

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA**

**CITOGENETICA ȘI BIOLOGIA MOLECULARĂ A
CARCINOMULUI OVARIAN**

**Teză de doctorat
- Rezumat -**

**Conducător științific:
PROF.DR.CORNELIU DORIN OLINICI**

**Doctorand:
LUMINIȚA LELUȚIU**

2011

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT **Partea I-a - STADIUL CUNOAȘTERII**

INTRODUCERE

Cancerul ovarian	7
CAPITOLUL 1. Citogenetica în carcinomul ovarian	11
1.1 Analiza citogenetică convențională	11
1.2 Mecanismele citogenetice în tumorile solide –generalități.....	13
1.3 Anomaliile citogenetice în carcinomul ovarian	16
1.3.1 Anomaliile citogenetice numerice	16
1.3.2 Anomaliile citogenetice structurale	18
1.4 Aplicațiile diagnostice și prognostice ale analizei citogenetice în carcinomul ovarian.....	22
CAPITOLUL 2. Biologia moleculară a carcinomului ovarian	25
2.1 Rolul oncogenelor în carcinogeneza ovariană	26
2.2 Rolul GST în carcinogeneza ovariană	28
CAPITOLUL 3. Anomaliile cromozomului 3 în carcinomul ovarian	33
3.1 Instabilitatea cromozomială. Rearanjamente cromozomiale în carcinomul ovarian.....	36
3.2 Locusurile fragile	38
3.3 Duplicațiile segmentale.....	39
3.4 Secvențele repetitive simple	39
CAPITOLUL 4. Testul eliminării (Et).....	40
4.1 Supresia tumorigenității prin fuziune celulară somatică.....	42
4.2 Hibrizii monocromozomiali în studiul genelor malignității	43
4.3 GST „candidate”la nivelul brațului 3p cu rol în carcinogeneza ovariană.....	45
4.4 Oncogene „candidate”la nivelul 3q cu rol în carcinogeneza ovariană.....	46
CAPITOLUL 5. Tehnici de citogenetică modernă	47
5.1 Hibridizarea in situ fluorescentă (FISH).....	48
5.2 Hibridizarea in situ cromogenică (CISH)	50
CAPITOLUL 6. Supraexpresia proteică și amplificarea genei HER2 în carcinomul ovarian	50
6.1 Biologia genei HER2/neu	53
6.2 Oncoproteina HER2.....	54
6.3 Supraexpresia proteică și amplificarea genei HER2.....	54
CAPITOLUL 7. Rolul P53 în carcinomul ovarian	57

Partea a II-a **CERCETĂRI PERSONALE**

Obiectivele lucrării.....	61
Material și metodă	62
CAPITOLUL 8. Experimentarea și standardizarea unui protocol de izolare a nucleilor din materialul tumoral fixat și inclus în blocul de parafină	68
8.1 Material și metodă.....	68
8.2 Protocol de lucru	69

8.3	Concluzii	76
CAPITOLUL 9.	Experimentarea și standardizarea unui protocol FISH pentru analiza citogenetică a materialului tumoral fixat și inclus în blocul de parafină	77
9.1	Material și metodă.....	77
9.2	Protocol de lucru	77
9.2.1	Izolarea ADN-ului. Prepararea probelor PAC	77
9.2.2	Izolarea ADN-ului pentru probele BAC	83
9.2.3	Metode de determinare a concentrației ADN-ului.....	85
9.2.4	Marcarea și testarea probelor PAC și BAC	88
9.2.5	Optimizarea protocolului FISH pe țesutul tumoral ovarian.....	92
9.2.5.1	Pretratarea lamelor cu nuclee tumorale ovariene.....	92
9.2.5.2	Denaturarea ADN-ului din probele PAC, BAC și CEP3.....	93
9.2.5.3	Denaturarea și hibridizarea ADN-ului tumoral ovarian	94
9.2.5.4	Spălarea post-hibridizare	95
9.2.5.5	Detectarea probelor	96
9.2.5.6	Vizualizarea semnalelor FISH	97
CAPITOLUL 10.	Analiza anomaliilor cromozomului 3 în carcinomul ovarian	100
10.1	Analiza aneuploidiei cromozomului 3	100
10.2	Analiza delețiilor CER1 în carcinomul ovarian.....	109
10.3	Stabilirea unor corelații între delețiile CER1 și caracteristicile clinico-patologice.....	124
10.4	Identificarea cu ajutorul tehnicii FISH a anomaliilor genetice la nivelul 3q26 în carcinomul ovarian	126
10.5	Stabilirea unor corelații între anomaliile genetice pe 3q26 și caracteristicile clinico-patologice	139
10.6	Delețiile CER1 și amplificările pe 3q26 – posibili factori prognostici în carcinomul ovarian	142
CAPITOLUL 11.	Determinarea prin metoda flow-citometrică a ploidiei ADN pe țesut tumoral ovarian inclus în parafină	147
CAPITOLUL 12.	Analiza statusului HER2 prin tehnicile IHC și CISH.....	155
12.1	Analiza supraexpresiei HER2 prin metoda imunohistochimică	155
12.2	Determinarea amplificării genei HER2 prin metoda CISH	159
12.3	Stabilirea unor corelații între statusul HER2 și parametrii clinico-patologici	166
CAPITOLUL 13.	Expresia imunohistochimică a proteinei p53 în carcinomul ovarian.....	169
13.1	Analiza supraexpresiei p53	172
13.2	Stabilirea unor corelații între supraexpresia p53 și parametrii clinico-patologici	175
CONCLUZII GENERALE		177
BIBLIOGRAFIE.....		179
ANEXE.....		196
Articole atașate.....		200

