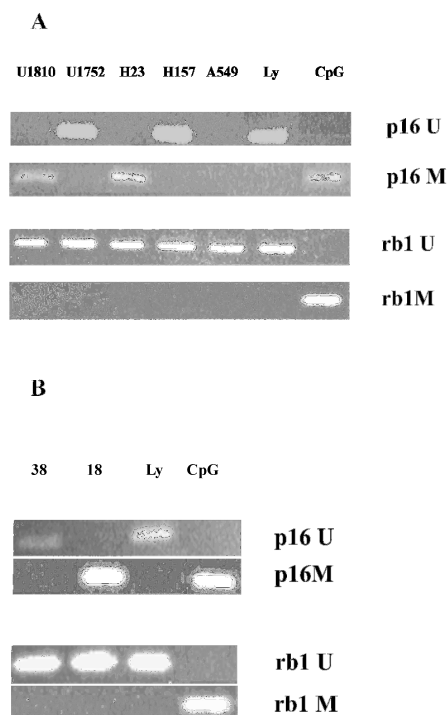


Figura 11. Profilul de metilare al genelor *p16* și *Rb1* în liniile celulare de NSCLC și GB. Amplificare obținută cu amorcele nemetilate (U) și metilate (M) în liniile de NSCLC: (A) U1810, U1752, H23, H157, A549, și în (B) liniile de GB: 38 and 18; Ly (controlul pozitiv al reacției de nemetilare); CpG: ADN-ul genomic universal metilat, (controlul pozitiv al reacției de metilare).

D.II.2. Expresia de proteine P16 și RB1 în liniile de NSCLC și GB.

Expresia de proteine P16 și RB1 a fost determinată prin metoda Western Blot în toate liniile celulare luate în studiu: în liniile de NSCLC: U1752, U1810, H23, H157, A549 și în cele 2 linii de GB: 18 și 38. Rezultatele obținute arată că proteina P16 a fost exprimată de liniile celulare unde s-a obținut amplificare cu amorcele nemetilate: în liniile de NSCLC: U1752 și H157 (Figura 12A) și în linia de GB 38 (Figura 12B). În liniile celulare, U1810, H23 (Figura 12A) și în linia celulară de GB 18 (Figura 12B) unde s-a obținut amplificare cu amorcele metilate, proteina P16 a fost absentă.

Proteina RB1 a fost exprimată endogen de către toate liniile celulare luate în studiu (Figura 12A,B).

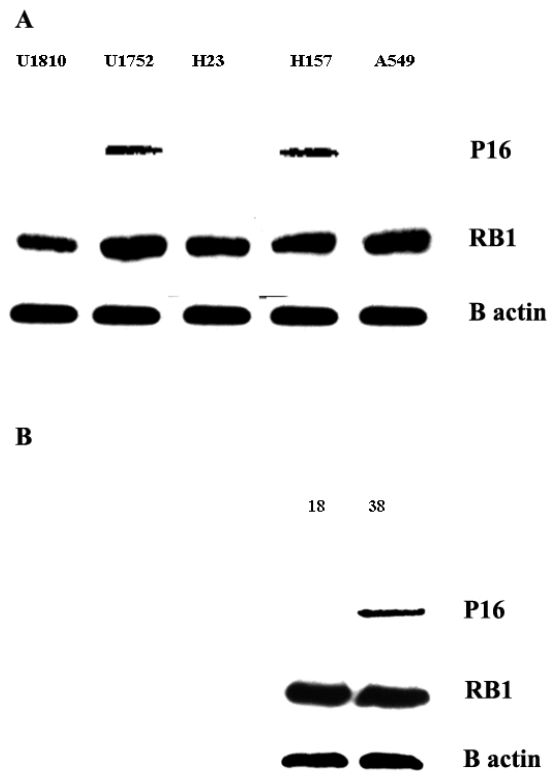


Figura 12. Determinarea expresiei de proteine P16 și RB1 prin metoda Western Blot. (A) în liniile de NSCLC U1752, U1810, H23, H157, H125, A549 și (B) în liniile de GB 18, 38; β -Actina - control pozitiv al încărcării gelului.

