



**ACADEMIA ROMÂNĂ  
INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**INVESTIGAREA LA NIVEL INFRASTRUCTURAL  
ȘI MOLECULAR A UNOR ASPECTE  
PARTICULARE ÎN EVOLUȚIA CANCERULUI  
MAMAR**

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:**

Cercetător Științific Gradul I,  
Dr. Mirancea Nicolae

**DOCTORAND:**

Chim. Mihalcea Corina Elena

**BUCUREȘTI**

**-2017-**

## CUPRINS

Pag.

Introducere	3
Scopul, obiectivele și originalitatea tezei	4
Structura tezei de doctorat	4
Materiale și metode	5
Rezultatele studiilor experimentale și discuții	5
A. Analiza mutațională a genelor <i>BRCA1</i> și <i>BRCA2</i>	5
B. Statusul mutațional al genei <i>PIK3CA</i>	7
C. Analiza mutațională a genei <i>TP53</i>	9
D. Variațiile polimorfice ale genei <i>TP53</i>	12
E. Particularități ultrastructurale în țesutul mamar tumoral	14
Concluzii	19
Bibliografie	22
Rezumate – Lucrări științifice publicate în tematica tezei de doctorat	25

## INTRODUCERE

Una dintre principalele direcții urmărite la ora actuală, atât în România cât și în întreaga lume, este încercarea de individualizare a tratamentului cu scopul creșterii răspunsului pozitiv la terapie. Prin identificarea pacienților la care terapia va avea rezultatele scontate, se dorește evitarea unui tratament inadecvat sau de supratratament și astfel îndepărtarea efectelor citotoxice ale medicamentelor.

Cancerul mamar reprezintă piatra de temelie în terapia oncologică personalizată. Statusul receptorilor hormonalni estrogenici și progesteronici și statusul genei HER2 sunt studiate de foarte mulți ani deoarece sunt factori de selecție a pacienților în vederea efectuării terapiei de substituție hormonală sau a terapiei anti-HER2 (Senkus și colab., 2014). O cale importantă în particularizarea tratamentului este utilizarea metodologiilor de înaltă performanță de analiză genomică (precum secvențierea de nouă generație – Next Generation Sequencing/NSG), care pot conduce la o nouă caracterizare a formelor tumorale și la extinderea atât a numărului de pacienți care vor putea beneficia de anumite forme de terapie, cât și creșterea răspunsului la tratament.

Cancerul mamar reprezintă forma de cancer care afectează cu cea mai ridicată frecvență, femeile din întreaga lume această formă de neoplazie aflându-se pe primul loc ca incidență și pe locul al 2-lea în ceea ce privește cauza de deces. În România, incidența cancerului de sân a luat amploare în ultimii ani, numărul de cazuri dublându-se în ultimele două decenii, fiind estimate aproximativ 51 de noi cazuri la 100000 de femei cu o rată a mortalității de 19%, aproximativ 24 de decese la 100000 de femei.

Un aspect mai puțin favorabil este faptul că peste 50% din tumori sunt diagnosticate tardiv având astfel un răspuns mai scăzut la terapia curativă. Printre factorii implicați în geneza tumorală mamară se numără: sexul, vârsta, istoricul familial de boală, factorii genetici, o menstruație precoce sau menopauză tardivă, nuliparitatea sau vârsta la care apare o sarcină, alăptatul, obezitatea, stresul crescut, dieta cu alimente contaminate cu substanțe xenobiotice etc.

În ceea ce privește factorul ereditar, susceptibilitatea familială este responsabilă de circa 25% din totalul cazurilor de cancer mamar. Genele cu cea mai mare influență în apariția și dezvoltarea tumorilor de sân sunt BRCA1 și BRCA2 iar mutațiile la nivelul lor sunt responsabile de 20% din cancerele familiale mamare. Genele TP53, PTEN și STK11 sunt și ele asociate unui risc crescut de a dezvolta cancer de sân, mutații ale acestora fiind identificate în sindroame neoplazice rare din care putem aminti Li-Fraumeni, Cowden și Peutz-Jegers. De asemenea mutațiile genei RAD51C au fost asociate unui risc crescut atât pentru cancer mamar cât și pentru cancer ovarian (Balmana și colab., 2014).

Deși în clinică cea mai mare parte a schemelor de tratament sunt realizate în urma determinărilor de imunohistochimie, totuși datorită multitudinii de evenimente celulare și moleculare este necesară studierea aprofundată a paternelor mutaționale ale genelor ce prezintă risc crescut în apariția și dezvoltarea cancerului mamar.

În ultimii ani, datorită avansării metodelor de determinare care au devenit ușor accesibile și cu timpi de investigare mai scurți și a datelor științifice aflate într-o continuă îmbunătățire, medicina personalizată a devenit astfel o țintă terapeutică reală care se bazează atât pe investigații la nivel molecular cât și pe cunoașterea aprofundată a aspectelor morfostructurale prin analize imunohistochimice. În același scop, un plus de informații utile privind alterările infrastructurale atât ale celulelor tumorale cât și ale stromei tumorale obținute prin analize de microscopie electronică permit clinicianului abordarea unei scheme de tratament optimă pentru fiecare pacient oncologic în parte.

## SCOPUL, OBIECTIVELE ȘI ORIGINALITATEA TEZEI

Scopul acestei teze de doctorat îl reprezintă determinarea statusului mutațional al unor gene implicate în tumorigeneza mamară și identificarea unor particularități infrastructurale ale celulelor tumorale mamare. La ora actuală este binecunoscut faptul că modificările la nivel molecular de tipul mutațiilor sunt implicate în procese biologice cheie care destabilizează buna funcționare a organismului. În România este necesară o studiere aprofundată a spectrului genetic al pacientului oncologic în vederea stabilirii unei conduite terapeutice de precizie.

Obiectivele acestui studiu au urmăriți:

- ✓ Stabilirea statusului mutațional al unor gene implicate în cancerul mamar: oncogena PIK3CA, supresorul tumoral TP53 și genele supresor tumorale BRCA1 și BRCA2;
- ✓ Identificarea unor particularități ultrastructurale la nivel celular în țesuturi tumorale mamare cu ajutorul microscopiei electronice în transmisie.

Originalitatea lucrării a constat în: dezvoltarea și optimizarea unor metode de investigare moderne a modificărilor genetice: analiza punctului de topire (High Resolution Melting Analysis - HRMA), secvențiere Sanger și secvențierea de nouă generație (Next Generation Sequencing - NGS); stabilirea statusului mutațional al unor supresori tumorali implicați în cancerul mamar familial precum BRCA1, BRCA2, respectiv TP53, dar și al oncogenei PIK3CA care prezintă o frecvență mutațională ridicată în tumorile mamare; analiza infrastructurii țesuturilor tumorale mamare în vederea detecției unor aspecte particulare. Acest studiu poate contribui la o mai bună înțelegere a mecanismelor moleculare, orientând spre o conduită terapeutică individualizată în carcinoamelor mamare, cu mărirea ratei de răspuns la tratament și crescând astfel speranța de viață a bolnavului.

## STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat intitulată “Investigarea la nivel infrastructural și molecular a unor aspecte particulare în evoluția cancerului mamar” conține 209 pagini plus 22 de pagini ale articolelor ISI publicate în tema tezei și este împărțită în două părți: “Fundamentarea bibliografică” și “Partea experimentală – cercetări proprii”. Lucrarea este structurată în șapte capitole iar la final se regăsesc și diseminările atât a figurilor și tabelor din lucrare cât și a lucrărilor științifice publicate sau comunicate atât în țară cât și în străinătate, atât în tematica tezei de doctorat cât și în afara acesteia.

**Fundamentarea bibliografică** cuprinde 61 de pagini care reprezintă un procent de 29,5% și conține scopul, obiectivele și originalitatea lucrării, glosarul de termeni, generalități cu privire la anatomia și structura glandei mamare, date de epidemiologie și etiologie dar și strategii terapeutice în tumorile de sân.

**Partea experimentală** este extinsă pe 146 de pagini reprezentând 70,5% și este alcătuită din capitolele care descriu materialele și metodele utilizate, rezultatele și discuțiile pe baza acestora, concluziile obținute în urma investigațiilor realizate, bibliografia și lista cu figurile și tabelor dar și cea a lucrărilor științifice.

## MATERIALE ȘI METODE

Materialul biologic analizat în vederea determinării unor factori de risc genetici implicați în apariția și dezvoltarea cancerelor de sân și a unor caracteristici infrastructurale, a constat din 22 de specimene de țesut tumoral mamar și 22 de specimene de țesut aparent normal, recoltate proaspăt prin rezecție chirurgicală de la paciente supuse unui tratament curativ în cadrul Institutului Oncologic „Prof. Dr. Alex. Trestioreanu”, din București, în perioada 2012-2015. Toate probele biologice au fost prelevate cu acordul informat al pacientelor, atât scris, cât și verbal, respectând astfel normele prevazute în ghidurile de etică internațională în ceea ce privește cercetarea biomedicală în care sunt implicați subiecți umani.

Pentru determinarea statusului mutațional al genei *PIK3CA* am utilizat drept controale trei linii celulare și anume: MCF-7 care este linie mutată pe exonul 9 și sălbatică pe exonii 1 și 20, SKBR3 linie celulară utilizată ca și control negativ pentru exonul 9 și T47D control pozitiv pentru exonul 20 și negativ pentru exonul 1.

Pentru investigațiile de biologie moleculară ADN a fost extras, purificat și cuantificat din țesut tumoral și aparent normal proaspăt de sân dar și din liniile celulare luate drept control în studiu conform specificațiilor protocolului de lucru ale producătorilor kit-urilor utilizate.

Toate metodele utilizate la analiza moleculară au fost optimizate. Statusul mutațional al genelor *BRCA1* și *BRCA2* a fost determinat prin secvențierea de nouă generație (Next Generation Sequencing – NGS) utilizând aparatul Personal Genome Machine (PGM, ThermoFisher Scientific). Analiza mutațională a oncogenei *PIK3CA* a fost realizată prin tehnica analizei punctului de topire de înaltă rezoluție (High Resolution Melting Analysis – HRMA) utilizând instrumentul LightCycler480 Real-Time PCR System (Roche). Ulterior documentarea mutațiilor identificate în gena *PIK3CA* s-a realizat prin secvențiere directă, metoda Sanger, utilizând aparatul 3500 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific).

