

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

HABILITATION THESIS

**Medical applications of Molecular biology
research**

CONF. DR. HOREA-VLADI MATEI

Abstract

The habilitation thesis entitled "Applications of Molecular Biology Research in Medicine" reflects the milestones of my scientific, professional and academic work carried out after the Ph.D defense entitled "Water Channels in Erythrocyte Membrane", it was rewarded with the "Best Thesis" award of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy in December 2003. This research line continued until 2009 and materialized in the publication (as co-author) of several studies concerning the water permeability of erythrocytes collected from patients with certain pathologies or various animal species.

The main clinical research directions in which I have had personal contributions are:

- Molecular analysis methods in the differential diagnosis of microcytic anaemia due to cytoskeleton defects;
- Molecular diagnostic studies of bacterial and HPV infections in sexually transmitted diseases;
- Molecular DNA analyses in paternity testing and detection of the Y chromosome in forensic examinations.

Establishing a differential molecular diagnosis of congenital anaemia due to cytoskeleton defects in the erythrocyte membrane was the research theme of the "Role of the human erythrocyte membrane skeleton in the pathogenesis of haemolytic anaemia caused by genetic defects" CNCSIS grant no. 560/2007. As project director I coordinated the research carried out during the 2007-2008 period, exhibiting the managerial skills required for conducting integrated fundamental and applied scientific research. This line of research was complemented by diagnostic analysis of 31 other cases during 2012-2017. In the research we have proposed a new method for the diagnosis of congenital anaemia caused by cytoskeleton defects, involving several steps:

1. Obtaining of erythrocyte membranes (erythrocyte ghosts);
2. Quantification of erythrocyte membrane proteins;
3. Electrophoresis of polyacrylamide gel proteins under denaturing conditions (SDS-PAGE);
4. Video-densitometry measurements and data interpretation;
5. Determination of erythrocyte morphology via optical and electronic microscopy
6. Spectrin extraction and concentration in non-denaturing conditions
7. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of spectrin in under non-denaturing conditions;
8. Videodensitometry and interpretation of the results obtained.

These studies put forward at national level in 2007 had a major impact in the dissemination of knowledge as we were the first in the field to adapt new methods employed in EU laboratories. Our research has complemented existing diagnostic methods, assessing the quantitative and qualitative

changes occurring in the erythrocyte membrane cytoskeleton. Establishing the molecular mechanisms of these processes made possible the identification of the structural proteins involved and highlighting of structure changes in the proteins involved. Detailed information is presented extensively in my „Proteins of the red cell membrane” monograph (Iuliu Hațieganu Medical University, Cluj-Napoca, 2005).

Another research topic in the field of molecular biology has addressed sexually transmitted diseases, denoting high-risk sexual behaviours that can often be associated with more serious conditions such as Human Immunodeficiency Virus (HIV) or Human Papilloma Virus (HPV) infections. Controlling sexually transmitted diseases can significantly reduce the incidence of these infections in early stages. About 80% of the new cases of cervical cancer are presently diagnosed in early stages and effectively treated in developed countries. However, Romania has not implemented a monitoring system in this area, although a higher STD prevalence in economically less developed countries is well documented.

Following the setting up of the Molecular Biology Laboratory as part of the Forensic Complementary Investigations' Laboratory within the Cluj County Legal Medicine Institute I have promoted paternity testing protocols based on DNA typing of HLA alleles, a method holding a far superior probative value compared to classical serology tests, as well as molecular identification protocols for the presence of chromosome Y. A few years ago such analyzes were performed but at the National Institute of Legal Medicine in Bucharest, recently DNA testing being introduced in Iași or Timișoara's Legal Medicine Institutes. However, DNA testing is now well established as the forensic practice of choice in Cluj, our laboratory's expertises being admitted as evidence in court in both civil and criminal cases.

Other research lines developed after the PhD defence have materialized in various research projects to which I have contributed as a team member or partner.

Professionally, since 2009 I have coordinated teaching and research activities as Head of the Cell and Molecular Biology Discipline within the Faculty of Medicine's Department of Molecular Sciences. In 2010 I set up the Molecular Biology Laboratory as part of the Forensic Complementary Investigations' Laboratory within the Cluj County Legal Medicine Institute. Since 2013 I coordinate laboratory activities as Head of the Complementary Exploration Laboratory also including the Toxicology, Histology and Serology laboratories.

Didactic activities included lectures and practical works of Cell and Molecular Biology for the Medicine and Dentistry 1st year students (Romanian and French teaching lines). I have coordinated the Laboratory Medicine internships stages of resident physicians in Molecular Biology (2009-present) and Microbiology (since 2017). As director of the interdisciplinary master program "Advanced Studies in Forensic Investigation and Legal Medicine", since 2013 I have coordinated program activities, while also lecturing on molecular biology applications in legal medicine for 1st and

2nd year students. I have coordinated 18 bachelor thesis and 8 master dissertation papers, as well as two 3-month research internships of foreign PhD students benefiting of the Eugen Ionesco scholarship program run by the Francophone University Agency, the later materialised in the publication of three ISI articles (two in 2013 and one in 2015).