Cuvinte cheie: carcinom ovarian, cromozomul 3, aneuploidie, deleții, amplificări, hibridizare in situ fluorescentă (FISH), hibridizare in situ cromogenică (CISH), flow-citometrie, imunohistochimie.

INTRODUCERE

Cu toate progresele realizate în domeniile chirurgiei și chimioterapiei, cancerul ovarian continuă să fie principala cauză de deces în rândul pacientelor cu cancere ginecologice.

În ultimele două decenii s-a pus accent tot mai mult pe descifrarea biologiei moleculare a carcinomului ovarian. Există studii recente care susțin că teoria carcinogenezei ovariene, așa cum a fost ea susținută până de curând, are multe puncte slabe, astfel că în prezent sunt propuse alte modele în care sunt incluse și mecanismele moleculare. Unul dintre aceste studii, care ia în considerare aspectele clinice, patologice și moleculare ale bolii, propune modelul dualist pentru carcinogeneza ovariană care împarte carcinoamele ovariene în două tipuri de tumori: de grad redus (tipul 1) și de grad înalt (tipul 2), cu anomalii genetice și comportament biologic diferit.

În ultimele două decenii, investigațiile citogenetice din carcinomul ovarian, realizate cu tehnici precum FISH-ul metafazic sau interfazic, CGH etc, au ajutat la identificarea unor anomalii cromozomiale complexe și anomalii funcționale ale genelor de pe acești cromozomi (informații existente în Baza de date Mitelman).

Cromozomul 3 este unul dintre cromozomii umani la nivelul căruia s-au identificat prin metode moderne deleții interstițiale la nivelul 3p într-un număr mare de malignități. Implicarea cromozomului 3 în carcinogeneza ovariană a fost dovedită pe parcursul timpului atât prin analiza citogenetică convențională, cât și prin tehnici performante de biologie moleculară care au raportat o serie de gene supresoare tumorale „candidate” la nivelul 3p. Studiile citogenetice au arătat că anomaliile cromozomului 3 implică deleții non-randomizate de porțiuni din 3p sau chiar a întregului braț 3p. Evidențierea acestor pierderi cromozomiale, ca evenimente timpurii în carcinogeneza ovariană, a determinat inițierea propunerii de a introduce o clasificare genetică în care sunt descrise mai multe subtipuri de carcinom ovarian în funcție de mărimea pierderilor de material genetic de la nivelul 3p. Delețiile la nivelul 3p sunt cu mult diferite față de cele descrise la nivelul altor cromozomi, datorită numărului crescut de puncte de ruptură la acest nivel, la care se adaugă o frecvență crescută a delețiilor la nivelul capetelor telomerice 3p și 3q, față de zona centromerului. În afară de pierderile de material genetic la nivelul 3p, în cazul acestui cromozom au fost descrise și câștiguri de material genetic la nivelul 3q26-qter într-un număr de tumori.

În această lucrare ne-am propus analizarea rolului cromozomului 3 în evoluția carcinomului ovarian prin folosirea rezultatelor unui sistem funcțional experimental (testul de eliminare -Et) pe materialul tumoral fixat și inclus în parafină, utilizând tehnici de citogenetică modernă (FISH, CISH) și flow-citometrie pentru analiza ploidiei ADN, în acest

moment fiind singurul studiu publicat în țară pe acest tip de material, utilizând propriile protocoale de lucru.

