

**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 :** 01.01.2023-31.12.2023

**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 1.3 Evaluarea transcriptilor cu nivel alterat la nivelul celulelor de cancer de sân triplu negativ și fibroblasti, folosind tehnica microarray (lunile 7 – 8).**

Această etapă se bazează pe evaluarea transcriptilor cu nivel alterat în urma co-culturii dintre liniile celulare de cancer de sân triplu negativ și fibroblaști. Pentru a putea identifica prezența acestor transcripti, s-a folosit tehnica microarray care oferă o imagine de ansamblu asupra 60 000 de oligonucleotide. În urma analizei bioinformatică, au fost identificați transcripti cu nivel alterat, supraexprimați și subexprimați, care sunt implicați în modularea diferitelor procese celulare și moleculare. Astfel, pe fiecare condiție experimentală, au fost identificate următoarele:

1. pentru linia celulară Hs578T în co-cultura cu fibroblaști: 183 gene subexprimate și 486 gene supraexprimate.
2. pentru linia celulară Hs578T rezistentă la terapie cu doxorubicină în co-cultura cu fibroblaști: 417 gene subexprimate și 1405 gene supraexprimate.
3. pentru linia celulară MDA-MB-231 în co-cultura cu fibroblaști: 1778 gene suexprimate și 10588 gene supraexprimate.
4. pentru linia celulară MDA-MB-231 rezistentă la terapie cu doxorubicină în co-cultura cu fibroblaști: 1927 gene subexprimate și 13853 gene supraexprimate.

Un număr crescut de gene cu nivel alterat sunt implicate în activarea proceselor de rezistență la terapie. Rezistența la terapie, în cercetarea oncologică, reprezintă un impediment major datorită scăderii ratei de supraviețuire a pacienților diagnosticați cu diferite forme de cancer. Astfel, un număr crescut de cercetări se efectuează pe elucidarea și contracararea acestor mecanisme. O atenție deosebită este îndreptată înspre familia de transportori ABC, gene implicate în rezistența la terapie. În lista de gene identificate, s-a observat prezența unui număr crescut de gene aparținătoare acestei familii, ca de exemplu *ABCB3*, *ABCB1*,

*ABCC6, ABCC13, ABCD3, ABCB5, ABCD2, ABCD3* etc. Supraexprimarea acestor gene conduce la creșterea riscului de rezistență la terapie. Prin activarea genelor *CXCL11, ZEB1, TGF-β1, IL6, MALAT1*, activarea mecanismelor de rezistență la terapie sunt susținute și de alterarea diferitelor procese biologice, precum tranziția epitelio-mezenchimală, procese inflamatorii, invazie tumorală, metastaze, care concluzionează prin scăderea ratei de supraviețuire a pacienților diagnosticați cu cancer.

**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 2.2 Implicația fibroblaștilor și a liniilor de cancer de sân triplu negativ rezistente la terapie în activarea mecanismului de rezistență în liniile sensibile la terapia cu doxorubicină. Evaluarea celor mai semnificative microARN-uri și gene prin tehnica qRT-PCR (lunile 15-16).*

După identificarea genelor cu nivel de expresie alterat, următorul pas a fost identificarea microARN-urilor care sunt implicate în modularea genelor mai sus menționate. Alături de aceste microARN-uri, prezența micromediului tumoral ajută la susținerea și modularea proceselor de rezistență la terapie și metastazare.

Prin folosirea fibroblaștilor, s-a observat o creștere semnificativă în cazul genelor *ABCB1, CXCL11, ZEB1, TGF-β1, IL6, MALAT1*. În acest caz, prezența fibroblaștilor, componente importante a micromediului tumoral, susține formarea situsului tumoral. Mai mult decât atât, în alcătuirea micromediului tumoral sunt prezente veziculele extracelulare (exosomi) și factori de creștere (citokine). Aceste entități asigură comunicarea inter- și intracelulară, modifică fenotipul celulei țintă și modulează diferite procese biologice prin intermediul transferului de material genetic (microARN, ADN). Prin analiza bioinformatică, s-a indentificat prezența unor microARN-uri care țintesc genele *ABCB1, CXCL11, ZEB1, TGF-β1, IL6, MALAT1*, și anume miR-19b-3p, miR-21-5p, miR-125a-5p, miR-155-3p. MicroARN-urile sunt ținte directe a multor gene, gene implicate în diferite căi de semnalizare, procese biologice, responsabile de dezvoltarea celulelor tumorale.

Prin tehnica RT-qPCR s-a validat nivelul de expresie a genelor cu nivel alterat, gene identificate prin tehnica microarray, precum și profilul celor 4 microARN-uri, miR-19b-3p, miR-21-5p, miR-125a-5p, miR-155-3p.

Următorul pas este reprezentat de validarea acestor microARN-uri pe probe biologice (plasma/exosomi), probe recoltate de la pacienți diagnosticați cu cancer de sân triplu negativ.