D.II.3. Efectul 5Aza-dC asupra viabilității celulare

Administrarea exogenă a 5Aza-dC induce moartea celulelor maligne prin efectul indus asupra metilării ADN. Pentru a determina efectul 5Aza-dC în supraviețuirea celulară, liniile de NSCLC și de GB au fost tratate cu diferite concentrații de 5Aza-dC (0.5-5 μ M) pentru 5 zile, iar viabilitatea celulară a fost măsurată prin testul MTT.

Tratamentul cu 5Aza-dC a indus scăderea viabilității celulare în funcție de concentrația folosită în liniile de NSCLC (Figura 13). În cazul liniilor celulare de GB, în linia 18, tratamentul cu 5Aza-dC a avut un efect mai proeminent în inhibarea creșterii celulare comparativ cu linia de GB 38 (Figura 13B).

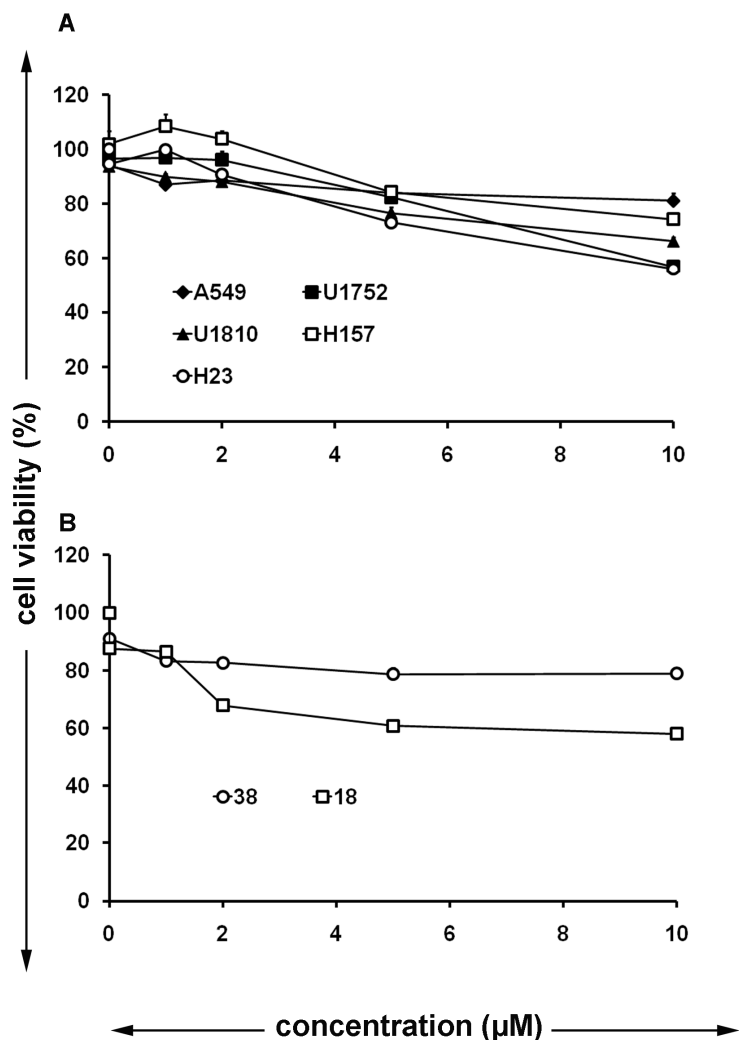


Figura 13. Efectul 5Aza-dC asupra viabilității celulare. Celulele au fost cultivate în triplicat și tratate timp de 5 zile cu concentrații crescătoare (0.5-10µM) de 5Aza-dC. Mediul de cultură a fost schimbat la fiecare 24 de ore. Toxicitatea celulară pentru (A) liniile de NSCLC: U1752, U1810, H23, H157, H125 și A549 pentru (B) liniile de GB: 18 și 38 GB.

D.II.4. Efectul tratamentului cu 5Aza-dC asupra expresiei de genă și proteină P16

Pentru a investiga o posibilă legătură între inhibarea creșterii celulare în urma tratamentului cu 5Aza-dC și reexprimarea genei/proteinei P16, ADN-ul celulelor tratate a fost amplificat și comparat cu ADN-ul extras din celulele netratate.