Scientifically, my research activities resulted in the publication of 33 scientific papers in ISI-quoted journals visible on the Web of Science Core Collection (of which 14 as first author), 13 of those published after my last promotion, as well as 9 full text papers in BDI journals (6 as main author) and 3 papers in the volumes of ISBN/ISSN scientific events. These results were communicated as oral or poster presentations in 21 scientific events (including 14 ISBN/ISSN conferences and 5 ISI Proceedings) organized abroad, 6 international and 35 national congresses/symposiums. They are reflected on the ISI Thomson platform (accessed on 15.12.2017) by the following figures: 166 citations in 76 papers (average 5.03), Hirsch index 9.

My academic career development plans aim to continue the activities already described, while also addressing new topics in fundamental and applied research in the fields of molecular biology, such as: development of new molecular analysis protocols for the sequencing of genes involved in microcytic anaemia, *in vivo* studies on the molecular interaction of different drugs and certain cellular organelles, or correlation of HLA typing with various pathologies. Provided adequate funding is available, I want to introduce the DNA sequencing method, currently the most advanced molecular method employed in forensic medicine.

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TEZĂ DE ABILITARE

Cercetări de biologie moleculară cu aplicații în medicină

CONF. DR. HOREA-VLADI MATEI

Rezumat

Teza de abilitare „Cercetări de biologie moleculară cu aplicații în medicină” reflectă principalele repere ale activității mele științifice, profesionale și academice derulate după susținerea tezei de doctorat cu tema „Canale pentru apă din membrana eritrocitară”, recompensată cu „Premiul pentru cea mai bună teză de doctorat” acordat de către Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” în decembrie 2003, o direcție de cercetare continuată până în 2009 și materializată prin publicarea în calitate de co-autor a diferitor studii de permeabilitate pentru apă a eritrocitelor în cazul unor pacienți cu diferite patologii, respectiv pentru diverse specii animale.

Principalele direcții de cercetare fundamentală cu aplicabilitate clinică în care am avut contribuții personale sunt:

- Elaborarea unor metode de analiză la nivel molecular în vederea stabilirii diagnosticului diferențial al anemiilor microcitare prin defect de citoschelet;
- Studii la nivel molecular în vederea stabilirii diagnosticului infecției (cu unii agenți patogeni, cu HPV) în bolile cu transmitere sexuală;
- Studii la nivel molecular în vederea stabilirii filiației, cu aplicație directă în expertiză medico-legală.

Cercetările efectuate în vederea stabilirii diagnosticului molecular diferențial al anemiilor congenitale cu defect de citoschelet membranar eritrocitar au constituit tema de cercetare a grantului „Rolul scheletului membranei eritrocitare umane în patogeneza anemiilor hemolitice prin defect genetic” (Cod CNCISIS 560/2007). În calitate de director de proiect am coordonat cercetările derulate în perioada 2007-2008, probând deprinderea unor capacități manageriale și a unor abilități necesare pentru desfășurarea unor cercetări integrate în cercetarea științifică fundamentală și aplicată. Această linie de cercetare a fost completată cu analiza diagnostică a altor 31 de cazuri în perioada 2012-2017. În cadrul cercetărilor desfășurate am propus o nouă metodă pentru diagnosticarea anemiilor congenitale prin defect de citoschelet, presupunând parcurgerea a opt etape:

1. obținerea membranelor eritrocitare (fantomă eritrocitare);
2. cuantificarea proteinelor membranare eritrocitare;
3. electroforeza proteinelor în gel de poliacrilamidă în condiții denaturante (SDS-PAGE);
4. videodensitometrarea și interpretarea rezultatelor obținute;
5. stabilirea morfologiei eritrocitelor prin microscopie optică și electronică
6. extracția spectrinei și concentrarea ei în condiții nendenaturante
7. electroforeza spectrinei în gel de poliacrilamidă în condiții nendenaturante (PAGE);
8. videodensitometrarea și interpretarea rezultatelor obținute.

Aceste determinări propuse în premieră la nivel național în anul 2007 au adus un aport semnificativ la diversificarea cunoașterii în domeniu, prin adaptarea unor metode utilizate în laboratoarele din Uniunea Europeană. Cercetarea a completat metodele de diagnostic, edificând modificările cantitative și calitative ce apar la nivelul citoscheletului membranelor eritrocitare. Diagnosticul diferențial prin stabilirea mecanismelor moleculare implicate a permis identificarea unor proteine structurale implicate, respectiv a modificărilor de structură apărute în cazul unor proteine. Informații detaliate sunt expuse pe larg în monografia *Proteine din membrana eritrocitară*, Horea Matei (Ed. Medicală Univ. „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, 2005).

O altă temă de cercetare în domeniul biologiei moleculare a vizat bolile cu transmitere sexuală, denotând un comportament sexual de mare risc ce adesea poate fi asociat cu infecții mai grave cum ar fi cele cu virusul imunodeficienței umane (HIV) sau cu Human Papilloma Virus (HPV). Controlul bolilor cu transmitere sexuală poate reduce semnificativ incidența acestor infecții în stadii incipiente. În prezent, aproximativ 80% dintre noile cazuri de cancer de col uterin sunt diagnosticate în faze incipiente și tratate eficient în țările dezvoltate. România nu are implementat un sistem de monitorizare în acest domeniu, deși este documentat faptul că BTS-urile au o prevalență mai mare în țări cu un nivel scăzut de dezvoltare economică.