Lucrarea este compusă din două părți: o parte generală - stadiul actual al cunoașterii și o parte personală – contribuțiile proprii.

În prima parte, structurată pe capitole, a fost realizată o prezentare a celor mai recente date din literatură privind subiectul abordat.

În **capitolul 1** sunt trecute în revistă date din literatura de specialitate despre citogenetica clasică și despre mecanismele citogenetice care apar în tumorile solide, despre anomaliile cromozomiale numerice și structurale care apar în carcinoamele ovariene grupate pe subtipuri histologice, despre aplicațiile diagnostice și prognostice ale analizei citogenetice în acest tip de tumoră cu modele de evoluție cariotipică.

Datele prezentate în **capitolul 2** reprezintă doar o parte din biologia moleculară a carcinomului ovarian, fiecare dintre anomaliile genetice descrise putând constitui în viitor un posibil marker pentru identificarea timpurie a bolii.

Capitolul 3 este destinat cromozomului 3 și rolului pe care acesta îl are în carcinogeneza ovariană. De asemenea, sunt prezentate cauzele instabilității genetice în celulele tumorale ovariene. Anomaliile cromozomului 3, structurate pe subtipuri histologice, reprezintă obiectul investigațiilor descrise în partea de contribuții proprii a tezei.

În **Capitolul 4** este descris un test funcțional experimental numit *Testul de eliminare (Et)*, cu ajutorul căruia au fost identificate la nivelul 3p regiuni cromozomiale frecvent deletate (regiunea CER1) și câștiguri de material genetic la nivelul 3q26-qter (regiunea CRR), în multe tumori umane maligne printre care se numără și carcinomul ovarian. Într-o scurtă prezentare este descrisă și tehnologia de fuziune microcelulară care a permis cartografierea genelor și secvențelor de ADN la nivelul regiunilor cromozomiale din genomul uman.

În **Capitolul 5** sunt prezentate tehnicile de citogenetică modernă utilizate în această lucrare pentru evidențierea anomaliilor genetice la nivelul 3p/3q.

Deosebit de utile sunt datele și corelațiile prezentate în ultimele două capitole (**6 și 7**) despre proteina și gena HER2/neu și despre rolul p53 în carcinomul ovarian, care au nu numai o importanță teoretică, cât și implicații utile terapeutice.

Partea a doua a tezei de doctorat prezintă cercetările personale și cuprinde următoarele capitole:

Cap. 8 Experimentarea și standardizarea unui protocol de izolare a nucleilor din materialul tumoral fixat și inclus în parafină.

Într-o primă etapă am experimentat un protocol de lucru pentru obținerea din materialul fixat și inclus în parafină a suspensiilor tumorale monodispersate, cu ajutorul cărora să se

poată analiza anomaliile genetice în tumorile umane utilizând tehnici de citogenetică modernă și flow-citometrie.

Material de lucru: materialul tumoral fixat și inclus în blocul de parafină (95 de cazuri + 5 cazuri control), obținut în urma intervențiilor chirurgicale de la pacientele cu diagnosticul de carcinom ovarian. Blocurile de parafină cu material tumoral, selectate în urma analizei lamelor histologice colorate cu HE, au fost secționare, iar secțiunile au fost prelucrate în cadrul Centrului MTC (Microbiology Cell and Tumor Biology Center) al Institutului Karolinska din Stockholm, Suedia.

Metoda: Protocolul utilizat pentru izolarea nucleilor din materialul tumoral fixat și inclus în parafină este o variantă a protocolului Hedley de extracție a nucleilor tumorali.

Rezultate: ► Protocolul de extracție a nucleilor dintr-o secțiune tisulară fixată și inclusă în parafină poate fi aplicat pentru orice tip de țesut; ► Succesul tehnicilor de citogenetică modernă depinde foarte mult de calitatea nucleilor extrași, fiind obligatorie respectarea timpilor de fixare în formol și de prelucrare în cel mai scurt timp pentru a evita alterarea materialului genetic ► Este necesară o selectare histologică atentă a secțiunilor utilizate (marcare și secționare) pentru obținerea unor rezultate genetice corecte ► Din suspensiile tumorale monodispersate obținute în etapa finală a protocolului de lucru au fost pregătite lame care au fost examinate la microscopul cu fluorescență pentru verificarea următoarelor aspecte:

- numărul optim de nuclei analizabili și morfologia acestora;
- testarea prezenței citoplasmei cu DAPI-Sulphorhodamine (prezența citoplasmei determină o fluorescență roșie perinucleară și alterează rezultatele testelor);
- intensitatea fluorescenței DAPI-Sulphorhodamine (intensitatea albastră nucleară marcată semnifică o concentrație proteică redusă perinucleară).