În ceea ce privește patternul mutațional al supresorului tumoral *TP53* acesta a fost realizat prin secvențiere directă, metoda Sanger, utilizând aparatul 3500 Genetic Analyzer (ThermoFisher Scientific).

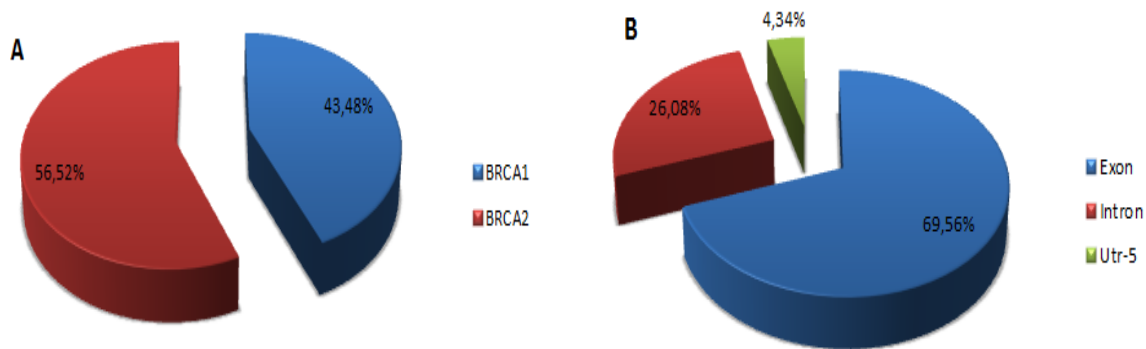
Analiza infrastructurală a celulelor și tesuturilor de carcinom mamar s-a realizat prin metoda de microscopie electronică cu ajutorul microscopului electronic cu transmisie.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

### A. ANALIZA MUTAȚIONALĂ A GENELOR *BRCA1* ȘI *BRCA2*

#### REZULTATE

În această lucrare am utilizat secvențierea de nouă generație pentru a investiga regiunile codante și necodante ale genelor *BRCA1* și *BRCA2*, la opt paciente care au fost diagnosticate cu cancer mamare sporadice.



**Fig.1.** A–Distribuția polimorfismelor în cele două gene *BRCA*; B-Distribuția exon/intron a SNP *BRCA*.

În urma secvențierii am identificat un număr de 23 variații polimorfice, respectiv 43,48% în gena *BRCA1* și 56,52% în gena *BRCA2* (**Fig.1,A**). În literatura de specialitate, trei dintre aceste SNP-uri (rs144848, rs1799966 și rs16942) au fost evaluate ca având risc minor dacă sunt luate independent dar cu risc crescut de cancer atunci când activitatea lor este cumulată. O singură mutație c.10067C>G a fost detectată în gena *BRCA2* la nivelul exonului 27. Raportat la distribuția polimorfismelor, 69,56% dintre acestea au fost detectate în regiunea codantă a celor două gene, iar 26,08% au afectat regiunea necodantă a *BRCA* (**Fig.1,B**) iar 4,34% s-a situat în regiunea utr-5.

## DISCUȚII

Tumorile de sân ereditare însumează un total de 25% din toate cazurile de carcinoame mamare. Genele *BRCA1* și *BRCA2* prezintă un risc crescut în apariția și dezvoltarea tumorilor mamare. Mutațiile *BRCA* sunt distribuite pe întreaga regiune de codificare dar cu o predominanță a acestora la nivelul exonului 11 din ambele gene. De obicei mutațiile *BRCA* sunt reprezentate de modificări ale cadrelor de citire (mutații “frameshift”) sau mutații care apar la locul de splice-ing în urma cărora rezultă proteine trunchiate (Mihalcea și colab., 2017).

În ceea ce privește variațiile de tip polimorfic s-a observat o concordanță între purtătorii de mutații *BRCA* și statusul receptorilor estrogenici asociați tumorilor de sân în populația generală. Prin urmare, polimorfismele asociate riscului de cancer cu receptori estrogenici negativi (ER-) au tendința de a fi asociate cu mutațiile în gena *BRCA1*, în timp ce tumorile care prezintă receptori estrogenici pozitivi (ER+) tind să fie asociate purtătorilor de mutații în *BRCA2*.

Varianta polimorfică rs144848 (N372H) este singura din gena *BRCA2* care conduce la modificarea aminoacizilor, având frecvența unei alele mai ridicată de 10%. Există puține date în literatură legate de funcția acestui plimorfism, însă se știe că substituția unui rest de asparagină care este un aminoacid neutru cu un rest al unui aminoacid basic, în acest caz, histidina, afectează atât structura cât și funcționalitatea genei *BRCA2*, deoarece această modificare are loc într-o regiune responsabilă de interacțiunea cu histon acetiltransferaza P/CAF chiar înainte de începerea procesului de transcripție a altor gene. În lucrarea de față, în urma secvențierii genei *BRCA2* am identificat la nivelul exonului 9 variația polimorfică rs144848 (p.Asn372His, c.1114A>C) care este o transversie A→C în poziția 372 de la nivelul proteinei. Am detectat acest SNP în 37,5% (3/8) din speciimenele tumorale mamare analizate.

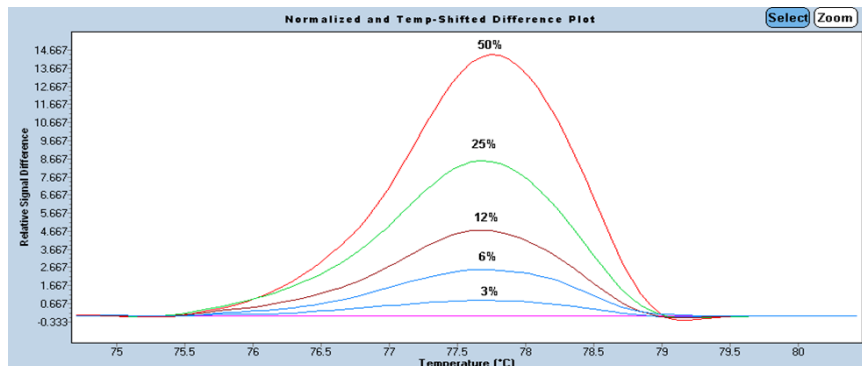
S-au făcut cercetări pe linii celulare de limfocite B, de celule limfoblastoide și celule extrase din țesut mamar care au concluzionat că gena *BRCA1* deține o expresie alelică diferențiată. Aceiași constatare a fost observată și în unele cazuri asociată riscului crescut de cancer mamar și cancer ovarian (Chen și colab., 2008; Maia și colab., 2009; Shen și colab., 2011). Bazele de date disponibile au relevat faptul că variațiile polimorfice ale genei *BRCA1*, printre care și SNP rs16942, au fost asociate cu o expresie ridicată a proteinei brca1 (Dimas și colab., 2009).

Două dintre variațiile polimorfice ale genei *BRCA1* și anume rs16942 (K1183) și rs1799966 (S1613G) care au o frecvență a alelei majore >10% sunt într-un puternic dezechilibru de legare fapt care conduce la un genotip homozigot cu cel puțin patru alele diferite. Identificarea prin secvențiere a tuturor variantelor care au riscuri de cancer mici analizate individual dar care au efect cumulativ crescut este complementară secvențierii întregului genom (Johnson și colab., 2007). Am identificat SNP rs1799966 (p.Ser1634Gly, c.4900A>G) în exonul 16 al genei *BRCA1* care este reprezentat de o tranziție A→G în poziția 1634 din proteina. Forma homozigotă CC a SNP rs1799966 a fost detectată într-o singură probă 12,5% (1/8) în timp ce forma heterozigotă TC a fost identificată în 50% (4/8) din probele investigate.

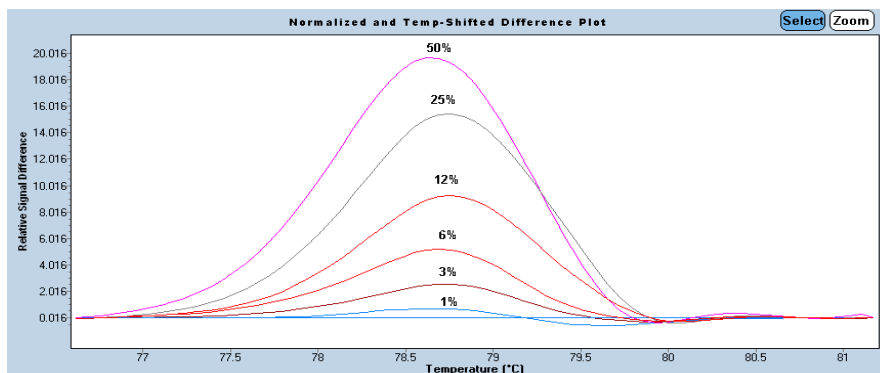
În urma unor studii de expresie genică realizate pe celule mamare epiteliale murine s-a observat că reglarea expresiei proteinei brca2 este strâns legată de expresia proteinei brca1 și că acest proces de reglare are loc în timpul proliferării și diferențierii celulare. În ceea ce privește spectrul mutațional al genelor *BRCA1* și *BRCA2* putem spune că este unul complex datorită variantelor care afectează atât regiunile exonice cât și regiunile intronice ale acestora. Dintre mutațiile *BRCA* care sunt considerate a avea caracter patogen se pot aminti mutațiile de tip „frameshift” (inserții/deleții) și mutațiile de tip „nonsense” care afectează codonii STOP, mutații care conduc la schimbarea structurii genomice (Tommasi și colab., 2012). În studiul de față am identificat o singură mutație de tip “nonsense” c.10067C>G (p.Ser3356Ter) în gena *BRCA2* la nivelul exonului 27 și care reprezintă o transversie C→G în poziția 3356 a proteinei unde un rest de serină este înlocuit cu un codon STOP.

## B. STATUSUL MUTAȚIONAL AL GENEI *PIK3CA* REZULTATE

Sensibilitatea metodei HRM a fost testată prin realizarea unui amestec format din ADN extras din linii celulare tumorale (T47D și MCF-7) și ADN extras din linii celulare normale, în procente de 50%, 25%, 12%, 6%, 3% și 1%. În exonul 9 am putut detecta 3% celule MCF-7 mutate (**Fig.2**), în timp ce pentru exonul 20 limita de detecție a fost de 1% celule T47D mutate dintr-un amestec de ADN sălbatic (**Fig.3**).



