
SUMMARY OF THE PhD THESIS

The emerging role of exosomes in malignant tumors

PhD Student Maria-Ancuța Jurj

PhD Coordinator Prof.dr. Ioana Neagoe



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENT

INTRODUCTION	21
STATE OF THE ART	
1. Chronic lymphocytic leukemia – from origin to therapy	27
1.1. Cancer	27
1.2. Metastasis and tumor microenvironment	28
1.3. Chronic lymphocytic leukemia	29
1.4. Treatment components	31
1.4.1. Single agents	31
1.4.1.1. Cytostatic agents	31
1.4.1.2. Monoclonal antibodies (anti-CD20 antibodies)	32
1.4.1.3. B-cell receptor signaling pathways targeted by therapeutic agents	32
1.4.1.4. BCL-2 inhibitors	33
1.4.1.5. Combination chemotherapy	33
2. Drug resistance in CLL	34
2.1. TP53 aberrations and drug resistance	34
2.2. BCL2 family of proteins	34
2.3. Multidrug resistance (MDR)	35
3. Exosomes	37
3.1. Morphology	38
3.2. Biogenesis	38
3.3. Molecular composition of exosomes	40
3.4. Exosomes uptake and functions	42
3.4.1. Tumorigenesis	44
3.4.2. Tumor growth	44
3.4.3. Angiogenesis	45
3.4.4. Drug resistance	46
3.4.5. Tumor immune escape	46
3.4.6. Metastasis	47
3.5. Exosomes as cancer biomarkers	50
3.6. Exosomes as cancer therapeutic targets	51
4. miRNA delivery systems	54

4.1. Biogenesis of miRNA	54
4.2. miRNAs as therapeutic agents	55
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis/Objectives	61
2. General methodology	63
3. Study 1 – The effect of Fludarabine plus Rituximab in chronic lymphocytic leukemia	67
3.1. Content of the study	67
3.2. Working hypothesis and objectives	68
3.3. Materials and methods	68
3.4. Results	71
3.5. Discussions	83
3.6. Conclusions	86
4. Study 2. Exosomes derived from CLL cells: isolation and characterization	87
4.1. Context of study	87
4.2. Working hypothesis and objectives	88
4.3. Materials and methods	88
4.4. Results	92
4.5. Discussions	90
4.6. Conclusions	102
5. Study 3. CLL derived exosomes and their specific RNA/microRNA cargos are potential novel biomarkers in chronic lymphocytic leukemia	103
5.1. Content of the study	103
5.2. Working hypothesis and objectives	104
5.3. Materials and methods	104
5.4. Results	107
5.5. Discussions	121
5.6. Conclusions	124
6. Study 4. microRNA signature involved in evolution of CLL into Richter Syndrome	125
6.1. Content of the study	125
6.2. Working hypothesis and objectives	126
6.3. Materials and methods	126
6.4. Results	128
6.5. Discussions	133
6.6. Conclusions	135

7. General discussion	137
8. General conclusion	139
9. Originality and innovative contributions of the thesis	141
REFERENCES	143
ANEXE	

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, drug resistance, exosomes, RNA/microRNAs signature, Richter syndrome.

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia is the most common leukemia in adults with a high incidence in men. This pathology is characterized through the expression of CD5+/CD19+/CD23+ B cells in blood, marrow and lymph nodes (1). In the past decades, all the knowledge about genetic and molecular biology of CLL has led to discovery of markers correlated with risk of progression and survival, providing more information about prognostic and therapy. Hence, new drugs approved for CLL therapy are designed to modify the management of leukemia and to enhance the clinical outcomes for patients (2).

Standard therapy for CLL patients is based on the administration of individual or combined therapy (chemotherapy in association with antibodies). Meanwhile, therapeutic efficacy was increased by combining chemotherapies with different mechanism of actions with therapeutic antibodies, including Rituximab and Alemtuzumab. Hence, preliminary studies have shown that Fludarabine in combination with Rituximab present a higher complete response rates and progression-free survival (3).

A major challenge for cancer therapy remains drug resistance. There are some studies which observed that exosomes are involved in the modulation of chemosensitivity through transferring the resistance phenotype to recipient cells. Nucleic acids (DNA, mRNA, microRNA) transported through exosomes, supposed to be an effective way for promoting drug resistance in cancer cells. Also, acid microenvironment of the tumor-host interface may increase the exosomes production which can transport the resistance phenotype to sensitive tumor cells by modifying the expression of relevant genes involved in different biological processes, including apoptosis, cell cycle, proliferation, migration and metastasis (4).

The slow evolution of exosomes toward the clinic is justified by their complex modulatory roles. Thus, the exosome content is specific to the donor cell and can vary according to the physiological and pathological condition of that cell. Exosomes cargo include genetic information, in the form of DNA fragments, RNA, miRNA, small RNA species, free fatty acids, surface receptors and proteins. Exosomes are considered

important mediators of cellular communication being involved in normal physiological processes, development and progression of cancer (5). Exosomes derived from tumor cells contain specific tumor microRNAs (miRNAs) which are ideal marker for tumor diagnosis. In this context, exosomal – derived miRNAs can be used as diagnostic and prognostic markers for leukemia. miRNAs content released from exosomes are involved and affect signaling pathway in cell malignanization (6).