După integrarea în cadrul Institutului de Medicină Legală din Cluj-Napoca și înființarea Compartimentului de Biologie Moleculară în cadrul Laboratorului de Explorări Complementare al IML Cluj am promovat efectuarea testelor de paternitate prin tiparea HLA a ADN-ului, cu o valoare probatorie mult superioară testelor de serologie clasică, precum și tehnica de analiză moleculară pentru identificarea prezenței cromosomului Y. Aceste analize, care anterior erau realizate doar la INML București, doar în ultimii ani fiind dezvoltate și la Iași sau Timișoara, au intrat în practica medico-legală curentă a IML Cluj, fiind recunoscute ca probe în justiție – atât în cazurile civile, cât și în cele penale. Ca deziderat îmi doresc introducerea metodei secvențierii ADN, care constă în stabilirea profilelor ADN și determinarea markerilor ADN specifici, în prezent cea mai performantă metodă moleculară în practica de expertiză medico-legală.

Alte linii de cercetare derulate după susținerea tezei de doctorat s-au materializat în diferite proiecte de cercetare la care mi-am adus contribuția în calitate de membru al unor echipe sau partener responsabil.

Pe plan profesional, începând din 2009 am coordonat activitățile didactice și de cercetare în calitate de șef al Disciplinei de Biologie Celulară și Moleculară, Departamentul 3 – Științe Moleculare din cadrul Facultății de Medicină. Din anul 2010, integrat ca medic primar în Medicină de Laborator în cadrul Institutului de Medicină Legală Cluj, am înființat Compartimentul de Biologie Moleculară în cadrul Laboratorului de Explorări Complementare al IML Cluj. Din anul 2013 sunt șeful Laboratorului de Explorări Complementare al IML Cluj, coordonând activitatea laboratoarelor de Toxicologie, Histologie și Serologie.

În cadrul activităților didactice am predat cursuri și am susținut lucrări practice la disciplina Biologie Celulară și Moleculară pentru studenții de la Facultățile de Medicină și Medicină Dentară (liniile de predare română și franceză). Am coordonat stagiile de Biologie Moleculară ale rezidenților în specialitatea Medicină de Laborator (2009-prezent), și din acest an și stagiile rezidenților în specialitatea Microbiologie. Din 2013 am coordonat în calitate de director un program de masterat interdisciplinar cu 120 de credite ECTS, „Cercetări Avansate în Investigația Criminalistică și în Medicina Legală”, la care susțin cursuri de biologia moleculară aplicată în medicina legală cu studenții anului I și II, Am desfășurat activități de tutoriat din anul universitar 2012-2013 și până în prezent. Am coordonat 18 lucrări de licență, 8 lucrări de dizertație și două stagii de cercetare a câte 3 luni efectuate de doctoranzi străini veniți prin programul de burse „Eugen Ionesco” derulat de Agenția Universitară a Francofoniei, finalizate prin publicarea a trei articole ISI (două în 2013 și unul în 2015) împreună cu doctoranzii respectivi.

Pe plan științific, rezultatele cercetărilor au fost valorificate prin publicarea a 33 lucrări științifice în reviste cotate ISI evidențiate în Web of Science Core Collection, din care 14 în calitate de autor principal (13 fiind publicate după ultima promovare), a 9 articole în reviste BDI (6 în calitate de autor principal) și alte 3 articole în volumele unor manifestări științifice cu ISBN/ISSN. Aceste rezultate au fost comunicate sub forma unor prezentări orale sau poster la 21 de manifestări științifice organizate în străinătate (între care 14 cu ISBN/ISSN și 5 ISI Proceedings), 6 congrese și simpozioane internaționale organizate în țară și 35 de manifestări științifice naționale cu participare internațională.

Aceste rezultate sunt reflectate pe platforma ISI Thomson (site accesat în data de 15.12.2017) de următoarele cifre: 166 citări în 76 articole (medie 5,03), indice Hirsch 9.

Planurile mele de dezvoltare a carierei universitare, în plan științific și didactic, urmăresc atât continuarea desfășurării activităților pe direcțiile de cercetare descrise, cât și pe noi direcții de cercetare fundamentală și aplicată în domeniile Biologiei moleculare, cum ar fi elaborarea unor noi metode de analiză moleculară pentru secvențarea genelor implicate în anemiile microcitare, studii *in vivo* (pe animale de experiență) pentru elucidarea interacțiunii la nivel molecular între diferite medicamente și anumite organite celulare, corelarea tipării HLA cu diferite patologii, respectiv introducerea metodei secvențierii ADN constând în stabilirea profilelor ADN și determinarea markerilor ADN specifici, în prezent cea mai performantă metodă moleculară uzitată în practica de expertiză medico-legală.