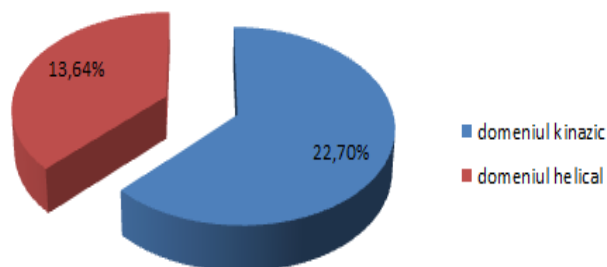
**Fig.2.** Profilul curbelor de sensibilitate pentru exonul 9 al genei *PIK3CA*.



**Fig.3.** Profilul curbelor de sensibilitate pentru exonul 20 al genei *PIK3CA*.

Pattern-ul mutațional al genei *PIK3CA* l-am realizat prin analizarea profilelor curbelor de disociere și a picurilor de topire ai exonilor 1, 9 și 20 cu ajutorul metodei HRMA și ulterior documentarea acestora prin secvențiere directă, metoda Sanger.

Rata mutațiilor în lotul de 22 de tumori mamare analizate a fost de 36,4% (8/22) din care 13,64% (3/22) au fost detectate în exonul 9 din domeniul helical și 22,73% (5/22) în exonul 20 din domeniul kinazic al genei (**Fig.4**). Mutațiile identificate au fost: Q546[K,E] și E542[E,K], care au afectat domeniul helical al *PIK3CA* și H1047[H,R], care a afectat domeniul kinazic al genei. În exonul 1 nu s-au identificat mutații.



**Fig.4.** Frecvența mutațiilor în gena *PIK3CA*.

## DISCUȚII

Calea PI3K reprezintă una din cele mai intens studiate căi de semnalizare datorită implicației sale oncogenice în marea majoritate a neoplaziilor, cancerul mamar fiind considerat a fi puternic influențat de calea PI3K. Cercetările au arătat că există cel puțin un mecanism molecular care este implicat în această cale de semnalizare, unul dintre cele mai importante fiind mutațiile la nivelul genei *PIK3CA*. Mutațiile *PIK3CA* au fost detectate pentru prima oară în anul 2004 în urma unor investigații moleculare pe tumori solide iar de atunci s-au realizat numeroase studii care au pus în evidență implicațiile terapeutice și de



prognostic ale mutațiilor acestei oncogene (Mukohara, 2015). Oncogena *PIK3CA* este a doua cea mai frecvent mutată în cancerul mamar după gena supresoare *TP53*, mutațiile detectate la nivelul ei având o rată a frecvenței de la 20% până la 40%. Mutațiile *PIK3CA* reprezintă un eveniment timpuriu fapt care a condus la ideea ca ele sunt implicate mai degrabă în inițierea procesului de cancerizare decât în propagarea invazivă. S-a observat că în cancerul mamar mutațiile care afectează alte gene decât *PIK3CA* în aval de receptorul pentru tirozin kinază, sunt evenimente rare comparativ cu alte malignități.

Mutațiile somatice care apar cu precădere în domeniile helical și respectiv kinazic, sunt reprezentate de trei hotspot-uri și anume E542 și E545 în exonul 9 și H1047 în exonul 20 al genei *PIK3CA*. Pozițiile în care apar aceste mutații au sugerat faptul că proteina mutată prezintă o activitate kinazică intensă, având de asemenea proprietăți oncogenice (Zardavas și colab., 2014).

Studiul nostru a fost realizat pentru determinarea frecvenței mutațiilor *PIK3CA* în tumori de sân iar în acest sens au fost analizate 22 de perechi de fragmente tisulare tumorale și aparent normale prelevate de la paciente diagnosticate cu tumori mamare și operate în Institutul Oncologic București. Drept controale în studiu am utilizat liniile celulare MCF-7, SKBR3 și T47D (Mihalcea și colab., 2015).

Mutațiile *PIK3CA* afectează trei domenii ale proteinei și anume: domeniul C2, domeniul helical și respectiv, domeniul kinazic. Mutațiile care apar în domeniul C2 sunt localizate la suprafața buclei proteinei crescând posibilitatea de legare la membrană a subunității catalitice p110 $\alpha$ . În domeniul helical apar trei hotspot-uri (E542, E545, Q546) care sunt localizate pe fața externă a domeniului, având posibilitatea de a interacționa cu o altă proteină. De cele mai multe ori în această zonă se inseră o lizină ajungând astfel la concluzia că ar putea chiar interacționa și cu membrana celulară. În urma analizei exonului 9 al genei *PIK3CA* am identificat 2 mutații: o mutație rară Q546K (c.1636C>A) detectată în 9,09% din probe (2/22) și care rezultă din substituția unei glutamine cu lizină în poziția 546 și mutația E542K (c.1624G>A), de asemenea o substituție de glicină cu lizină în poziția 542. Mutațiile din domeniul kinazic apar localizate în imediata apropiere a buclei de activare a proteinei putând astfel influența atât mobilitatea cât și poziția acestei bucle (Gymnopoulos și colab., 2007).

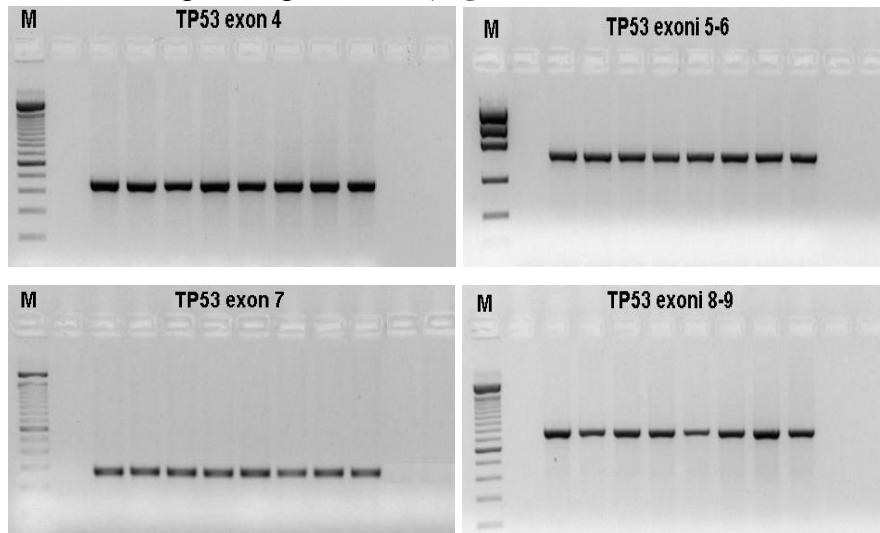
Mutația H1047R care afectează domeniul kinazic al genei *PIK3CA* induce cancerogeneza în celulele epiteliale ale cancerului de sân de tip luminal, eveniment care conduce la ideea că această mutație este un eveniment timpuriu al cancerului mamar. Tumorile cu mutații H1047R au o sensibilitate variabilă în ceea ce privește inhibarea PI3K și totodată au o dependență variabilă față de alte oncogene. În domeniul kinazic, la nivelul exonului 20 al genei *PIK3CA* am identificat prin analiza HRM și ulterior confirmată prin secvențiere directă mutația H1047R (c.3140A>G) detectată în 22,73% din probe (5/22), fiind o substituție în poziția 1047 al unui rest de histidină cu un rest de arginină. Pentru că frecvența mutațiilor în această oncogenă este relativ similară în carcinoamele de sân ductale *in situ* și carcinoamele ductale invazive, se poate considera că mutațiile somatice care afectează oncogena *PIK3CA* sunt evenimente precoce în cancerogeneza mamară facilitând transformarea celulelor de sân normale în celule tumorale (Miller, 2012).

### **C. ANALIZA MUTAȚIONALĂ A GENEI *TP53***

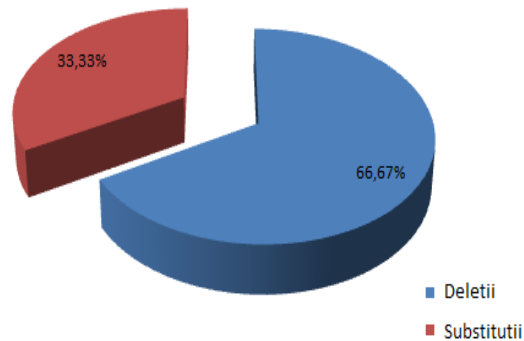
#### **REZULTATE**

Pentru determinarea pattern-ului mutațional probele de ADN au fost amplificate cu primeri exon-specifici pentru exonii 4-9 ai genei *TP53*. Verificarea purității și concentrației

ampliconilor obținuți post reacției de polimerizare în lanț (PCR – Polymerase Chain Reaction) s-a făcut prin electroforeză în gel de agaroză 2% (**Fig.5**).



**Fig.5.** Electroforeză în gel de agaroză 2%. Determinarea concentrației ampliconilor exonilor 4-9 ai genei *TP53* utilizând markerul de masă moleculară *Low DNA Mass Lader*.



**Fig.6.** Frecvența mutațiilor în gena *TP53*.

Rata de mutații *TP53* în lotul investigat a fost de 27,3%. În cele 22 de probe de țesut tumoral mamar au fost identificate un număr de 6 mutații dintre care 2 (33,33%) au fost mutații de tip substituție (o mutație „missense” R175H, c.524G>A în exonul 5 și o mutație „nonsense” p.R213\*; c.637C>T în exonul 6). Ambele substituții au fost de tip heterozigot. S-au mai identificat de asemenea 4 (66,67%) mutații de tip deleții (o deleție de două baze azotate CC c.213\_214del2 în exonul 4, o deleție de tip “frameshift” a unei singure baze azotate T p.M133fs\*37, c.398delT în exonul 5, o deleție de nouă nucleotide AACCGGAGG de tip “inframe” p.N247-R249 delNRR, c.739\_747delAACCGGAGG în exonul 7 și o deleție a unei singure nucleotide de tip “frameshift” p.G244-fs\*3, c.731delG, de asemenea în exonul 7). S-a observat o predominanță a mutațiilor de tip deleții 66,67% în timp ce doar un procent de 33,33% a reprezentat mutațiile de tip substituție (**Fig.6**).

În urma analizei distribuției mutațiilor în gena *TP53* s-a constatat că 5/6 mutații (83,3%) au avut ca localizare domeniul de legare la ADN. Dintre acestea 2 (33,3%) au fost identificate în exonul 5, 1 (16,6%) a fost identificată în exonul 6 și 2 (33,3%) în exonul 7 al genei. În exonul 4 s-a identificat de asemenea 1 (16,6%) mutație.