Re-exprimarea genei/proteinei P16 a fost obținută în liniile celulare unde inițial gena *p16* a fost metilată (în liniile celulare U1810 și H23 la o concentrație de 5µM 5Aza-dC (Figura 14B,D) și în linia de GB 18 la o concentrație de 2µM 5Aza-dC (Figura 14F). Amplificare cu amorsele nemetilate s-a obținut la aceleași concentrații de 5Aza-dC folosite pentru identificarea

proteinei P16: 5 μ M în cazul liniei U1810 și H23 NSCLC cells (Figura 14A,C) și 2 μ M 5Aza-dC în cazul liniei de GB 18 (Figura 14E).

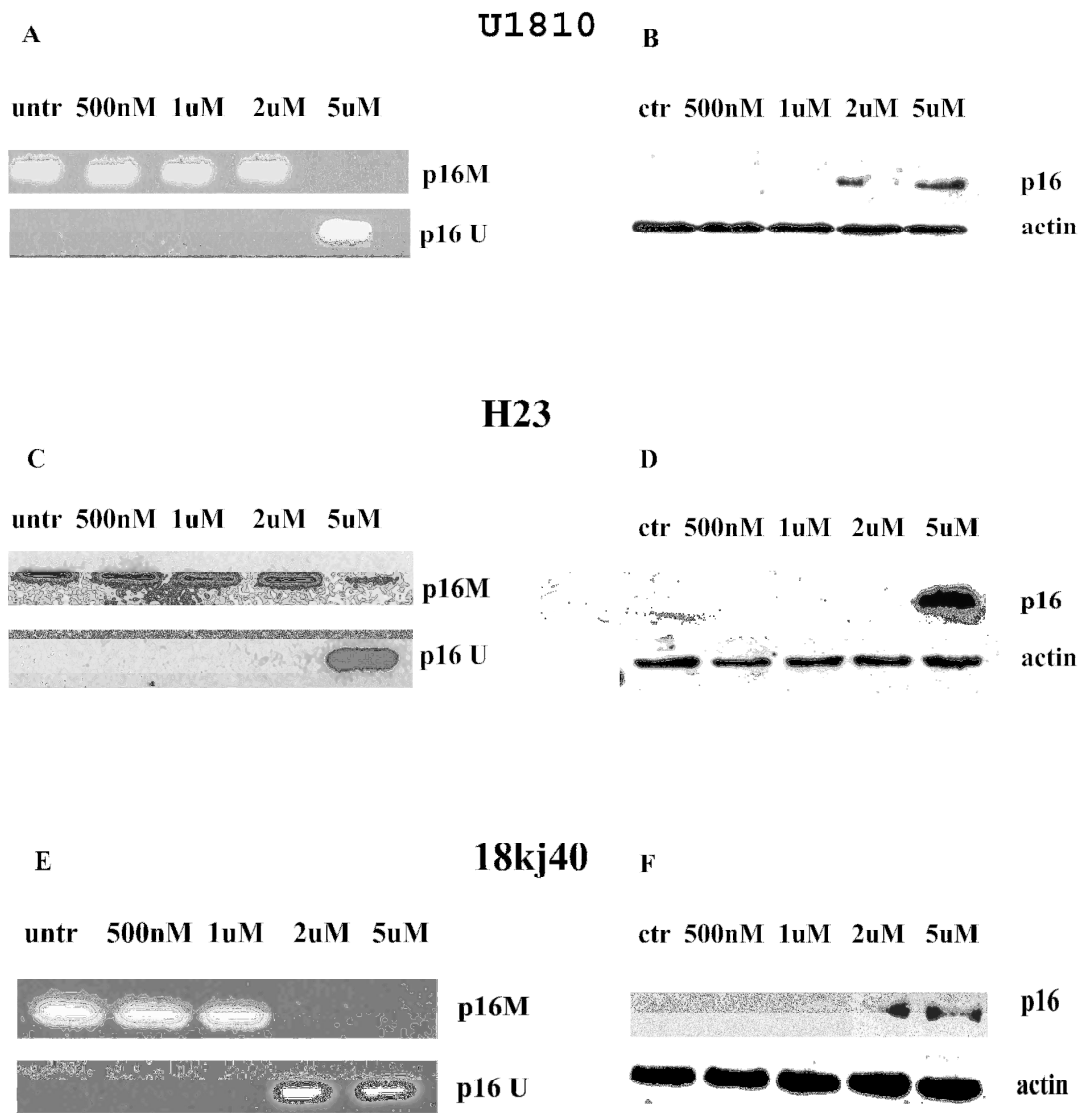


Figura 14. Efectul 5Aza-dC asupra reexprimării genei/proteinei P16. Celulele în cultură au fost tratate cu diferite concentrații de 5Aza-dC (0.5-5 μ M) pentru 5 zile. MSP a fost realizat comparativ cu celulele netratate. În U1810 și H23 s-a obținut amplificarea cu amorsele nemetilate (A,C) și reexprimarea proteinei P16 după tratamentul cu 5 μ M 5Aza-dC (B,D); în linia 18, amplificarea a fost obținută cu amorsele nemetilate (E) și proteina exprimată la o concentrație de 2 μ M 5Aza-dC (F).

E. Discuții

Metilarea ADN, modificarea histonelor și microARN-urile sunt trei mecanisme epigenetice implicate în dezvoltarea cancerului.

Hipometilarea globală determină supraexprimarea oncogenelor, activarea retrotranspozoniilor și instabilitate cromozomială având astfel un rol important în inițierea și menținerea fenotipului malign.

Mecanismul care determină hipometilarea în cancer nu este pe deplin elucidat, dar se cunoaște faptul că hipometilarea caracterizează majoritatea carcinoamelor.

Studii anterioare sugerează utilizarea metilării ADN ca și marker molecular în identificarea precoce a cancerului de plămân și în diagnosticul și prognosticul bolii maligne [20]. Profilul de metilare poate varia de la un tip celular la altul [21]. Astfel, în acest studiu au fost folosite 6 linii celulare de NSCLC aparținând la diferite subtipuri: cancer de plămân cu celule largi (U1810), de tip carcinoma scuamos (U1752, H125 and H157) și adenocarcinom (H23, A549) precum și 2 linii celulare primare de GB (18 and 38).