The present thesis presents an approach on exosomes as prognostics and diagnostics tools, where these nanovesicles are actually used as specific biomarkers due to their numerous bioactive molecules. Also, we offer an insights overview into the modulatory roles of controversial exosomes in order to highlight the importance of the therapeutic strategies in hematological malignancies. Also, the exosomal miRNAs highlight the importance of the molecular profiling, which we examined and discover relevance clues according to new strategies used to improved clinical outcome of the patients.

STATE OF THE ART

The first part of the thesis is based on a comprehensive understanding about the epidemiology and pathophysiology of the chronic lymphocytic leukemia and the gold standard therapy for this pathology. Also, the new field regarding exosomes is presented into a detail manner comprising their role in modulating extensive signaling pathways within the cell. The second part of the thesis is represented by the state of the art which is divided into four chapters that have a chronological orientation. The first chapter (Chronic lymphocytic leukemia – from origin to therapy) presents the important aspects regarding to epidemiology of the selected disease and also the standard therapy from the beginning up to the most newest therapeutic agents; the second chapter (Drug resistance in chronic lymphocytic leukemia) shows the most relevant genes responsible to activate drug resistance mechanisms; the third chapter (Exosomes) exhibits a comprehensive approach about exosomes biogenesis and their functionality in sustaining the carcinogenesis process and chapter four (miRNA delivery systems) highlighte the miRNA biogenesis and the main therapeutic strategies.

PERSONAL CONTRIBUTION

The present thesis is divided in four main studies that all together have the objective of identifying new potential biomarkers based on exosomes and exosomal miRNA with relevant therapeutic roles in hematological malignancies.

Study 1 – The effect of Fludarabine plus Rituximab in chronic lymphocytic leukemia

In CLL pathology, Fludarabine and Rituximab regimen (FR) is considered the gold standard. This therapy is intensively used in treatment of CLL patients in first-line therapy and after relaps. According to their mechanism of action, Fludarabine and Rituximab act differently in *in vitro* and *in vivo* studies. Hence, it is important to provide more information about the biological processes involved in CLL pathology, to develop new biomarkers and therapeutic agents for this disease.

The aim of this study was to evaluate the effect of Fludarabine and Rituximab on cell proliferation, apoptosis and gene expression pattern in two chronic lymphocytic leukemia cell lines, Hs505.T and MEC-1, in order to identify new therapeutic agents to counteract the chemoresistance mechanisms.

This study includes the identification of specific signaling pathways of programmed cell death in leukemia cells after Fludarabine and Rituximab treatment at 48 hours post-therapy using qRT-PCR technique. First, we assessed the cellular viability and the effect of pro-apoptotic and anti-proliferative potential of Fludarabine and Rituximab on chronic lymphocytic leukemia cell lines, Hs505.T and MEC-1. The obtained results showed that the apoptotic processes are promoted 48 hours post-therapy through the appearance of specific morphological traits and also the inhibition of the cellular progression rate. Going further, cellular and molecular processes were assessed through qRT-PCR technique. Using specialized bioinformatics programs, the differential gene expression levels are integrated in order to evaluate the biological relevance and the possibility to develop new therapeutic targets in the future.

Gene expression can be a useful prognostic indicator for patients with CLL offering information about gene level alterations in this pathology. Several genes have been shown to be involved in biological processes in CLL, including cell death, cell cycle, and drug resistance. The molecular mechanisms responsible for cell death regulation in CLL are complex. Thus, a different behavior was observed between the two cell lines which present a specific response to therapy. Regarding to Hs505.T cell line, relative gene expression levels of *BCL-2*, *BAK*, *MCL-1*, *FAS* and *CCND1* are downregulated in the case of individual therapy, meanwhile the combined therapy exhibits a slightly tendency of overexpression. For MEC-1 cell line, relative gene expression level of all genes exhibits an increased profile in individual and combined therapy. We can assume that apoptotic processes are inhibited by promoting tumor growth and drug resistance mechanism are activated. Response to therapy is strongly correlated with cellular phenotype which might be an important step in developing new therapeutic agents for CLL.

Study 2. Exosomes derived from CLL cells: isolation and characterization

Recently, exosomes gained a lot of attention in research field due to their specific cargo and transport capacity, making them useful as delivery systems. Tumor-derived exosomes can facilitate modification of the recipient cell's phenotype by releasing their cargo inside the targeted cells. Through cell-to-cell communication, exosomes are involved in several biological processes including tumor growth, angiogenesis, drug resistance, tumorigenesis and metastasis. Hence, exosomes might be responsible for tumor progression, induced drug resistance and metastasis.

In this study, we intended to investigate the specific protein signature of CLL-derived exosomes and to determine their ability for being ideal delivery systems.