## DISCUȚII

Supresorul tumoral *TP53* codifică un factor de transcripție cu rol antiproliferativ care este activat ca răspuns la mai multe forme de stres celular. Mutațiile somatice care apar la nivelul acestei gene sunt evenimente extreme de frecvente în multe tipuri de cancer uman (în cancerul mamar procentul fiind de 20-40%) iar formele ereditare predispun la apariția timpurie a unui spectru larg de neoplazii precum sindromul Li-Fraumeni (LFS) și sindromul Li-Fraumeni-like (LFL). În gena *TP53* mutațiile majoritare sunt reprezentate de substituțiile “missense” (75%) urmate de inserții și deleții de tip “frameshift” (9%) și nu în ultimul rând mutații de tip “silent” (5%) (Petitejean și colab., 2007). În prezentul studiu au fost identificate un număr de 6 mutații din care 1 mutație “missense” (16,67%), 1 mutație “nonsense” (16,7%) și 4 deleții (66,67%).

Majoritatea mutațiilor *TP53* (90%) sunt identificate în domeniul de legare al proteinei perturbând astfel capacitatea acesteia de a lega molecula de ADN. Mutațiile care apar aici pot induce pierderea sau câștigarea parțială sau totală a funcției monomerului și astfel stabilitatea genei *TP53* este foarte importantă pentru buna funcționare a proteinei. În concordanță cu datele din literatură 5 dintre mutațiile identificate în această lucrare au afectat domeniul de legare al proteinei și doar una a fost într-un alt domeniu (Vegran și colab., 2013; Murnyak și colab., 2016).

Inițializarea procesului de metastazare prezintă caracteristici asemănătoare din punct de vedere fenotipic cu procesul de tranziție epitelial-mezenchimală (EMT) printre care și creșterea motricității celulare și pierderea adeziunii intercelulare. Date din literatură au arătat că forma *wild-type* a *TP53* inhibă procesul EMT în timp ce forma mutată a supresorului tumoral facilitează EMT prin implicarea sa în buna funcționare a reglatorilor transcripționali a acestui proces, SLUG și TWIST1. O altă cale prin care *TP53* mutant promovează proliferarea celulară este inhibarea TAp63 conducând astfel la metastazarea datorată TGFβ și stimularea activității integrinei declanșând astfel invazivitatea celulară. Un alt efect exercitat de mutațiile *TP53* asupra progresiei tumorale ar putea fi procesul de reglare pozitivă a angiogenezei cu observația că tumorile cu *TP53* wt au tendința de a fi mai puțin vascularizate. Prin luarea în considerare a tuturor acestor fenomene, se ajunge la ideea conform căreia mutațiile în gena *TP53* sunt evenimente care fie apar târziu în procesul de cancerizare, fie pot avea semnificație importantă în stadiile avansate ale cancerului în ceea ce privește invazivitatea și agresivitatea tumorală (Kato și colab., 2003).

În cancerele umane predomină mutațiile de tip „missense” care afectează aminoacizii 102-292 din domeniul de legare al ADN, cele mai importante hotspoturi fiind întâlnite la nivelul codonilor R175, Y220, G245, R248, R249, R273 și R282. Clasificarea mutațiilor din această genă s-a făcut pe baza funcției sale ca factor transcripțional și se pot distinge două categorii: a) mutațiile de contact (R273H și R248W) care apar la interfața dintre proteina p53 și molecula de ADN și b) mutațiile structurale (R175H, Y220C, G245S, R248Q, R249S, R282W, etc) care conduc la instabilitatea conformațională a proteinei p53. Luând în considerare alela mutată R175H s-a observat o rată crescută a tumorilor spontane, de tipul limfoamelor și sarcoamelor. În urma investigației exonului 5 al genei *TP53* am identificat substituția heterozigotă c.524G>A (R175H), unde Arg este înlocuită cu His, CGC>CAG în codonul hotspot 175,

această mutație fiind responsabilă de modificarea structurii domeniului de legare al ADN al proteinei (Xu și colab., 2014).

O parte semnificativă din mutațiile *TP53* sunt de tip „nonsense” ele dând naștere unor proteine trunchiate și inactive. Cea mai frecventă mutație „nonsense” și chiar mai comună decât multe alte substituții „missense” identificată în gena *TP53* este R213\*. În exonul 6 al genei *TP53* am detectat mutația heterozigotă de tip „nonsense” c.637C>T (R213\*), unde Arg este înlocuită cu codonul stop Ter, CGA>TGA în poziția 213. Repararea unei astfel de mutații necesită în mod evident alte mecanisme decât cele pentru mutațiile „missense”.

În probele de tumori mamare analizate în această lucrare am identificat 4 deleții: 1) c.213\_214del2 care este o deleție dublă a nucleotidului C care afectează codonii 71 și 72 din exonul 4; 2) c. 398delT (p.M133fs\*37), deleție de tip „frameshift” a nucleotidului T din poziția 133 a exonului 5; 3) c.739\_747delAACCGGAGG (p.N247-R249delNRR) deleție de tip „inframe” de 9 nucleotide care afectează codonii 247, 248 și 249 din exonul 7; 4) c.731delG (p.G244-fs\*3), deleție de tip „frameshift” a nucleotidului G din poziția 244 din exonul 7. Cu excepția deleției din exonul 4 toate celelalte deleții au afectat domeniul de legare al ADN.

Delețiile „frameshift” conduc la modificarea cadrului de citire a secvenței ADN cu obținerea unor proteine trunchiate, uneori foarte scurte, altele extrem de lungi și cel mai probabil nefuncționale. Acestea variază în lungime de la 1 - 37 de nucleotide însă cele mai des întâlnite sunt cele cu ștergere a 2-8 baze azotate (Angelopoulou și colab., 1998).

## D. VARIAȚIILE POLIMORFICE ALE GENEI *TP53* REZULTATE

În urma secvențierii directe atât a zonelor codante cât și a celor necodante a celor 6 exoni investigați în acest studiu s-au identificat 5 variații polimorfice ale unei singure nucleotide din care 3 au afectat regiunea codantă a exonilor 4 (rs1042522, R72P și rs372397095, P82P) și 6 (rs1800372, R213R), iar 2 au fost identificate în intronul 6 (rs1625895 și rs17880604) (**Tabel.1**).

**Tabel 1.** Variațiile polimorfice identificate în gena *TP53*

Nr pacient	Exon/Intron	SNP	Genotip	Alela ancestrală	Alela mutată	Aminoacizi
1	Exon 4	rs1042522	16397C>G	C	G	Pro→Arg
2	Exon 4	rs372397095	16428G>A	G	A	Pro→Pro
3	Exon 6	rs1800372	17659A>G	A	G	Arg→Arg
4	Intron 6	rs1625895	17754A>G	A	G	-
5	Intron 6	rs17880604	18225G>C	G	C	-

## DISCUȚII

Activitatea proteinei p53 este reglată prin mai multe mecanisme care influențează atât procesele post-transcripționale cât și procesele translaționale și post-translaționale, toate acestea ca răspuns la o gamă variată de evenimente fizice și biologice. În prezent se cunosc aproximativ 100 de polimorfisme ale genei *TP53*, o parte din acestea variind în funcție de zonele geografice, densitatea populației și etnicitatea de proveniență (Sagne și colab., 2013).

Este binecunoscut faptul că aparte de frecvența ridicată a mutațiilor somatice, gena *TP53* are de asemenea și un înalt grad polimorfic. În cancer, la nivelul secvențelor codante, acțiunea mutațiilor din gena *TP53* și în mod particular a substituțiilor unei singure baze azotate numite și polimorfisme, pot avea efecte devastatoare asupra bunei funcționări a proteinei p53. Cu toate acestea se presupune că doar un mic procent din aceste polimorfisme ale genei *TP53* pot avea efecte notabile care să poată fi măsurate (Whibley și colab., 2009; Naccarati și colab., 2012).

Cel mai studiat polimorfism al genei *TP53* este rs1042522 (R72P; 16397C>G) identificat în exonul 4 într-o regiune bogată în prolină. Acest polimorfism este o tranziție G→C la nucleotida din poziția 215 a genei și care conține la nivelul codonului 72 al genei *TP53* fie prolină (CCC) fie arginină (CGC) având ca rezultat predispoziția la cancer. Unele studii au arătat că genotipul homozigot al argininei ar putea fi un factor de risc crescut în carcinoamele de sân iar de-a lungul timpului acesta a fost studiat în multe forme de cancer precum cancerul de stomac, vezică, mamar, colon și plămân, prezentând o distribuție amplă în funcție de etnicitate și zonă demografică. În studiul nostru, variația polimorfică rs1042522 a fost identificată cu genotipul homozigot GG în 59,09% (13/22) din probe, iar cu genotipul heterozigot CG în 40,9% (9/22) din probe. Deoarece R72P afectează domeniul de transactivare acesta poate conduce la modificarea expresiei proteice. De asemenea poate influența atât activitatea transcripțională cât și structura proteinei datorită localizării într-o zonă hidrofobă a codonului afectat (de Melo și colab., 2009).

În exonul 4 am identificat SNP-ul rs372397085 (P82P, c.246G>A), polimorfism sinonim care reprezintă o substituție G→A la nivelul codonului 246, CCG→CCA, situat într-o regiune bogată în prolină. În literatură nu sunt date cu privire la influența acestei variații polimorfice asupra riscului de cancer mamar.

Conform unor studii s-a demonstrat că analiza cumulativă a mai multor supresori tumorali nu indică un procent semnificativ de mutații sinonime, însă la o analiză individuală gena *TP53* prezintă o rata de mutații sinonime semnificativ crescută. Acestea sunt extrem de recurente prin comparație cu cele descoperite în oncogene și afectează în mod direct nucleotidele situate la locurile de splicing alternativ, în *TP53* fiind afectate trei astfel de baze azotate. SNP rs1800372 (R213R, c.639A>G) este o variație sinonimă rară pe care am identificat-o în regiunea codantă a exonului 5. Este o substituție în poziția 639 unde arginina este înlocuită tot cu arginină, CGA→CGG. Se pare că în pofida ratei crescute a acestor tipuri de mutații totuși ele nu au nici un efect semnificativ clinic (Supek și colab., 2014).