În liniile celulare de GB, gena *Igf-1r* a fost identificată ca și potențial marker genetic [22], iar în cazul cancerului pulmonar funcționalitatea genei este asociată cu un prognostic nefavorabil.

Deși mecanismele care conduc la exprimarea de proteină IGF-1R se cunosc, cele răspunzătoare de supraexprimarea oncogenei *Igf-1r* nu sunt pe deplin elucidate. Spre deosebire de alți receptori tirozin kinazici, în cazul genei *Igf-1r* nu au fost descrise mutații în cancer, cu excepția amplificării locusului *Igf-1r* la nivelul 15q2, în câteva cazuri de cancer de sân și melanoma [1].

Nivelul de exprimare al genei *Igf-1r* este determinat în mare măsură la nivel de transcriere. Posibilitatea ca metilarea aberantă a genei să fie mecanismul responsabil de nivelul crescut de expresie genică în cancer a fost principalul obiectiv al acestui studiu. Această ipoteză este încurajată de alte studii care demonstrează importanța hipometilării ADN în acumularea fenotipului malign. Hipometilarea este unul din mecanismele răspunzătoare pentru activitatea crescută a altor proto-oncogene: membrii ai familiei Eph de receptori tirozin kinazici (RTK), și oncogenele *c-fms*, *erbB2/neu*, *c-myc*, *hox11*, *h-ras* și *c-ros*.

Prin utilizarea programului 'MethPrimer', la nivelul regiunii promotore al oncogenei *Igf-1r* au fost identificate două insule CpG cu un conținut ridicat de dinucleotide CpG. Prin reacția de PCR specifică metilării s-a obținut un profil de metilare parțială al genei în toate cele 3 subgrupuri de NSCLC și în cele 2 linii celulare primare de GB. Metilarea parțială este definită prin prezența atât a produșilor de amplificare cu amorsele metilate cât și a celor cu amorsele nemetilate.