Cap. 9 Experimentarea și standardizarea unui protocol FISH pentru analiza citogenetică a materialului tumoral fixat și inclus în blocul de parafină.

Material și metodă:

Suspensiile tumorale monodispersate obținute care au îndeplinit anumite criterii au fost utilizate ca material de lucru pentru experimentarea unui protocol pentru tehnica FISH cu ajutorul căruia au fost detectate și analizate anomaliile cromozomului 3 (aneuploidia, delețiile CER1 și amplificările la nivelul 3q26).

Tehnica FISH pe populațiile celulare tumorale prezintă o sensibilitate ridicată și oferă posibilitatea detectării anomaliilor cromozomiale într-un număr mare de celule tumorale, independent de activitatea lor proliferativă *in vitro*. Astfel, FISH-ul a devenit un instrument complementar în citogenetica cancerului pentru detectarea anomaliilor cromozomiale numerice în nucleii interfazici și pentru clasificarea cromozomilor marker, informația citogenetică putând fi corelată cu aspectele clinice și patologice ale cazului analizat.

Anomaliile cromozomului 3 au fost analizate cu ajutorul unor probe (sonde) pentru tehnica FISH - clonele PACs "P1 derived artificial chromosome" pentru regiunea CER1 (3p21.3) și BACs „Bacterial artificial chromosome” pentru regiunea 3q26 (vectori utilizați pentru a clona fragmente de ADN), obținute în laborator pe baza unui protocol de lucru. Clonarea ADN-ului este o metodă utilizată pentru multiplicarea secvențelor de ADN particular (de interes), folosit pentru analiza anumitor regiuni cromozomiale. Probele BACs reprezintă materialul ideal pentru analizarea secvențelor de ADN cu markeri citogenetici. Sunt cei mai importanți vectori folosiți pentru secvențierea genomului uman. De asemenea, sunt utilizați pentru tehnica FISH deoarece reprezintă forme stabile și ușor de manipulat de ADN clonat, care produc semnale fluorescente atât pe metafaze cât și la nivelul nucleilor. În studiul nostru au fost utilizate pentru analiza amplificărilor la nivelul 3q26.

Toate sodele PAC și BAC marcate au fost testate utilizând tehnica FISH-ului metafazic și interfazic pe lame cu nuclei tumorali obținuți dintr-o suspensie tumorală leucemică și dintr-o linie tumorală de carcinom-nazofaringian Hone 1 (lame control), al căror status citogenetic pentru regiunile CER1 și 3q26 era cunoscut. Optimizarea protocolului FISH s-a realizat în etapa finală pe suspensiile tumorale ovariene parcurgând etapele protocolului FISH de pretratare, denaturare și hibridizare a ADN-ului din sondele PAC, BAC, CEP3 și a ADN-ului tumoral ovarian, urmate de spălarea posthibridizare. Vizualizarea semnalelor fluorescente s-a realizat cu ajutorul unui sistem alcătuit dintr-un microscop cu fluorescență Leica, Leitz-DMRB, Heidelberg, Germania și o cameră video CCD (Hamamatsu C 4800, Herrsching, Germania). Softul utilizat pentru prelucrarea imaginilor a fost Adobe Photoshop 7.0.

CAPITOLUL 10. Analiza anomaliilor cromozomului 3 în carcinomul ovarian

- **Analiza aneuploidiei cromozomului 3 în carcinomul ovarian.**

Utilizând tehnica FISH-ului interfazic și proba centromerică CEP3 3 (α -satelită), aneuploidia cromozomului 3 a fost depistată în 72,6% din carcinoamele ovariene analizate, restul de 27,4% reprezentând cazurile cu status diploid. Aneuploidia a fost frecvent întâlnită în carcinomul ovarian de tip histologic seros (87%) aflat în stadiul avansat, majoritatea cazurilor fiind de grad înalt. Un procent de 13% din carcinoamele de tip seros au fost în stadiul incipient (FIGO I-II) și au avut grad înalt. Carcinoamele cu histologie de non-seros (subtipurile endometrioid, mucinos, cu celule clare, nediferențiat) și aneuploidia cromozomului 3 au fost mai frecvent întâlnite în stadiul avansat (III-IV), gradul fiind înalt. Carcinoamele seroase aneuploide au fost mai frecvente în stadiul IIIC (57%) comparativ cu stadiul IIIA+B (10%).