The study objectives include the isolation of CLL-derived exosomes from cell culture media via ultracentrifugation method. The exosomes are isolated from two CLL cell lines, Hs505.T and MEC-1, which were previously treated with 10 nM Fludarabine, 1 μ M Rituximab, 10 nM Fludarabine in combination with 1 μ M Rituximab. Exosomes are collected at 48- and 96-hours post-therapy. After ultracentrifugation step, exosomes are characterized through two different methods, NanoSight and Transmission Electron Microscopy (TEM). Both methods provide information about particle-size distribution of each particles and their cup-shape morphology. In addition, we analyze their proteomic content through LC-MS/MS in order to provide a comprehensive understanding of their protein content which may help improve CLL diagnosis and therapy. We identified several exosome-marker proteins, including fusion proteins, chaperones, cytoskeletal proteins, tetraspanins, histone, proteins that are involved in cell adhesion, activation, proliferation, migration, angiogenesis, tumor growth and metastasis. Further we investigate the capacity of exosomes to act as delivery systems and their internalization by targeted cells. Once the exosomes reach the recipient cells, they release inside their specific cargo and influence the pathological status of the targeted cell. Moreover, exosomes are intelligent delivery systems and they can be used for delivering different therapeutic agents or transcripts to a specific site. Specific targeting to a certain tumor site must be thoroughly investigated in the future.

Study 3. CLL derived exosome and their specific RNA/microRNA cargos are potential novel biomarkers in chronic lymphocytic leukemia

A major challenge for cancer therapy remains drug resistance. There are some studies which observed that exosomes are involved in the modulation of chemosensitivity through transferring the resistance phenotype to recipient cells. Nucleic acids transported through exosomes, supposed to be an effective way for promoting drug resistance in cancer cells. Also, acid microenvironment of the tumor-host interface may increase the exosomes production, which can transport the

resistance phenotype to sensitive tumor cells by modifying the control of cell cycle and promoting antiapoptosis program.

In this study, we intended to evaluate the miRNA and gene expression profile of CLL-derived exosomes from targeted cells, and to evaluate the mechanism of drug resistance in this pathology.

The present study includes the CLL derived exosomes isolation from conditioning cell culture media after treatment with Fludarabine, Rituximab and Fludarabine in combination with Rituximab at 48- and 96-hours post-therapy. After isolation, we evaluated the miRNAs expression profile and gene expression profile after treatment using microarray and RT-PCR in order to identify alterations related to drug resistance. Our findings suggest that mRNA and miRNA can be considered efficient for diagnosis and therapy response of patients with CLL disease. Moreover, we were able to emphasize the activation of some compensatory mechanisms correlated to drug resistance and apoptotic processes. Thus, through modulation of *BCL2* gene family and ABC transporters the outcomes can be improved in order to prolong the overall survival of CLL patients. CLL derived exosomes containing specific miRNA signature involved in activation of resistance mechanism through multi-gene targeting. To regulate or to inhibit a certain molecular mechanism, further experiments are needed to achieve a better understanding about the multiple pathways which are activated during treatment. This can be representative starting point for a novel multitarget molecular therapy. Regarding to these results, we observed a strongly upregulation of relevant genes involved in apoptotic processes and drug resistance in the case of combined therapy. According to cellular phenotype, we assumed that combined therapy activates drug resistance mechanisms and inhibit apoptotic processes. This aspect may be responsible for the evolution of chronic lymphocytic leukemia into an aggressive form, like Richter syndrome.

Processes like apoptosis, cell proliferation, cell differentiation, drug resistance and metastasis raise many questions according to the onset and development of the disease. Drug resistance represents an important mechanism which leads to a poor survival of patient. According to CLL cell lines phenotype, combined therapy tested here exhibited a stimulation of resistance to therapy through the activations of some specific genes involved in this mechanism in MEC 1 cell lines. We can conclude that the cellular phenotype plays an important role in response to therapy suggesting a personalized medicine is needed for each patient, which will have an enormous impact on quality of life and an improved survival rate for each chronic lymphocytic leukemia patient.

Study 4. microRNA signature involved in the evolution of CLL into Richter Syndrome

It has been previously proven that dysregulation of miRNAs could be linked to clinical evolution and therapy response of CLL patients. Also, synthesis and regulation of various miRNA species is linked to the initiation of B cells and B-cell receptors (BCR). In addition, extracellular vesicles containing miRNAs are one of the newly described biomarker transporters that regulate the physiology and function of CLL cells. Subsequently, miRNAs transported by extracellular vesicles derived from CLL cell membrane could be used as potential biomarkers for CLL prognostics (7).

In this study, we aimed to investigate the potential role of microRNAs as biomarkers for the development of an 'accelerated phase' of chronic lymphocytic leukemia, refractory to all lines of conventional chemotherapy.

Here we evaluated the effect of miR-19b mimic and inhibitor on CLL cells in order to reveal its action on cell proliferation and invasion. miR-19b inhibitor presented the potential to reduce the number of viable cells. Therefore, miR-19b mimic increased cell proliferation rate and invasion progression which represent a critical factor in cancer progression and metastasis. Going further, we assessed gene and protein expression profile after transfection using qRT-PCR and Western Blotting in order to evaluate the alteration occurring in *TP53* and *MKI67* genes. As a final goal of the study, we investigated the effect of Obinutuzumab in CLL aggressive forms and its correlation with miR-19b. Our findings reveal that the relative miRNA expression level is inhibited by Obinutuzumab in both cell lines. Thus, we assumed that miR-19b could be a potential biomarker in prognostic and diagnostic of CLL patients. Therapy with Obinutuzumab might improve the clinical outcome and the may be a potential therapeutic agent in the treatment of aggressive form of CLL.