Dar, semnificația acestei metilări parțiale nu este pe deplin înțeleasă. Studii anterioare au identificat un profil de metilare parțială al genei *hTert* în mai multe linii celulare, dar toate aceste linii celulare au exprimat proteina- telomeraza. Metilarea parțială în acest caz nu a putut fi corelată cu nivelul de expresie al ARNm sau al proteinei hTERT, indicând faptul că metilarea parțială există și nu afectează expresia de genă.

Un profil de metilare parțială a fost identificat și pentru gena *Aprt* care codifică proteina adenina fosforibiziltransferază, iar acest profil este menținut atât *in vitro* cât și *in vivo*.

Legătura dintre profilul de metilare și expresia proteică corespunzătoare genelor metilate este bine stabilită. Expresia de proteină IGF-1R a fost analizată prin metoda Western Blot. În mod surprinzător, toate liniile celulare de NSCLC și de GB au exprimat proteina IGF-1R.

Profilului de hemimetilare al oncogenei *Igf-1r* ar putea avea o semnificație majoră având în vedere faptul că metilarea parțială nu a fost obținută pentru ADN-ul genomic total metilat (control pozitiv al fragmentului metilat) sau pentru ADN extras din sânge (control pozitiv al fragmentului nemetilat).

Pentru a identifica funcționalitatea acestui mecanism de metilare parțială al oncogenei *Igf-1r*, celulele în cultură au fost tratate cu SAM, principalul donor de grupări metil în reacțiile biochimice.

Mai multe studii au sugerat că administrarea exogenă a SAM determină scăderea viabilității celulelor canceroase prin hipermetilarea ADN la nivelul genelor implicate în creșterea celulară [23] iar SAM induce apoptoza în celulele canceroase din ficat [24].

În acest studiu a fost luată în considerare posibilitatea ca SAM să inducă hipermetilarea receptorului având drept consecință scăderea viabilității celulare prin inactivarea nivelului de proteină IGF-1R.

Răspunsul liniilor celulare la tratamentul cu SAM a fost diferențial, și nu a putut fi corelat cu subtipul celular în NSCLC. În cazul liniilor de GB, linia celulară 38 a fost mai sensibilă la tratamentul cu SAM decât linia 18.

Observând efectul antiproliferativ indus de SAM în toate liniile celulare, s-a analizat posibilitatea ca această citotoxicitate să fie rezultatul hipermetilării oncogenei *Igf-1r*.

În urma tratamentului cu SAM nu s-au observat modificări în profilul de metilare al genei sau în nivelul de exprimare al proteinei IGF-1R, astfel încât efectul citotoxic al tratamentului cu SAM este independent de metilarea ADN la nivelul genei *Igf-1r*. Dar alte gene inițial hipometilate ar putea fi răspunzătoare de efectul citotoxic indus de SAM. Rezultatele obținute indică faptul că metilarea parțială al genei *Igf-1r* nu influențează nivelul de expresie al genei sau al proteinei IGF-1R. Astfel metilarea ADN nu este mecanismul răspunzător pentru supraexprimarea oncogenei/proteinei *Igf-1r* în cancerul de NSCLC și de GB.

În a doua parte a studiului, a fost investigat profilul de metilare al genelor tumorale supresoare *p16* și *Rb1* în aceleași culturi celulare de NSCLC și GB.

Prin reacția de PCR specifică metilării s-a obținut metilarea genei *p16* în 2 linii celulare de NSCLC, U1810 și H23 și în linia de GB, 18. În cazul liniilor celulare U1752 și H157 precum și în linia de GB 38, gena *p16* a fost nemetilată.

Studiul prezent poate fi considerat primul care și-a propus să identifice metilarea genei *p16* în liniile de NSCLC U1810 și H23 și în linia celulară primară de GB, 18.

Metilarea genei *Rb1* nu a fost observată în nici una din liniile celulare analizate, chiar dacă există studii care indică inactivarea genei *Rb1* în multe tipuri de cancer de plămân [25].