S-a observat că variațiile genetice ale genei *TP53* sunt asociate apariției cancerului de sân la vârste fragede (Sprague și colab., 2007). În studiul nostru am identificat SNP rs1625895 în ambele forme atât heterozigotă (AG) cât și homozigotă (GG), acesta reprezentând o tranziție A→G în regiunea necodantă a genei *TP53*. Rs1625895 reprezintă substituția unei baze azotate în poziția 61 din intronul 6 al genei *TP53* și cu toate că este încă necunoscut faptul dacă acesta este un factor de reglare sau de splicing, s-a raportat faptul că poate afecta nivelul expresiei proteice dar totodată poate afecta și activitatea proteinei prin modificarea structurii secundare a acesteia (Voropaeva și colab., 2015).

Deși polimorfismul rs17880604 (G13964C) reprezintă unul din cele mai studiate SNP-uri intronice din gena *TP53* totuși nu s-a observat nici o corelație între acesta și susceptibilitatea la cancerul mamar. Unele studii au arătat că varianta 13964G ajută la menținerea stabilității atât a ARN-ului mesager cât și a stabilității funcției proteinei p53. În urma investigației exonilor 5-6 ai genei *TP53* am identificat tranziția G→C la nivelul intronului 6 în ambele forme, heterozigotă (GC) și homozigotă (GG) a SNP-ului rs17880604. Varianta 13964C a fost analizată în contextul stabilirii rolului său într-o gamă largă de cancere umane, precum cancerul de sân, cancerul de colon și cel ovarian, însă nu s-au obținut date suficiente pentru a asocia acest tip de polimorfism cu riscul de cancer (Dehghan și colab., 2015).

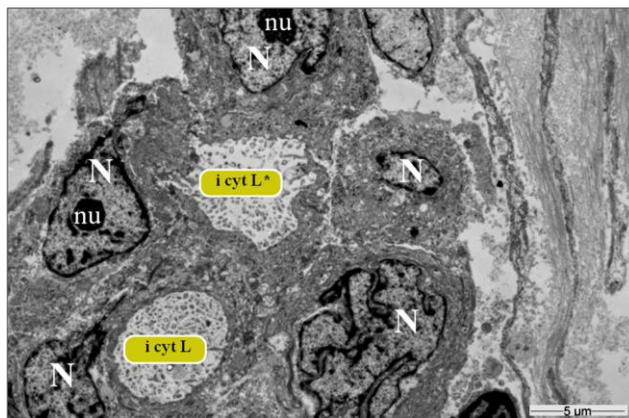
## E. PARTICULARITĂȚI ULTRASTRUCTURALE ÎN ȚESUTUL MAMAR TUMORAL REZULTATE

### Cito-histoarhitectura tumorilor mamare ductale invazive

O parte din rezultatele investigațiilor electronomicroscopice privind identificarea unor aspecte infrastructurale particulare în tumorile de sân sunt focusate pe analiza tumorilor de carcinom mamar ductal invaziv și au fost parțial publicate sub forma a două lucrări științifice în *Romanian Journal of Morphology and Embryology*: (1) Mihalcea și colab., *RJME* 56 (4): 1371-1381, 2015 și (2) Mihalcea și colab., *RJME* 58 (2):445-455, 2017.

La analiza prin microscopie electronică a țesuturilor tumorale mamare s-au observat modificări drastice în structura histologică a glandei mamare. În celulele tumorale din carcinomul ductal invaziv, raportul dintre nucleu și citoplasmă este crescut.

În nucleul celulelor tumorale predomină eucromatina. Heterocromatina este vizibilă sub forma unui lizereu atașat la membrana internă a anvelopei nucleare (**Fig.7**). De regulă, nucleii prezintă nucleoli de dimensiuni relativ mari.

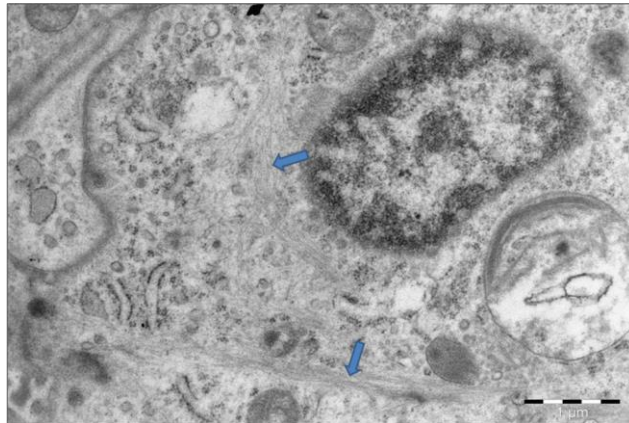


**Fig.7** – Țesut mamar neoplazic reprezentat de celule tumorale care prezintă nuclei (N) de dimensiuni foarte mari comparativ cu citoplasma. Nucleii sunt aproape în întregime reprezentați de eucromatină, iar unii nuclei prezintă nucleoli (nu) de dimensiuni mari. Lumenele intracelulare (i cyt L) prezintă numeroși microvili. Unul dintre lumene comunică cu spațiul extracelular (i cyt L\*). Preluare cu permisiunea editurii *RJME* (Mihalcea și colab., 2015).

### Citoscheletul

În citoplasma celulelor tumorale examinate citoscheletul este slab reprezentat. Uneori, elemente citoscheletice cu aspect electronomicroscopic de filamente intermediare apar sub forma unor conglomerat.

De regulă, citoscheletul apare sub forma unor filamente fine distribuite neorientat în citoplasmă (**Fig.8**), probabil datorită absenței joncțiunilor desmozomale.



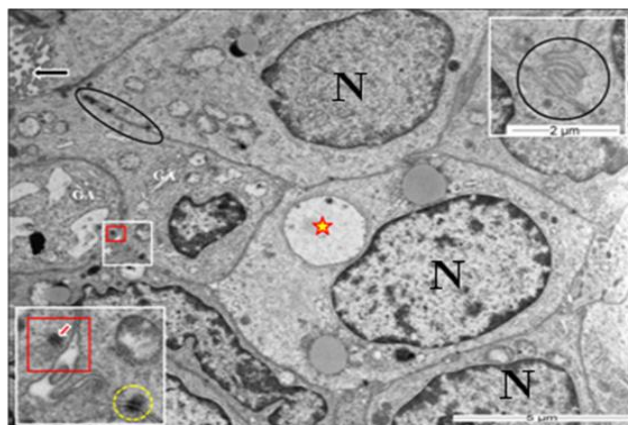
**Fig. 8** - Sector de celulă tumorală (carcinoma mamar ductal invaziv) în care se disting filamente citoscheletice fine (săgeți) distribuite neorientat întrucât joncțiunile intercelulare desmozomale lipsesc.

### **Joncțiunile intercelulare**

Asemănător altor tipuri de țesuturi epiteliale (epiderm, epiteliul tubului digestiv etc.) epiteliul glandelor mamare în stare nealterată este reprezentat de celule epiteliale cu o distribuție caracteristică *pattern*-ului histologic de țesut mamar. Aceasta presupune ca celulele epiteliale vor avea o anumită polaritate morfo-structurală care, în principal, se datorează existenței unor joncțiuni specializate ce obligă celulele să rămână în raporturi stabile cu celulele epiteliale adiacente precum și cu structurile anhistice de tip membrană bazală prin polul lor bazal. Menținerea polarității celulelor epiteliale este o condiție esențială pentru fiziologia normală a glandei mamare.

Analizele țesuturilor tumorale mamare cu ajutorul electronmicroscopiei au relevat o alterare graduală a joncțiunilor desmozomale, în funcție de gradul de evoluție a tumorilor mamare, cele mai dramatice fiind cele înregistrate în tumorile mamare ductale invazive. Remarcăm aici observația noastră potrivit căreia uneori, electronmicroscopic sunt detectați desmozomi internalizați (**Fig. 9**).

Trebuie menționat că aspectul infrastructural aberant al acestor joncțiuni care presupune o distribuție anormală a componentelor moleculare *versus* distribuția foarte precisă a diferitelor molecule care compun desmozomii cu infrastructură normală (Mirancea și colab., 2001; Mirancea și Mirancea, 2010), coroborat cu lipsa contactului filamentelor citoscheletice la desmozomii aberanți sugerează faptul că în cazul celulelor tumorale joncțiunile intercelulare sunt precare. Nu de puține ori, se detectează numai forme remnante de desmozomi, forme imperfecte.



**Fig. 9** – Se pot observa celule tumorale fără spații intercelulare, care prezintă nuclee polimorfice de dimensiuni mari (N). Joncțiunile desmosomale sunt rare (zona eliptică și cercul de culoare galbenă din stânga jos). Se detectează joncțiuni interdigitate (în pătratul din partea dreaptă superioară). În pătratul de culoare roșie se poate detecta un desmosom internalizat, detaliat în partea inferioară stânga a insetului (săgeată). GA - Aparat Golgi. Preluare cu permisiunea editurii RJME (Mihalcea și colab., 2015).

### **Interfața tumoră-stromă peritumorală**

#### **Joncțiunea celule epiteliale-membrană bazală**

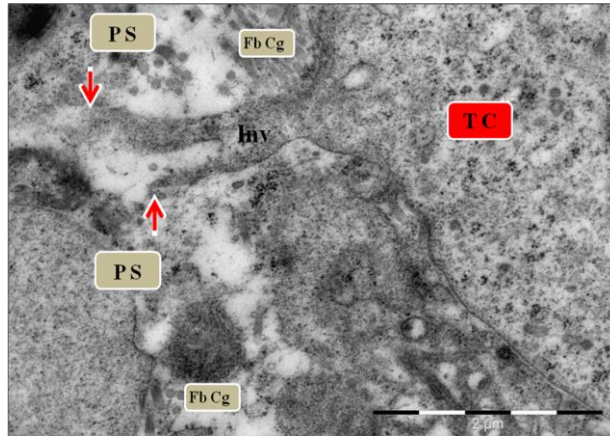
Membrana bazală denumită și lamina bazală (terminologie discutabilă) este o structură anhistă care este alcătuită din molecule specifice secretate, în principal atât de celulele epiteliale cât și de celulele conjunctive adiacente. În cazul unor epiteliu înalt diferențiate cum este cazul epidermei, la interfața epiteliu-țesut conjunctiv (de origine mezenchimală) se interpune o membrană bazală neîntreruptă cu grosime uniformă. O astfel de membrană bazală, la examinarea electronomicroscopică prezintă distinct o componentă mai electronodensă cunoscută sub numele de *lamina densa* și o componentă mai slab electronodensă denumită *lamina lucida*. Aplicarea metodei de investigației munoelectronomicroscopică permite analiza deosebit de fină a distribuției spațiale a diferitelor molecule care compun membrana bazală (Mirancea și colab., 2001).