General conclusions and novelty

Discovery of tumor-derived exosomes in the last decades have revolutionized the medical field. There is no doubt that these exosomes have a significant function in tumor cells providing information about parental cells and their implications in altering the recipient cells phenotype. In our study we have found specific bioactive molecules related to chronic lymphocytic leukemia inside exosomes. Moreover, these studies have showed the links between tumor-derived exosomes and malignant transformation highlighting the possibility of using exosomes as a source for novel therapeutically approaches.

The originality and innovative features of this thesis are given by its contribution to the characterization of tumor-derived exosomes in order to highlight their specific content related to malignant transformation. Using microarray technologie we were able to observe important keys factors involved in CLL pathology, like alterations in specific genes and miRNAs. We have identified a panel of relative genes responsible for malignant transformation, respectively a panel of miRNAs related to drug resistance post-therapy. Thus, we can affirm that exosomes are

important pieces in hematological malignancies pictures' puzzle, being involved in tumor growth, tumorigenesis, tumor immune escape, drug resistance and metastasis.

Also, in study 4 we report for the first time the relevance of miR-19b in CLL. miR-19b might have the potential to provide information about the progression of CLL and Obinutuzumab might have the ability to inhibit the progression of CLL into Richter syndrome. For better clinical outcomes, new knowledge in this field is needed in order to develop a personalized therapy in hematological malignancies.

SELECTIVE REFERENCES

1. Hus I, Rolinski J. Current concepts in diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Contemporary oncology*. 2015;19(5):361-7.
2. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2000;343(24):1750-7.
3. Byrd JC, Rai K, Peterson BL, Appelbaum FR, Morrison VA, Kolitz JE, et al. Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011. *Blood*. 2005;105(1):49-53.
4. Chen WX, Liu XM, Lv MM, Chen L, Zhao JH, Zhong SL, et al. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PloS one*. 2014;9(4): e95240.
5. Hannafon BN, Ding WQ. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(7):14240-69.
6. Zhao L, Yu J, Wang J, Li H, Che J, Cao B. Isolation and Identification of miRNAs in exosomes derived from serum of colon cancer patients. *Journal of Cancer*. 2017;8(7):1145-52.
7. Negrini M, Cutrona G, Bassi C, Fabris S, Zagatti B, Colombo M, et al. microRNAome expression in chronic lymphocytic leukemia: comparison with normal B-cell subsets and correlations with prognostic and clinical parameters. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(15):4141-53.

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Rolul exozomilor în tumorile maligne

Doctorand Maria-Ancuța Jurj

Conducător de doctorat Prof.dr. Ioana Neagoe



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	21
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Leucemia limfocitară cronică – de la origine la terapie	27
1.1. Cancerul	27
1.2. Metastazare și micromediul tumoral	28
1.3. Leucemia limfocitară cronică	29
1.4. Compuși terapeutici	31
1.4.1. Agenți individuali	31
1.4.1.1. Agenți citostatici	31
1.4.1.2. Anticorpi monoclonali (anticorpul anti-CD20)	32
1.4.1.3. Agenți terapeutici care țințesc calea de semnalizare a receptorului B-cell	32
1.4.1.4. Inhibitori de BCL-2	33
1.4.1.5. Chimioterapia combinată	33
2. Rezistența la terapie în LLC	34
2.1. Modificările genei TP53 și rezistența la terapie	34
2.2. Proteinele familiei BCL2	34
2.3. Rezistența la multiterapie	35
3. Exozomii	37
3.1. Morfologie	38
3.2. Biogeneză	38
3.3. Compoziția moleculară a exozomilor	40
3.4. Internalizarea și funcțiile exozomiilor	42
3.4.1. Tumorigeneza	44
3.4.2. Creșterea tumorală	44
3.4.3. Angiogeneza	45
3.4.4. Rezistența la terapie	46
3.4.5. Evadare imună tumorală	46
3.4.6. Metastazare	47
3.5. Exozomii ca și biomarkeri tumorali	50
3.6. Exozomii ca și ținte terapeutice tumorale	51
4. miARN – sisteme țintă	54
4.1. Biogeneză miARN-ului	54