Liniile celulare de NSCLC, U1810 și H23 precum și linia de GB, 18 caracterizate prin metilarea genei *p16* nu conțin proteina P16, în timp ce liniile celulare de NSCLC, U1752 și H157 precum și linia de GB 38 sunt caracterizate prin expresia endogenă a proteinei P16, iar în urma reacției MSP s-a obținut amplificare cu amorsele nemetilate.

Pentru a determina posibilitatea reversibilității reacției de metilare în liniile celulare cu gena *p16* inițial metilată, celulele în cultură au fost tratate cu concentrații crescătoare de 5Aza-dC. În celulele unde gena *p16* a fost inițial metilată, iar proteina P16 absentă, s-a obținut reversibilitatea reacției de metilare, 5Aza-dC inducând re-exprimarea proteinei P16 și amplificare cu amorsele nemetilate. Astfel în cazul liniilor U1810 și H23, gena-proteina P16 au fost reactivitate la o concentrație de 5μM 5Aza-dC, iar în linia de GB 18, reactivarea genei/proteinei P16 a fost indusă la o concentrație de 2μM 5Aza-dC. Pentru a determina efectul reversibilității reacției de metilare al genei *p16* asupra viabilității celulare, în acest scop a fost folosit testul MTT.

Deoarece răspunsul celular la tratamentul cu 5Aza-dC a fost similar în toate liniile celulare de NSCLC, se poate presupune că rezultatul se datorează numai parțial re-exprimării genei tumorale supresoare *p16*. O explicație alternativă a acestui fenomen este activitatea citotoxică a agentului folosit sau inducerea unor modificări, care pot induce de asemenea moartea celulară.

În doar 2 din liniile celulare de NSCLC, gena tumorală supresoare *p16* a fost inactivată prin mecanismul de metilare ADN, sugerând posibilitatea că inactivarea genei *p16* este rezultatul metilării *de novo* datorată pasajelor celulare successive.

De asemenea, lipsa metilării genei în celelalte 3 linii celulare de NSCLC, sugerează faptul că alți factori de creștere controlați prin mecanismul de metilare ADN pot induce scăderea viabilității celulare și pot fi utilizați ca și potențiali agenți terapeutici. Pe de altă parte, în cancerul de GB, în linia celulară 18 cu gena *p16* inițial metilată s-a obținut o scădere considerabilă a viabilității celulare după tratamentul cu 5Aza-dC în comparație cu linia celulară 38, sugerând importanța genei *p16* în cancerul de GB.

F. Concluzii

- în regiunea promotoare a oncogenei *Igf-1r* au fost identificate 2 insule CpG
- analiza prin reacția de PCR-ul specifică metilării a evidențiat un profil de metilare parțială al genei *Igf-1r* în liniile celulare de NSCLC și GB
- expunerea celulelor în cultură la agentul de metilare –SAM nu a determinat modificări în profilul de metilare parțială al genei/proteinei *Igf-1r*
- viabilitatea celulară redusă în urma tratamentului cu SAM este datorată unui alt mecanism decât hipermetilarea oncogenei *Igf-1r*
- metilarea ADN nu este mecanismul răspunzător pentru supraexprimarea genei/proteinei *Igf-1r* în cancerul de NSCLC și GB *in vitro*.
- gena tumorală supresoare *p16* este hipermetilată în 2 linii celulare de NSCLC: H23 și U1810 și în linia de GB 18

- tratamentul cu un agent de demetilare - 5Aza-dC determină reversibilitatea reacției de metilare ADN la nivelul genei *p16* și reexprimarea de proteină P16 în liniile celulare cu gena inițial metilată.
- viabilitatea celulară scăzută observată după tratamentul cu 5Aza-dC este datorată cel puțin parțial reexprimării genei/proteinei P16.
Rb1 nu este metilată în nici una din liniile celulare luate în studiu.

Alte studii sunt necesare pentru determinarea importanței biologice a profilului de metilare parțială a oncogenei *Igf-1r* și în alte tipuri de cancer.

Reactivarea genelor de control al creșterii celulare reprimată inițial prin metilare *de novo* sugerează posibilitatea aplicației clinice a agenților de demetilare/hipermetilare în tratamentul cancerului. Profilul de metilare al oncogenelor și al genelor tumorale supresoare împreună cu alți markeri moleculari pot fi folosiți în elaborarea unei terapii personalizate și evaluarea prognosticului individualizat.

