

Titlul proiectului: Evaluarea microARN-urilor din încărcătura exosomală în vederea identificării mecanismelor de rezistență la terapie în cancerul de sân triplu negativ

Acronim: SUNRISE - exoSomes drUg resistaNce tRIple breasT cancEr

ID : PN-III-P1-1.1-PD-2021-0471

Perioada de raportare :01.04.2022-31.12.2022

Coordonator : Universitatea de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca – RO, Departament – Centrul de Cercetări pentru Genomică Funcțională, Biomedicină și Medicină Translațională

Director de proiect : CSIII Dr Jurj Maria-Ancuta

Mentor: Prof. Univ. Dr. Ciuleanu Tudor Eliade

Principalele obiective ale proiectului sunt următoarele:

1. Analiza microARN-urilor în exosomii izolați din celulele de cancer de sân triplu negativ sensibile și rezistente la terapia cu doxorubicin și din fibroblaști, punându-se accent pe nivelele alterate de microARN în legătură cu rezistența la terapie.

2. Determinarea efectului dat de fibroblaști asupra biologiei celulelor de cancer de sân triplu negativ sensibile la terapie, arătând modularea rezistenței la doxorubicină prin transferul exosomilor și a factorilor solubili secretați de fibroblaști în spațiul extracelular.

WP1. Analiza microARN-urilor la nivelul exosomilor izolați din liniile celulare de cancer de sân triplu negativ rezistente și sensibile la doxorubicină și fibroblaști, punându-se accentul pe rezistența la terapie.

Activitatea 1.1 Izolarea exozomilor din liniile celulare de cancer de sân triplu negativ rezistente și sensibile la doxorubicina, și fibroblaști prin centrifugare diferențială (lunile 1 - 5).

Activitatea 1.2 Caracterizarea fizică și moleculară a exozomilor izolați din celulele de cancer de sân triplu negativ rezistente și sensibile la doxorubicină (lunile 5-6).

În cele două activități mai sus menționate, s-a izolat exosomi din liniile de cancer de sân triplu negativ și fibroblaști. Pentru realizarea acestei activități, mediul de cultură colectat de pe liniile celulare de cancer de sân triplu negativ, sensibile și rezistente la terapia cu doxorubicină, și fibroblaști a fost colectat și supus ultracentrifugării. Prin această metodă, mai întâi, miroveziculele au fost îndepărtate prin centrifugări și filtrări succesive, care în final a ajutat la obținerea exosomilor cu dimensiuni mai mici decât 200nm. După ultracentrifugare, exosomii au fost supuși caracterizării fizice folosind NanoSight și TEM (Microscopia de transmisie electronică). În urma acestei analize, diametrul exosomilor este în jurul valorii 100 nm (date ce confirmă literatura de specialitate), iar imaginile microscopice arată o morfologie de tip “cup-shape”. Caracterizarea moleculară, folosind tehnica Western Blot, au fost identificate proteinele specifice acestor entități, și anume CD9, CD63 CD81.

WP2. Evaluarea efectului dat de fibroblaști asupra celulelor de cancer de sân triplu negativ sensibile la terapie, arătând modularea rezistenței la doxorubicină prin transferul exosomilor și a factorilor solubili secretați de fibroblaști (lunile 11-18).

Activitatea 2.1 Exozomii secretați de linile celulare de cancer de san triplu negativ rezistente și fibroblaști vor fi co-cultivați cu linile celulare de cancer de sân triplu negativ sensibile la doxorubicină (lunile 11 - 14).

Activitatea 2.2 Analiza statistica a datelor obtinute pe co-culturi efectuate pe liniile celulare de cancer de san triplu negativ (lunile 11 - 14).

Exosomii sunt vezicule biocompatibile și biodegradabile, care asigură comunicarea inter și intracelulară. Mai mult decât atât, exosomii sunt implicați în transferul materialului genetic de la celula donor la celula țintă, prin urmare, modulează fenotipul celulei țintă. După etapa de izolare și caracterizare fizică și moleculară, exosomii au fost co-cultivați cu linii celulare de cancer de sân pentru a putea vizualiza internalizarea la nivelul celulei țintă. După 2 ore, exosomii prezintă o abundență semnificativă în citoplasma celulei țintă, fapt care dovedește ușurința internalizării. Totodată, prin administrarea exosomilor la nivelul celulelor netratate cu doxorubicină, s-a observat o modificare în morfologia celulară – fapt care afirmă implicația exosomilor în modularea procesului de tranziție epitelio-mezenchimală. Totodată, exosomii sunt implicați în modularea mecanismelor de rezistență la terapie, care ajută la creșterea rezistenței celulelor sensibile la terapie. Fiind componente importante a micromediului tumoral, exosomii au capacitatea de a ținti celule din vecinătate sau din alte situsuri.

Prin analiza bioinformatică, au fost identificate gene implicate în rezistența la terapie, utilizând date de microarray generate anterior, cu diferențe de expresie între Hs578T/ Dox și MDA-MB-231/ Dox fata de Hs578T și MDA-MB-231. Pentru a determina relevanța clinică a acestor gene, am realizat o analiză a pacienților tratați cu Doxorubicin din TCGA BRCA 2018 (n = 314) și am determinat care din genele supraexprimate în analiza anterioară sunt asociate cu un prognostic rezervat în ceea ce privește intervalul liber de boală (*CFB*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *DUSP1*, *EGRI*, *IL8*, *RRAD*, *TMEM88*) și care din genele subexprimate în analiza anterioară sunt asociate cu un prognostic pozitiv în ceea ce privește intervalul liber de boală (*SHISA3*). Deoarece intenționăm să utilizăm exosomii ca un mod de biopsie lichidă, trebuie menționat că profilul de expresie a microARN-urilor este mult mai stabil și mai facil de evaluat decât profilul de expresie al mARN-urilor în cadrul acestor entități. Astfel, utilizând miRTargetLink 2.0, am observat că 3 microARN-uri țintesc cele mai multe gene din această rețea (4 gene): miR-1-3p, miR-335-5p și miR-98-5p. În mod interesant, putem menționa că toate cele 3 microARN-uri țintesc atât *CXCL2* cât și *CXCL8*. Acestea reprezintă posibile microARN-uri candidate de a fi evaluate din plasma pacienților cu cancer de sân în vederea prezicerii dobândirii rezistenței la terapia cu doxorubicină.