4.2. miARN-urile ca și agenți terapeutici	55
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/Obiective	61
2. Metodologia generală	63
3. Studiul 1 – Efectul combinat al Fludarabinei cu Rituximab în Leucemia limfocitară cronică	67
3.1. Conținutul studiului	67
3.2. Ipoteza de lucru și obiectivele	68
3.3. Materiale și metode	68
3.4. Rezultate	71
3.5. Discuții	83
3.6. Concluzii	86
4. Studiul 2. Izolarea și caracterizarea exozomiilor secretați de celulele de Leucemie limfocitară cronică	87
4.1. Conținutul studiului	87
4.2. Ipoteza de lucru și obiectivele	88
4.3. Materiale și metode	88
4.4. Rezultate	92
4.5. Discuții	90
4.6. Concluzii	102
5. Studiul 3. Exozomii izolați din celulele de LLC și conținutului lor specific de ARN/microARN ca noi biomarkeri in Leucemia limfocitară cronică	103
5.1. Conținutul studiului	103
5.2. Ipoteza de lucru și obiectivele	104
5.3. Materiale și metode	104
5.4. Rezultate	107
5.5. Discuții	121
5.6. Concluzii	124
6. Studiul 4. Profilul miARN implicat în evoluția leucemiei limfocitare cronice înspre sindromul Richter	125
6.1. Conținutul studiului	125
6.2. Ipoteza de lucru și obiective	126
6.3. Materiale și metode	126
6.4. Rezultate	128
6.5. Discuții	133
6.6. Concluzii	135
7. Discuții generale	137

8. Concluzii generale	139
9. Originalitatea și contribuția inovativă a tezei de doctorat	141
BIBLIOGRAFIE	143
ANEXE	

Cuvinte cheie: leucemie limfocitară cronică, rezistența la terapie, exozomi, semnătura mARN/miARN, sindrom Richter

INTRODUCERE

Leucemia limfocitară cronică (LLC) este cea mai frecventă formă de leucemie întâlnită la adulți, care prezintă o incidență ridicată la persoanele de gen masculin. Această patologie este caracterizată prin exprimarea pozitivă a markerilor CD5/CD19/CD23 prezenți pe suprafața celulelor B mature aflate în sânge, măduva osoasă, ganglioni limfatici (1). În ultimii ani, cunoștințele referitoare la biologia moleculară și genetică a leucemiei limfocitare cronice au condus la dezvoltarea de noi biomarkeri cu potențial rol terapeutic și prognostic. Prin urmare, compușii terapeutici aprobați pentru tratamentul persoanelor cu LLC sunt special dezvoltați în vederea îmbunătățirii rezultatelor clinice, precum și a ratei de supraviețuire.

Terapia standard pentru pacienții diagnosticați cu LLC se bazează pe administrarea individuală sau combinată a compușilor terapeutici. Între timp, eficacitatea terapeutică a fost îmbunătățită prin combinarea chimioterapiilor cu diferite mecanisme de acțiune cu anticorpi monoclonali (Rituximab sau Alemtuzumab). Studiile preliminare au arătat că Fludarabina în combinație cu Rituximab prezintă o rată ridicată a răspunsului la terapie, precum și ameliorarea ratei de supraviețuire.

O provocare majoră în cea ce privește terapia cancerului, rămâne rezistența la tratament. Există studii care au arătat că exozomii sunt implicați direct în modularea chemosensibilității prin activarea mecanismului de rezistență la nivelul celulelor țintă. Acizii nucleici (ADN, mARN, microARN) conținuți și transportați prin intermediul exozomilor, reprezintă o modalitate eficientă de inducere a rezistenței la terapie în celulele canceroase. Exozomii eliberați de către celulele rezistente la terapie determină inducerea mecanismului de rezistență la celulele tumorale sensibile prin alterarea nivelului de expresie a genelor implicate în diferite procese biologice, precum apoptoză, ciclul celular, proliferare, migrare, metastazare (7).

Implicarea exozomilor în studiul clinic este datorată rolului important pe care îl joacă în modularea diferitelor procese biologice. Astfel, conținutul exozomilor este specific fiecărei celule donatoare care variază în funcție de starea fiziologică și patologică. Datorită conținutului special (fragmente de ADN, mRNA, microARN, siARN, acizi grași liberi, receptori de suprafață și proteine) exozomii sunt considerați mediatori importanți ai comunicării celulare fiind implicați în procesele fiziologice normale, în dezvoltarea și progresia celulelor tumorale (8). În cea ce privește exozomii eliberați de către celulele tumorale, s-a observat în conținutul lor prezența microARN-urilor specific tumorale care îi fac markeri ideali pentru diagnosticul tumoral.

Prezenta teză de doctorat aduce în prim plan o abordare relevantă în cea ce privește rolul exozomilor ca potențiali biomarkeri în prognostic și diagnostic. De asemenea, s-a evidențiat rolul controversat al exozomilor ca și modulatori ai diferitelor procese biologice care stau la baza strategiilor terapeutice în malignitățile hematologice. Pe de altă parte, microARN-urile reliefează importanța profilului molecular și celular al acestei patologii în vederea îmbunătățirii rezultatelor clinice ale pacienților.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Stadiul actual al cunoașterii se bazează pe punerea în evidență a cunoștințelor prezentate în ultimele publicații, care aduc în prim plan importanța și funcția exozomilor în tumorile maligne. Astfel, în primul capitol (Leucemia limfocitară cronică) sunt prezentate noțiuni generale cu privire la epidemiologia leucemiei limfocitare cronice, terapia standard precum și impedimentul major care constă în activarea mecanismelor de rezistență la terapie, stimulând accelerarea procesului de metastazare și reducerea ratei de supraviețuire a pacienților diagnosticați cu această patologie hematologică. Capitolul al doilea (Rezistența la terapie în LLC) conține o prezentare a celor mai relevante gene responsabile pentru activarea mecanismelor de rezistență la terapie. În cel de-al treilea capitol (Exozomii) este evidențiat rolul important al exozomilor în modularea diferitelor procese biologice prin implicația secvențelor noncodificatoare, anume microARN-uri. Aplicabilitatea acestora în tumorile maligne cu potențial inovativ în prognosticul și diagnosticul patologiilor maligne este de interes. Prin urmare, terapiile țintite cu microARN prezintă o utilizare des întâlnită în domeniul oncologic în vederea dezvoltării de noi strategii terapeutice și de diagnostic în tumorile maligne (capitolul patru – Sisteme de transport – microARN-uri).