H. Bibliografie

1. Almeida, A., et al., *The insulin-like growth factor I receptor gene is the target for the 15q26 amplicon in breast cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 1994. **11**(1): p. 63-5.
2. Dricu, A., et al., *Expression of the insulin-like growth factor I receptor (IGF-1R) in breast cancer cells: evidence for a regulatory role of dolichyl phosphate in the transition from an intracellular to an extracellular IGF-1 pathway*. Glycobiology, 1999. **9**(6): p. 571-9.
3. Cosaceanu, D., et al., *Comparison of three approaches for inhibiting insulin-like growth factor I receptor and their effects on NSCLC cell lines in vitro*. Growth Factors, 2007. **25**(1): p. 1-8.
4. Kiaris, H., et al., *Growth hormone-releasing hormone: an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 14894-8.
5. Xiao, X.Y., et al., *Chromosomal alteration in Chinese sporadic colorectal carcinomas detected by comparative genomic hybridization*. Diagn Mol Pathol, 2007. **16**(2): p. 96-103.
6. Figueroa, J.A., et al., *Proliferation of cultured human prostate cancer cells is inhibited by insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1: evidence for an IGF-II autocrine growth loop*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(12): p. 3476-82.
7. Xie, Y., et al., *Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in synovial sarcoma: association with an aggressive phenotype*. Cancer Res, 1999. **59**(15): p. 3588-91.
8. Chakravarti, A., J.S. Loeffler, and N.J. Dyson, *Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling*. Cancer Res, 2002. **62**(1): p. 200-7.
9. Cooke, D.W., et al., *Analysis of the human type I insulin-like growth factor receptor promoter region*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **177**(3): p. 1113-20.
10. Werner, H., et al., *Structural and functional analysis of the insulin-like growth factor I receptor gene promoter*. Mol Endocrinol, 1992. **6**(10): p. 1545-58.
11. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 704-7.
12. Herman, J.G., et al., *Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers*. Cancer Res, 1995. **55**(20): p. 4525-30.
13. Merlo, A., et al., *5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers*. Nat Med, 1995. **1**(7): p. 686-92.
14. Brodin, O., L. Lennartsson, and S. Nilsson, *Single-dose and fractionated irradiation of four human lung cancer cell lines in vitro*. Acta Oncol, 1991. **30**(8): p. 967-74.

15. Hagerstrand, D., et al., *Characterization of an imatinib-sensitive subset of high-grade human glioma cultures*. *Oncogene*, 2006. **25**(35): p. 4913-22.
16. Herman, J.G., et al., *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(18): p. 9821-6.
17. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
18. Li, L.C. and R. Dahiya, *MethPrimer: designing primers for methylation PCRs*. *Bioinformatics*, 2002. **18**(11): p. 1427-31.
19. Bai, M., Y. Jin, and X. Zhang, *[Effect of exogenous p16 gene on biological behaviors of human lung cancer]*. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 2001. **24**(8): p. 465-8.
20. Tomizawa, Y., et al., *Clinicopathological significance of epigenetic inactivation of RASSF1A at 3p21.3 in stage I lung adenocarcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(7): p. 2362-8.
21. Costello, J.F., et al., *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns*. *Nat Genet*, 2000. **24**(2): p. 132-8.
22. Hui, A.B., et al., *Detection of multiple gene amplifications in glioblastoma multiforme using array-based comparative genomic hybridization*. *Lab Invest*, 2001. **81**(5): p. 717-23.
23. Shukeir, N., et al., *Alteration of the methylation status of tumor-promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo*. *Cancer Res*, 2006. **66**(18): p. 9202-10.
24. Lu, S.C. and J.M. Mato, *S-Adenosylmethionine in cell growth, apoptosis and liver cancer*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008. **23 Suppl 1**: p. S73-7.
25. Kelley, M.J., et al., *Differential inactivation of CDKN2 and Rb protein in non-small-cell and small-cell lung cancer cell lines*. *J Natl Cancer Inst*, 1995. **87**(10): p. 756-61.