Celulele epiteliale ale glandei mamare normale prezintă o morfologie polarizată. Polul bazal al acestora este acompaniat de o membrană bazală distinctă. Cel mai adesea, la interfața celulelor tumorale cu stroma adiacentă, membrana bazală este absentă sau mici trasee din această infrastructură mai pot fi uneori identificate.

#### **Invazivitatea. Invadopodiile. Vezicule membranare diseminate (*Shedding membrane vesicles*)**

Invadopodiile tumorale pătrund adânc în stroma peritumorală (**Fig.10**). Prin intermediul invadopodiului pot fi eliberate vezicule membranare (*shedding membrane vesicles*). Examinarea atentă a interfeței dintre celulele tumorale și stroma adiacentă surprinde diferite aspecte infrastructurale ale biogenezei și eliberării microveziculelor produse de celulele maligne.

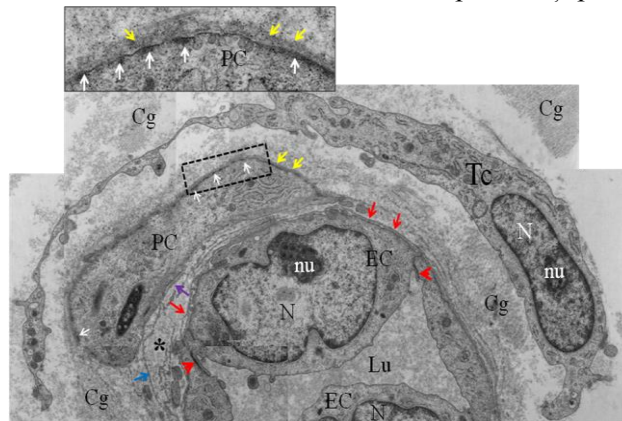




**Fig. 10** - Un invadopodium (Inv) este dichotomizat (săgeți roșii) și pătrunde puternic în stratul fibros peritumoral (PS). Nu se distinge nici o lamină bazală în jurul celei tumorale (TC). Fb Cg: collagen fibrilar. Preluare cu permisiunea editurii RJME (Mihalcea și colab., 2015).

### Microvasculatura

În marea majoritatea a cazurilor, pot fi identificate capilare cu lumen colapsat ca urmare a burjonării nucleului și citoplasmei endocitelor în interiorul lumenului capilar pe care îl ocupă aproape integral, lumenul fiind decelabil sub forma unei fante înguste. Peretele endotelial al microvasculaturii sangvine este reprezentat de celule endoteliale cu nuclee mari orientați către lumenul capilar. Celulele endoteliale sunt interconectate prin joncțiuni înguste (*tight junctions*). De cele mai multe ori pericitele sunt absente. Pe lângă membrana bazală obișnuită care înconjoară peretele endotelial, se mai pot observa membrane bazale redundante și foarte mult material amorf. Trebuie menționat faptul că telocitele apar și ele în apropierea vaselor capilare dar fără a veni în contact cu pericitul sau cu celulele endoteliale (**Fig.11**), ceea ce contrastează evident cu situația din glanda mamară normală. Un aspect interesant îl reprezintă fenomenul dislocării pericitelor prin distribuția anormală a unor membrane bazale redundante sau ca urmare a infiltrării unui material amorf între pericite și peretele capilarului.



**Fig. 11** - Celulele endoteliale (EC) prezintă nuclee de dimensiuni mari (N). Un pericit (PC) parțial detașat de peretele endotelial de către membrane bazale redundante (săgeți roșii, roz și albastre) și o cantitate crescută de material amorf (asterisc). Sunt vizibile plăcile subplasmalemale dense de pe fața internă a plasmalemelor pericitare (săgeți albe) (vezi detalii în insetul din partea superioară unde săgețile galbene marchează membrana bazală asociată pericitului). De asemenea se detectează un telocit (Tc) în imediata

apropiere a unui capilar sangvin, care nu intră în contact direct nici cu celulele endoteliale nici cu pericitul. N: Nuclei; nu: Nucleoli; Lu: Lumen. Capetele de săgeți roșii marchează joncțiuni interendoteliale. Cg: Colagen. Preluare cu permisiunea editurii RJME (Mihalcea și colab., 2015).

### **Telocitele**

Pe lângă celulele stromale obișnuite din sân, se mai pot detecta fibroblaste, adipocite dar și alte tipuri de celule, precum celulele mastocitare și telocitele. Uneori, două ajung în contact una cu cealaltă realizând așa-numitele sinapse homocelulare.

Deoarece telopodele care reprezintă extensiile caracteristice telocitelor sunt extrem de subțiri, șansa de a avea în același plan întreaga lungime a corpului telocitar împreună cu telopodele este foarte rară. Exceptând citoplasma corpului celular (unde este situat nucleul), bogat în reticul endoplasmatic rugos și în aparatul Golgi (care nu este prezentat aici), restul citoplasmei are un conținut scăzut de citomembrane, însă cu foarte mulți ribozomi, reticul endoplasmatic atât rugos cât și neted, microfibrile aparținând citoscheletului și calveole. Trebuie menționat faptul că, pe lângă telocitele localizate în țesuturile stromale normale, în toate specișenele de carcinom mamar invaziv investigate de noi, telocitele au avut o remarcabilă limitare a numărului de mitocondrii. În plus, trebuie menționat faptul că unele telopode sunt implicate în procesele de eliminare a microveziculelor membranare. Adesea, două sau mai multe fragmente ale telopodelor reprezentate de alternanța dintre podomi și podomeri merg împreună extrem de apropiat, însă fără a se crea vreun contact direct între acestea.

### **DISCUȚII**

Utilizând microscopia electronică în transmisie, au fost analizate tumori invazive de carcinoame mamare unde celulele neoplazice reprezentate de epiteliul glandular prezintă un raport de nucleu/citoplasmă ridicat. Nucleii sunt polimorfi. În plus, se constată o frecvență ridicată de mitoze atipice. Adesea, în celulele tumorale au fost detectați 1 sau 2 centrioli, uneori chiar 3 centrioli într-o celulă malignă, ceea ce sugerează procesul de multiplicare a celulelor tumorale. Eucromatina este predominantă în timp ce heterocromatina este în cea mai mare parte atașată la membrana internă a anvelopei nucleare. Acesta este o caracteristică generală a nucleoplasmei din celulele tumorale. Se consideră că structura nucleară în sine poate modula fenotipul celular și tipul de țesut. Eucromatina este mai ușor de transcris comparativ cu heterocromatina care este silențioasă din punct de vedere transcripțional (Bissell și colab., 1999; Tamaru, 2010; Mirancea și colab., 2010; Mirancea și colab., 2013).

Celulele epiteliale ale glandei mamare normale sunt celule polarizate. Pentru a-și putea menține polaritatea, aceste celule trebuie să mențină interacții relativ stabile de tip celulă-celulă și celulă-matrice extracelulară. Astfel, joncțiunile celulelor specializate sunt dezvoltate și trebuie să rămână neschimbate în infrastructura și componența lor moleculară. Pentru a-și menține structura 3-D și comunicarea cu celulele învecinate din epiteliu, structurile de adeziune joncțională specializate pentru interacțiile celulă-celulă și celulă-matrice extracelulară trebuie să fie bine dezvoltate. Coeziunea intercelulară este susținută de complexul joncțional, reprezentat în marea majoritate a cazurilor de desmosomi. Prin ancorarea caderinelor desmosomale ale celulelor adiacente la citoscheletul intermediar al filamentelor, joncțiunile desmosomale contribuie la organizarea și întreținerea histoarhitecturii (Kimura și colab., 2007; Stahley și colab., 2014). Investigarea prin microscopie electronică de transmisie și prin imunoelectronmicroscopie a desmozomilor s-a observat faptul că infrastructurile specifice și componentele moleculare sunt extrem de

precis localizate în domeniile extracelulare, transplasmalemale și intracelulare (Mirancea și colab., 2010; Mirancea și colab., 2001).

Prin intermediul invadopodiilor, celulele tumorale generează și răspândesc vezicule de tip membranar printre care și exozomi, în interiorul stromei peritumorale. Printre particularitățile detectate la nivel infrastructural se numără și telocitele, care reprezintă un nou fenotip de celule interstițiale/stromale care sunt considerate a deține funcții cheie în procesul de semnalizare celulară, prezentând un număr redus de interacții hetero-celulare, conducând la ipoteza că ar putea perturba modulația homeostazică tisulară (Mihalcea și colab., 2015).

Adesea, membrana bazală este absentă la interfața tumoră-stromă peritumorală. Se cunoaște bine că integritatea membranei bazale este o condiție esențială a morfogenezei epiteliale din timpul dezvoltării embrionare aceasta reglând interacțiile epitelial-mezenchimale (Mirancea și colab., 2010).

Veziculele extracelulare sunt infrastructuri nano-membranoase care variază de la 30-2.000 nm în diametru și care sunt expulzate de către mai multe tipuri de celule în micromediul extracelular. Nomenclatura, biogeneza și rolurile acestora sunt încă nelămurite (Ji și colab., 2014). Veziculele extracelulare, în special exosomii, sunt purtătoare de diverse molecule precum proteine, lipide, microARN, mRNA și fragmente ADN. Aceste acționează ca mediatori în comunicările intercelulare prin inducerea unor modificări la nivelul receptorilor celulari (Ji și colab., 2014; Dutta și colab., 2014). De asemenea și telocitele pot contribui la eliminarea de vezicule extracelulare (Mirancea și colab., 2013; Cretoiu și colab., 2014; Fertig și colab., 2014).

Telocitele au fost descrise ca fiind celule interstițiale cu următorul pattern: corpul celular de formă ovoidă în care este localizat nucleul prezintă 1-5 (cel mai adesea două) prelungiri celulare cu aspect moniliform denumite telopode (Mirancea, 2016). Prelungirile celulare sunt de regulă foarte lungi și foarte subțiri. Fiecare telopod prezintă alternativ zone mai umflate denumite podomi și zone mai subțiri denumite podomeri. La nivelul podomilor sunt localizate mitocondriile. În telopode sunt vizibile profiluri de reticul endoplasmic neted și caveole (unități de preluare/eliberare de  $Ca^{2+}$ ). Acest subtip special de celule stromale a fost identificat în diferite țesuturi normale (Cretoiu și colab., 2014; Popescu și colab., 2005; Zheng și colab., 2014; Rusu și colab., 2012). În glanda mamară umană normală, telocitele au fost identificate ca fiind celule stromale CD-34 pozitive în jurul vaselor sanguine și al unităților secretorii (Petre și colab., 2016).