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Prezenta teză de doctorat este segmentată pe patru studii principale, care au ca obiectiv identificarea de noi biomarkeri cu potențial rol terapeutic în diagnostic și prognostic în malignitățile hematologice.

Studiul 1 - Efectul combinat al Fludarabinei cu Rituximab în leucemia limfocitară cronică

În LLC, regimul Fludarabină - Rituximab (FR) este considerat terapia standard pentru pacienții diagnosticați cu această patologie. Terapia FR este intens utilizată în tratamentul pacienților cu LLC în terapia de primă linie și după recidivă. În funcție de mecanismul de acțiune al acestora, Fludarabina și Rituximab acționează într-un mod diferit atât *in vitro* cât și *in vivo*. Pentru a dezvolta noi biomarkeri și agenți terapeutici, este importantă acumularea unor informații cuprinzătoare în ceea ce privește principalele procese biologice implicate în patologia LLC.

Acest studiu se bazează pe investigarea efectului antiproliferativ în urma terapiei cu Fludarabină și Rituximab pe cele două linii celulare de LLC. Astfel, sunt evidențiate informații relevante cu privire la alterarea principalelor procese biologice, precum proliferarea și migrarea celulară, apoptoza, cât și informații despre nivelul de expresie a principalelor gene implicate în modularea proceselor mai sus menționate. Se urmărește identificarea de noi agenți terapeutici care să contracareze mecanismele de rezistență la terapie.

Studiul debutează cu evaluarea viabilității celulare și a efectului pro-apoptotic și antiproliferativ al terapiei Fludarabină - Rituximab pe liniile celulare de LLC. Rezultatele obținute au arătat că procesele apoptotice sunt stimulate la 48 de ore post-terapie prin inhibarea ratei de proliferare celulară și apariția trăsăturilor morfologice specifice, precum fragmentarea nucleilor și alterarea filamentelor de actină. Pentru achiziționarea unor informații cuprinzătoare cu referire la procesele celulare și moleculare, a fost folosită tehnica qRT-PCR. Prin analiza bioinformatică al nivelului de expresie alterat a genelor implicate în principalele procese biologice, au fost integrate în vederea evaluării relevanței biologice și posibilitatea de a dezvolta în viitor noi ținte terapeutice.

Nivelul de expresie genică, subexprimat sau supraexprimat, poate fi un indicator relevant de prognostic pentru pacienții cu LLC. Mai multe gene s-au dovedit a fi profund implicate în modularea proceselor biologice, precum apoptoza, ciclul celular și rezistența la terapie. Mecanismele moleculare responsabile de controlul apoptozei în LLC sunt complexe. În urma terapiei cu cei doi compuși terapeutici, s-a observat un comportament diferit între ambele linii celulare care oferă informații despre modul de răspuns la terapie. În ceea ce privește linia celulară Hs505.T, nivelul de expresie a genelor *BCL-2*, *BAK*, *MCL-1*, *FAS* și *CCND1* este subexprimat în cazul terapiei

individuale, în timp ce terapia combinată indică tendința unui nivel supraexprimat. Pentru linia celulară MEC-1, nivelul de expresie a genelor studiate arată un profil crescut în terapia individuală și combinată. Astfel, se poate afirma că procesele apoptotice sunt inhibitate prin promovarea creșterii tumorale, iar mecanismele de rezistență la terapie sunt activate. Răspunsul la terapie este puternic corelat cu fenotipul celular care ar putea fi un pas important în dezvoltarea de noi agenți terapeutici pentru terapia patologiei LLC.

Studiul 2. Izolarea și caracterizarea exozomiilor derivați din celulele de leucemie limfocitară cronică

În ultimii ani, exozomii au câștigat o mare atenție în domeniul cercetării, datorită conținutului specific și a capacității lor de transport. Prin comunicarea celulă-celulă, exozomii sunt implicați în medierea diferitelor procese biologice, precum creșterea tumorală, angiogeneza, rezistența la terapie, tumorigeneza și metastazarea. Prin urmare, exozomii ar putea fi responsabili pentru progresia tumorii, inducerea rezistenței la terapie și a metastazării.

În acest studiu, am intenționat să investigăm conținutul de proteine specifice exozomilor derivați din liniile celulare de LLC, precum și evaluarea capacității exozomilor în vederea utilizării lor ca și sisteme ideale de transport.

Studiul se bazează pe izolarea exozomilor din mediul de cultură a liniilor celulare de LLC prin ultracentrifugare. Exozomii sunt izolați din cele două linii celulare de LLC, Hs505.T și MEC-1, care au fost tratate anterior cu Fludarabină 10 nM, Rituximab 1 pM, Fludarabină 10 nM în combinație cu 1 pM Rituximab. Mediul de cultură care conține exozomii secretați de celulele leucemice, este colectat la 48 și 96 de ore după terapie. După etapa de ultracentrifugare, exozomii sunt caracterizați prin două metode diferite, NanoSight și microscopia de transmisie electronică (TEM). Metodele oferă informații despre mărimea distribuției a fiecărei particule cât și despre morfologia sferică specifică exozomiilor. În plus, prin analiza proteomică folosind tehnica LC-MS/MS s-a detaliat conținutul specific de proteine care pot contribui la îmbunătățirea diagnosticului și a terapiei pentru LLC. S-au identificat mai multe proteine marker, precum proteine de fuziune, chaperone, proteine citoscheletale, tetraspanine, histone fiind implicate în adeziunea, activarea, proliferarea, migrarea, angiogeneza, creșterea tumorală și metastazarea celulelor canceroase. În consecință, am investigat capacitatea exozomilor de a acționa ca sisteme de transport și internalizarea acestora la nivelul celulelor țintă. După internalizarea exozomilor în celulele țintă, aceștia eliberează în interior conținutul lor specific care influențează starea patologică a celulei țintă. Mai mult, exozomii sunt sisteme de transport inteligente și pot fi utilizate pentru a transporta diferiți agenți terapeutici sau transcripti la un anumit situs specific. Direcționarea specifică spre un anumit situs tumoral trebuie să prezinte o investigație amănunțită în viitor.

Studiul 3. Exozomii izolați din celulele de LLC și conținutul lor specific de ARN/microARN ca noi biomarkeri în leucemia limfocitară cronică

O provocare majoră în terapia cancerului rămâne rezistența la terapie. Câteva studii au arătat că exozomii sunt profund implicați în modularea chemosensibilității prin transmiterea fenotipului de rezistență la celulele receptorilor. Acizii nucleici conținuți în structura exozomilor, par o modalitate eficientă de inducere și activare a mecanismelor de rezistenței la terapie în celulele canceroase.

În acest studiu, am intenționat să evaluăm profilul miARN al exozomilor derivați din liniile celulare de LLC, profilul de expresie a genelor țintă, precum și evaluarea mecanismului de rezistență la terapie în această patologie.

După izolarea exozomilor din mediul de cultură, s-a evaluat profilul de expresie al miARN-urilor și profilul de expresie a principalelor gene alterate după terapie, utilizând tehnicile de microarray și RT-PCR. Mai mult, am reușit să subliniem activarea unor mecanisme compensatorii corelate cu procesele apoptotice și rezistența la terapie. Astfel, prin modularea genelor aparținătoare familiei BCL2 și a transportorilor ABC, se urmărește îmbunătățirea rezultatelor în vederea prelungirii ratei de supraviețuire a pacienților cu LLC. Exozomii derivați din celulele LLC care prezintă un conținut specific de microARN, sunt implicați în activarea mecanismului de rezistență prin alterarea nivelului de expresie a mai multor gene. Astfel, s-a observat un nivel supraexprimat a genelor relevante implicate în procesele apoptotice și rezistența la terapie în cazul tratamentului combinat. În cea ce privește fenotipul celular, am presupus că terapia combinată activează mecanismele de rezistență la terapie și inhibă procesele apoptotice. Acest aspect este responsabil în evoluția leucemiei limfocitare cronice spre o formă agresivă, anume sindromul Richter.

Procese precum apoptoza, proliferarea celulară, diferențierea celulară, rezistența la terapie și metastaza ridică multe semne de întrebare în cea ce privește debutul și progresul bolii. Rezistența la terapie reprezintă un mecanism important care duce la reducerea ratei de supraviețuire a pacientului diagnosticat cu LLC. Conform fenotipului celular, terapia combinată testată aici a prezentat o stimulare a rezistenței la terapie prin activarea unor gene specifice implicate în acest mecanism în linia celulară MEC-1. Putem concluziona că fenotipul celular joacă un rol important ca răspuns la terapie sugerând nevoia unui medicament personalizat pentru fiecare pacient, ceea ce va avea un impact enorm asupra calității vieții și o rată de supraviețuire îmbunătățită pentru fiecare pacient cu LLC.

Studiul 4. Profilul miARN implicat în evoluția leucemiei limfocitare cronice înspre sindromul Richter

S-a dovedit anterior că dereglarea miARN poate fi legată de evoluția clinică și răspunsul la terapie al pacienților cu LLC. De asemenea, sinteza și reglarea diferitelor specii de miARN este legată de inițierea celulelor B și a receptorilor celulelor B (BCR).