## CONCLUZII

Lucrarea de față a fost realizată în scopul determinării statusului mutațional al unor gene cu rol important în apariția și dezvoltarea tumorilor de sân, și mai mult decât atât identificarea unor aspecte particulare de infrastructură care ar putea să aducă un plus în stabilirea unui tratament individualizat care să îmbunătățească atât răspunsul la tratament cât și rata de supraviețuire a bolnavului oncologic. S-au determinat profilele mutaționale ale genelor supresor tumorale *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* și a oncogenei *PIK3CA*. De asemenea probele au fost supuse și investigațiilor de microscopie electronică care au relevat aspecte importante legate de ultrastructura celulelor tumorale. Analizând rezultatele de biologie moleculară și microscopie electronică în transmisie obținute putem spune că:

1. În urma investigațiilor pattern-ului mutațional al genei *TP53* am detectat un procent de 27,3% mutații somatice, din care, 66,67% au reprezentat deleții iar 33,3% substituții.
2. Am identificat o singură mutație “missense”, p.R175H (4,54%), la nivelul exonului 5 al genei *TP53*.
3. De asemenea, o singură substituție “nonsense”, p.R231\* (4,54%), a fost detectată în regiunea codantă a exonului 6 al genei *TP53*.
4. Din totalul mutațiilor detectate, 22,73% (5/22) au afectat proteina la nivelul domeniului de legare al ADN și 4,54% (1/22) a fost în afara acestui domeniu.
5. În urma secvențierii directe a exonilor 4-9 atât a regiunilor codante cât și a regiunilor necodante a genei *TP53* am identificat 5 variații polimorfice mononucleotidice.
6. Trei dintre SNP-urile identificate au fost situate în regiuni codante ale exonului 4 (rs1042522/R72P și rs372397095/P82P) și ale exonului 5 (rs1800372/R213R).
7. În regiunea necodantă a intronului 6 am detectat 2SNP-uri: rs1625895 și rs17880604.
8. În urma analizei mutaționale a exonilor 9 și 20 ai genei *PIK3CA* am identificat 36,4% (8/22) mutații.
9. În domeniul helical (exon 9) am identificat 13,64% (3/22) mutații, acestea fiind p.Q546K (c.1636C>A) și p.E542K (c.1624G>A).
10. În domeniul kinazic, rata mutațiilor a fost de 22,73% (5/22), iar mutația identificată a fost p.H1047R (c.3140A>G).
11. Rezultatele obținute referitoare la frecvența mutațiilor în gena *PIK3CA* și ponderea mai mare a mutațiilor în exonul 20 sunt în concordanță cu datele publicate anterior în literatură pe cancerul mamar.
12. În urma investigațiilor moleculare a genelor *BRCA1* și *BRCA2* am identificat 12,5% (1/8) mutații de tip „nonsense” în exonul 27 al genei *BRCA2*.
13. De asemenea în urma secvențierii am detectat 23 de variații ale unei singure nucleotide dintre care 43,48% (10/23) au afectat gena *BRCA1* în timp ce 56,52% (13/23) au fost identificate în gena *BRCA2*.
14. 73,91% (17/23) reprezintă variații polimorfice exonice iar 26,09% (6/23) sunt polimorfisme de tip intronic.
15. Referitor la polimorfismele detectate în regiunea codantă a genelor BRCA, 87,5% (14/16) au reprezentat tranziții din care 50% au fost tranziții A↔G și 50% tranziții T↔C.
16. Transversii au fost detectate doar în regiunea exonică în două cazuri (12,5%; 2/16) și anume SNP rs144848 reprezentând o transversie de tip A→C și SNP rs206076 o transversie de tip G→C.
17. Toate cele șase variații polimorfice identificate în regiunea necodantă a genelor au reprezentat tranziții din care 5 au fost tranziții de tip C↔T iar 1 de tip A→G.
18. În zona netranslatată Utr-5 a fost detectată o variație rs1799943 care este reprezentată de o tranziție G→A.

În lotul de paciente luate în studiu trei dintre acestea au prezentat câte două mutații care au afectat gene diferite astfel:

- ❖ La pacienta corespunzătoare probei 1T am identificat mutația c.213\_214del2 care reprezintă o deleție în exonul 4 al genei *TP53* a două baze nucleotidice CC, care conduce la modificarea

cadrlui de citire al ADN cu obținerea unei proteine trunchiate care cel mai probabil va fi nefuncțională. Aceiași pacientă a prezentat și mutația Q546K în exonul 9 al genei *PIK3CA* care afectează sub 1% din populație, fiind considerată rară și care acționează în domeniul helical al proteinei fiind orientată spre fața externă a domeniului, având astfel capacitatea de a interacționa și cu alte proteine. Deoarece în această zonă se inseră de obicei un rest de lizină s-a formulat ipoteza că aceasta ar putea interacționa chiar și cu membrana celulară.

- ❖ De asemenea, pacienta corespunzătoare probei 5T a prezentat două mutații în diferite gene și anume: deleția de nouă nucleotide de tip *inframe* c.739-747delAACCGGAGG care afectează trei codoni din exonul 7 al genei *TP53* (247, 248 și 249) conducând la sinteza unei proteine scurte și nefuncționale. A doua mutație identificată a fost H1047R în exonul 20 al genei *PIK3CA*, care afectează domeniul kinazic al proteinei adiacent buclei de activare și influențând astfel mobilitatea proteică. Această mutație este responsabilă și de transformarea malignă a celulelor epiteliale în cancerele mamare de tip luminal formulând ideea că este un eveniment precoce în tumorigeneza mamară.
- ❖ Ultima pacientă cu mutație dublă, corespunde probei 7T care a prezentat mutația H1047R în domeniul kinazic al genei *PIK3CA*. În urma acestui tip de mutație se obțin proteine cu activitate catalitică intensă care transmit semnale puternice la nivelul căii de semnalizare stimulând începerea procesului de transformare a celulelor normale în celule tumorale. Această pacientă a fost singura din lotul analizat care prezintă mutație la nivelul genei *BRCA2*. Mutația de tip „nonsense” c.10067C>G a fost detectată în exonul 27 și constă în înlocuirea codonului TCA (serină) cu codonul TGA (codon STOP) în poziția 3356 a proteinei și se pare că este responsabilă de alterarea structurii genomice.
- Investigațiile de microscopie electronică în transmisie au relevat că în carcinomul mamar ductal invaziv joncțiunile intercelulare și anume, infrastructura desmozomilor este sever alterată sau desmozomii pot fi total absenți ceea ce conduce la alterarea profundă a histoarhitecturii glandei mamare.
- Celulele tumorale generează și diseminează vezicule membranare, incluzând exosomii pe care îi eliberează în interiorul stromei peritumorale.
- Telocitele generează și eliberează vezicule membranare în matricea extracelulară a stromei peritumorale.
- Veziculele membranare eliberate în stroma tumorală care poate fi diseminate distant de celulele producătoare, prin conținutul lor pot juca rol modulator prin efectele lor paracrine.
- Contactele heterocelulare ale telocitelor sunt reduse, ceea ce sugerează o posibilă perturbare a modulației homeostaziei tisulare.
- Veziculele membranare produse de celulele tumorale *per se* și de telocitele prezente în stroma tumorală prin conținutul lor au un rol putativ în semnalizarea intercelulară.
- Limitarea numărului până la absența totală a joncțiunilor heterocelulare ale telocitelor cu alte tipuri celulare din carcinomul mamar ductal invaziv sugerează o posibilă perturbare a modulației homeostaziei tisulare.

## BIBLIOGRAFIE

- ❖ Angelopoulou K, Levesque MA, Katsaros D, Shipman R and Diamandis EP. *Exon 5 of TP53 gene is a target for deletions in ovarian cancer*. Clinical Chemistry 44:1, 72-77, 1998.
- ❖ Balmana J, Diez O, Rubio IT și Cardoso F. *BRCA în cancerul de sân: Ghidul ESMO de practică clinică pentru diagnosticare, tratament și urmărire*. Journal of Radiotherapy & Medical Oncology. Vol.20, Supplement 1, p. 127-130, 2014.
- ❖ Bissell MJ, Weaver VM, Lelièvre SA, Wang F, Petersen OW and Schmeichel KL. *Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast*. Cancer Res, 1999, 59(7 Suppl):1757s–1763s; discussion 1763s–1764s.
- ❖ Chen X, Weaver J, Bove BA, Vanderveer LA, Weil SC, Miron A, Daly MB and Godwin AK. *Allelic imbalance in BRCA1 and BRCA2 gene expression is associated with an increased breast cancer risk*. Hum. Mol. Genet. 2008, 17, 1336–1348.
- ❖ Cretoiu SM and Popescu LM. *Telocytes revisited*. Biomol Concepts, 2014, 5(5):353–369.
- ❖ Dimas AS, Deutsch S, Stranger BE, Montgomery SB, Borel C, Attar-Cohen H, Ingle C, Beazley C, Gutierrez AM, Sekowska M, Gagnebin M, Nisbett J, Deloukas P, Dermitzakis ET and Antonarakis SE. *Common regulatory variation impacts gene expression in a cell type-dependent manner*. Science 2009 Sep 4;325(5945):1246-50.
- ❖ Dutta S, Warshall C, Bandyopadhyay C, Dutta D and Chandran B. *Interactions between exosomes from breast cancer cells and primary mammary epithelial cells leads to generation of reactive oxygen species which induce DNA damage response, stabilization of p53 and autophagy in epithelial cells*. PLoS One, 2014, 9(5):e97580.
- ❖ Fertig ET, Gherghiceanu M and Popescu LM. *Extracellular vesicles release by cardiac telocytes: electron microscopy and electron tomography*. J Cell Mol Med, 2014, 18(10):1938–1943.
- ❖ Gymnopoulos M, Elslinger MA and Vogt PK. *Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function*. PNAS March 27, 2007, vol.104,no.13, 5569-5574.
- ❖ Ji H, Chen M, Greening DW, He W, Rai A, Zhang W and Simpson RJ. *Deep sequencing of RNA from three different extracellular vesicle (EV) subtypes released from the human LIM1863 colon cell line uncovers distinct miRNA-enrichment signatures*. PLoS One, 2014, 9(10):e110314.
- ❖ Johnson N, Fletcher O, Palles C, Rudd M, Webb E, Sellick G, dos Santos Silva I, McCormack V, Gibson L, Fraser A, Leonard A, Gilham C, Tavtigian SV, Ashworth A, Houlston R and Peto J. *Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility*. Human Molecular Genetics, 2007, Vol. 16, No. 9 1051–1057.
- ❖ Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R and Ishioka C. *Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis*. PNAS, July 8, 2003, vol.100, no.14/8424-8429.
- ❖ Kimura TE, Merritt AJ and Garrod DR. *Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive*. J Invest Dermatol, 2007, 127(4):775–781.
- ❖ Maia AT, Spiteri I, Lee AJ, O'Reilly M, Jones L, Caldas C and Ponder BA. *Extent of differential allelic expression of candidate breast cancer genes is similar in blood and breast*. Breast Cancer Res. 2009, 11, R88.