În plus, veziculele extracelulare care conțin miARN sunt considerate noi biomarkeri cu rol transportor implicați în reglarea fiziologiei și a funcției celulelor LLC. Ulterior, transportul miARN prin intermediul veziculelor extracelulare derivate din membrana celulară a LLC ar putea prezenta o aplicabilitate importantă în folosirea acestora ca biomarkeri potențiali pentru prognosticul pacienților cu LLC (10).

În acest studiu, ne-am propus să investigăm rolul potențial al microARN ca biomarkeri pentru dezvoltarea unei "faze accelerate" a leucemiei limfocitare cronice, refractară la toate liniile de chimioterapie convențională.

Studiul debutează cu evaluarea miR-19b mimic și inhibitor în vederea investigării efectului asupra proliferării și invaziei celulare. În urma rezultatelor, s-a observat reducerea numărului de celule viabile post-terapie cu miR-19b inhibitor. Prin urmare, miR-19b mimic a determinat creșterea ratei de proliferare a celulelor tumorale și progresia invaziei care reprezintă un factor critic în progresia cancerului și a metastazelor. Prin evaluarea nivelului de expresie genică și a nivelului de proteine după transfecție s-au investigat modificările apărute în Tp53 și MKI67. Ca obiectiv final al studiului, am investigat efectul Obinutuzumabului în formele agresive ale LLC și corelația acestuia cu miR-19b. Constatările noastre arată că nivelul de expresiei a miR-19b este inhibat după terapia cu Obinutuzumab în ambele linii celulare. Astfel, am presupus că miR-19b ar putea fi folosit ca și biomarker cu potențial rol terapeutic în prognostic și diagnostic la pacienții cu LLC. Terapia cu Obinutuzumab ar putea îmbunătăți rezultatul clinic și capacitatea de a fi utilizat ca potențial agent terapeutic în tratamentul formei agresive de LLC.

Concluzii generale și noutatea studiului

În ultimele decenii, descoperirea exozomilor derivați din tumorile maligne a revoluționat domeniul medical. Nu există nicio îndoială că acești exozomi au o funcție semnificativă în celulele tumorale care furnizează informații despre celulele parentale și implicațiile lor în modificarea fenotipului celulelor țintă. În studiul nostru, am investigat molecule bioactive specifice legate de LLC. Mai mult, aceste studii au arătat legăturile dintre exozomii derivați de tumorile maligne și transformările maligne care evidențiază posibilitatea folosirii acestora ca sursă pentru noi abordări terapeutice.

Originalitatea și caracteristicile inovatoare ale acestei teze de doctorat sunt date de contribuția prin caracterizarea exozomilor derivați din tumorile maligne în vederea evidențierii conținutului lor specific legat de transformarea malignă. Folosind tehnologia microarray am observat importanți factori cheie implicați în patologia LLC, precum modificări induse în gene și miARN specific. Am identificat un panou de gene relative responsabile de transformarea malignă, respectiv un grup de miARN legate de rezistența la terapie. Astfel, putem afirma că exozomii sunt piese importante în imaginea puzzle-ului asociat malignităților hematologice, fiind implicați în creșterea tumorală, tumorigeneza, Evadare imună tumorală, rezistența la terapie și metastazare.

De asemenea, în studiul 4, raportăm pentru prima dată relevanța miR-19b în LLC. miR-19b ar putea avea potențial de a furniza informații despre progresia LLC, iar Obinutuzumab ar putea avea capacitatea de a inhiba progresia LLC în sindromul Richter. Pentru rezultate clinice mai bune, sunt necesare noi cunoștințe în acest domeniu pentru a dezvolta o terapie personalizată în malignitățile hematologice.

REFERINȚE SELECTIVE

1. Hus I, Rolinski J. Current concepts in diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Contemporary oncology*. 2015;19(5):361-7.
2. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015;526(7574):525-30.
3. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2000;343(24):1750-7.
4. Flinn IW, Neuberg DS, Grever MR, Dewald GW, Bennett JM, Palletta EM, et al. Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(7):793-8.
5. Abbaszadeh-Goudarzi K, Shokri F, Hosseini M, Jadidi-Niaragh F, Ghalamfarsa G, Saboor-Yaraghi AA. Synergistic induction of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells after treatment with all-trans retinoic acid in combination with interleukin-21 and rituximab. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2016;12(4):1278-83.
6. Byrd JC, Rai K, Peterson BL, Appelbaum FR, Morrison VA, Kolitz JE, et al. Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011. *Blood*. 2005;105(1):49-53.
7. Chen WX, Liu XM, Lv MM, Chen L, Zhao JH, Zhong SL, et al. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PloS one*. 2014;9(4): e95240.
8. Hannafon BN, Ding WQ. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(7):14240-69.
9. Zhao L, Yu J, Wang J, Li H, Che J, Cao B. Isolation and Identification of miRNAs in exosomes derived from serum of colon cancer patients. *Journal of Cancer*. 2017;8(7):1145-52.
10. Negrini M, Cutrona G, Bassi C, Fabris S, Zagatti B, Colombo M, et al. microRNAome expression in chronic lymphocytic leukemia: comparison with normal B-cell subsets and correlations with prognostic and clinical parameters. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(15):4141-53.