- ❖ Mihalcea C, Morosanu AM, Murarasu D, Puiu L, Cinca S, Voinea SC and Mirancea N. *Particular molecular and ultrastructural aspects in invasive mammary carcinoma*. Rom J Morphol Embryol 2015, 56(4): 1371-1381.
- ❖ Mihalcea CE, Morosanu AM, Murarasu D, Puiu L, Cinca S, Voinea CS and Mirancea N. *Molecular analysis of BRCA1 and BRCA2 genes by next generation sequencing and ultrastructural aspects of breast tumor tissue*. Rom J Morphol Embryol 2017, 58(2):445–455.
- ❖ Miller TW. *Initiating breast cancer by PIK3CA mutation*. Breast Cancer Research, 2012, 14:301, DOI: 10.1186/bcr3103.
- ❖ Mirancea N, Mirancea D, Fusenig NE and Breitskreutz D. *Immunoelectron microscopic detection of the molecular components of the hemidesmosomal junction*. Proc Rom Acad Ser B Chem Life Sci Geosci, 2001, 3(2):123–130.
- ❖ Mirancea N și Mirancea D. *Ultrastructura celulelor și țesuturilor*. Editura Ars Docendi 2010. Pag. 23-24.
- ❖ Mirancea N, Mirancea GV, Moroșanu AM, Juravle FD and Mirancea D. *Infrastructural and molecular tumor–extracellular matrix interface alterations in the basocellular and squamous cell carcinoma development*. Rom J Biol Zool, 2010, 55(1): 95–109.
- ❖ Mirancea N, Moroșanu AM, Mirancea GV, Juravle FD and Mănoiu VS. *Infrastructure of the telocytes from tumor stroma in the skin basal and squamous cell carcinomas*. Rom J Morphol Embryol, 2013, 54(4):1025–1037.
- ❖ Mirancea N, *Telocyte – a particular cell phenotype. Infrastructure, relationships and putative functions*, Rom J Morphol Embryol, 2016, 57(1):7-21.
- ❖ Mukohara T. *PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications*. Breast Cancer: Targets and Therapy, 2015; 7:111-123, doi:10.2147/BCTT.S60696.
- ❖ Murnyak B and Hortobagyi T. *Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutation in cancer*. Oncotarget. 2016 Oct 4;7(40):64910-64920.
- ❖ Petitejean A, Achatz MIW, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. *TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact in cancers prognosis and outcomes*. Oncogene (2007) 26, 2157-2165.
- ❖ Petre N, Rusu MC, Pop F and Jianu AM. *Telocytes of the mammary gland stroma*. Folia Morphol (Warsz), 2016, 75(2):224–231.
- ❖ Popescu LM, Gherghiceanu M, Cretoiu D and Radu E. *The connective connection: interstitial cells of Cajal (ICC) and ICC-like cells establish synapses with immunoreactive cells. Electron microscope study in situ*. J Cell Mol Med, 2005, 9(3):714–730.
- ❖ Rusu MC, Mirancea N, Mănoiu VS, Vâlcu M, Nicolescu MI and Păduraru D. *Skin telocytes*. Ann Anat, 2012, 194(4):359–367.
- ❖ Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S și Cardoso F. *Cancerul de sân primar: Ghidul ESMO de practică clinică pentru diagnostic, tratament și monitorizare*. Journal of Radiotherapy & Medical Oncology. Vol.20, Supplement 1, p. 131-150, 2014.
- ❖ Shen J, Medico L. and Zhao H. *Allelic imbalance in BRCA1 and BRCA2 gene expression and familial ovarian cancer*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2011, 20, 50–56.
- ❖ Stahley SN, Saito M, Faundez V, Koval M, Mattheyses AL and Kowalczyk AP. *Desmosome assembly and disassembly are membrane raft-dependent*. PLoS One, 2014, 9(1):e87809.

- ❖ Tamaru H. *Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line*. *Genes Dev*, 2010, 24(14):1465–1478.
- ❖ Tommasi S, De Summa S, Pilato B and Paradiso A. *BRCA Unclassified Variants: How Can They be Classified?* *Current Women's Health Reviews*, 2012, 8, 30-37.
- ❖ Vegran F, Rebucci M, Chevrier S, Cadouot M, Boidot R and Lizard-Nacol S. *Only Missense Mutations Affecting the DNA Binding Domain of P53 Influence Outcomes in Patients with Breast Carcinoma*. *PLoS ONE* 2013 8(1): e55103.
- ❖ Xu J, Wang J, Hu Y, Qian J, Xu B, Chen H, Zou W and Fang JY. *Unequal prognostic potentials of p53 gain-of-function mutations in human cancers associate with drug-metabolizing activity*. *Cell Death and Disease* (2014) 5, e1108.
- ❖ Zardavas D, Phillips WA and Loi Sherene. *PIK3CA mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data*. *Breast Cancer Research* 2014, 16:201.
- ❖ Zheng M, Sun X, Zhang M, Qian M, Zheng Y, Li M, Cretoiu SM, Chen C, Chen L, Cretoiu D, Popescu LM, Fang H and Wang X. *Variations of chromosomes 2 and 3 gene expression profiles among pulmonary telocytes, pneumocytes, airway cells, mesenchymal stem cells and lymphocytes*. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(10):2044–2060.



## LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE ÎN TEMATICA TEZEI DE DOCTORAT

### Particular molecular and ultrastructural aspects in invasive mammary carcinoma

CORINA ELENA MIHALCEA<sup>1)</sup>, ANA-MARIA MOROȘANU<sup>2)</sup>, DANIELA MURĂRAȘU<sup>1)</sup>, LILIANA PUIU<sup>1)</sup>, SABIN CINCA<sup>1)</sup>, SILVIU CRISTIAN VOINEA<sup>1)</sup>, NICOLAE MIRANCEA<sup>2)</sup>

1) “Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu” Oncological Institute, Bucharest, Romania

2) Institute of Biology Bucharest of Romanian Academy

#### **Abstract**

Electron microscopic investigations of invasive mammary carcinoma tumors revealed that intercellular junctions, namely desmosomes are severely altered; some desmosomes became internalized. Tumor cells, especially by their invadopodia, generate and disseminate membrane vesicles, including exosomes, inside of peritumoral stroma. Telocytes, a new described interstitial/stromal cell phenotype, considered to play important roles in cell signaling, exhibited a reduced number of hetero-cellular contacts, which suggests a possible perturbation of tissular homeostasis modulation. Signaling PIK3/Akt pathway plays an important role both in carcinogenesis and in proliferation, differentiation, and cell survival. Alteration of this pathway has been observed in many human cancers, often involving an increase in the activity of PIK3CA, p110 $\alpha$  catalytic subunit of PI3K. Our study confirms the high prevalence of PIK3CA mutations in breast cancer. In accordance with the results of the largest previous studies, 87.5% of mutations detected by DNA direct sequencing were hot spot mutations, most of them located in the kinase domain. High percentage of mutations detected by high-resolution melting makes the assay an attractive choice for mutation scanning, especially, in samples with low percentage of tumor cell.

**Keywords:** invasive mammary carcinoma, shedding membrane vesicles, telocytes, mutations in exons 9 and 20 of PIK3CA gene.

### Molecular analysis of BRCA1 and BRCA2 genes by next generation sequencing and ultrastructural aspects of breast tumor tissue

CORINA ELENA MIHALCEA<sup>1)</sup>, ANA-MARIA MOROȘANU<sup>2)</sup>, DANIELA MURĂRAȘU<sup>1)</sup>, LILIANA PUIU<sup>1)</sup>, SABIN-AUREL CINCA<sup>1)</sup>, SILVIU CRISTIAN VOINEA<sup>3)</sup>, NICOLAE MIRANCEA<sup>2)</sup>

1) Department of Carcinogenesis and Molecular Biology, “Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu” Institute of Oncology, Bucharest, Romania

2) Department of Plant and Animal Cytobiology, Institute of Biology Bucharest of Romanian Academy, Bucharest, Romania

3) Department of Oncological Surgery II, “Prof. Dr. Alexandru Trestioreanu” Institute of Oncology, Bucharest, Romania

#### **Abstract**

In this paper, we focus our interest on the dynamics alterations of the tumor–stroma interface at the ultrastructural level and to detect BRCA1 and BRCA2 mutations using next generation sequencing (NGS)

of breast tumor tissue. Electron microscopic investigation revealed some peculiar infrastructural alterations of the tumor cells per se as well as of the tumor–stroma interface: invadopodia, shedding microvesicles, altered morphology and reduced number of telocytes, different abnormalities of the microvasculature. Tumor suppressor genes BRCA1 and BRCA2 are the genes with most hereditary predisposition to breast and ovarian cancer. An early identification of mutation within these genes is essential for determining classification and therapeutic approach to patients. Genetic tests used to determine mutations in BRCA1 and BRCA2 genes are laborious analysis methods which include, among others, NGS. We analyzed a total of eight samples, in which genomic DNA was amplified using Ion AmpliSeq panel BRCA1 and BRCA2. DNA libraries were created, amplified and sequenced with Ion Torrent Personal Genome Machine. The bio-information data obtained allow us to detect all known pathogenic mutation and uncertain polymorphisms.

**Keywords:** invasive mammary carcinoma, telocytes, BRCA1 and BRCA2, next generation sequencing.