- **Analiza delețiilor CER1 în carcinomul ovarian și stabilirea unor corelații între delețiile CER1 și caracteristicile clinico-patologice ale cazurilor**

La nivelul brațului scurt banda 3p21 a fost frecvent raportată ca fiind sediul delețiilor interstițiale în 23 de tipuri de tumori maligne, printre care se numără și carcinomul ovarian.

Cu ajutorul Et a fost identificată o regiune frecvent deletată în tumori numită CER1 (C3CER1), localizată la nivelul 3p21.3. CER1 are o dimensiune de aproximativ 2.4 Mb fiind o regiune bogată în gene (conține 33 de gene).

Scopul acestui studiu a fost de a analiza cu ajutorul FISH-ului interfazic și a clonelor PAC posibilele pierderi de material genetic la nivelul regiunii CER1 în carcinoamele ovariene (delețiile CER1 care implică posibile gene supresoare tumorale - GST cu rol în carcinogeneza ovariană = GST „candidate”) și de a stabili unele corelații cu parametrii clinico-patologici ai cazurilor respective.

Rezultate: Pe baza analizei datelor obținute, luând în considerare statusul regiunii CER1, am identificat următoarele 3 grupuri de studiu: **Grupul A:** cu status diploid - carcinoamele ovariene cu număr normal de copii pentru toate probele utilizate; **Grupul B:** cuprinde cazurile cu status aneuploid (≥ 3 copii ale cromozomului 3) și cu număr mic de deleții CER1; **Grupul C:** cuprinde cazurile de carcinom ovarian în care predomină delețiile CER1. Cele mai multe deleții CER1 au fost identificate în carcinoamele ovariene de tip histologic seros, toate tumorile fiind de grad înalt. Cele mai multe carcinoame ovariene cu deleții CER1 au fost în stadiul avansat (72%), predominant FIGO IIIC, însă un procent de 29% de carcinoame seroase au fost în stadiul incipient (FIGO I-II). Delețiile CER1 au fost detectate și în subtipul endometrioid de carcinom ovarian, însă numai în cazurile de grad înalt, aflate în stadiul avansat, corespunzând tipului 2 de tumori conform modelului dualist.

- **Identificarea cu ajutorul tehnicii FISH a anomaliilor genetice la nivelul 3q26 în carcinomul ovarian și stabilirea unor corelații între aceste anomalii genetice și caracteristicile clinico-patologice ale cazurilor**

Pentru identificarea cu ajutorul FISH-ului interfazic a unor posibile câștiguri de material genetic la nivelul 3q în carcinoamele ovariene am utilizat trei clone BAC, două pentru 3q26.1 și una 3q26.33, regiunea 3q26 fiind cunoscută pentru frecvența înaltă a amplificărilor 3q în multe tumori maligne umane.

Rezultate: S-au detectat câștiguri de material genetic (polisomie și/sau amplificare) la nivelul regiunii 3q26 (3q26.1 și 3q26.33) în carcinoamele ovariene. Acestea au fost mai frecvente în tipul histologic seros, de grad înalt, aflate predominant în stadiul FIGO IIIC. Câștigurile de material genetic sub forma amplificărilor la nivelul 3q26 au fost prezente în 14% din cazuri. Câștigurile de material genetic sub forma polisomiei au fost prezente în trei cazuri de carcinom non-seros (subtipurile endometrioid și cu celule clare), toate tumorile fiind de grad înalt și stadiu avansat (FIGO IIIC-IV).

- **Delețiile CER1 (3p21.3) și amplificările pe 3q26 – posibili factori prognostici în carcinomul ovarian**

Având în vedere numărul mic de cazuri (50 din numărul total de 95 utilizate pentru studiul aneuploidiei), care au putut fi analizate prin tehnica FISH atât pentru delețiile CER1,

cât și pentru câștigurile la nivelul 3q26, valoarea prognostică a anomaliilor cromozomului 3 poate fi validată numai pe loturi mari de paciente cu diagnosticul de carcinom ovarian care prezintă aceste tipuri de anomalii.

Analiza supraviețuirii pacientelor (metoda Kaplan-Meier) din cele trei grupuri analizate la nivelul regiunii 3q26 a arătat o reducere a supraviețuirii mediane pentru pacientele cu polisomie și cu amplificări 3q26, față de cele din grupul diploid.

Cap. 11 Determinarea prin metoda flow-citometrică a ploidiei ADN pe țesut tumoral ovarian fixat și inclus în parafină.

Utilizând suspensia tumorală ovariană monodispersată a fost elaborat un protocol de lucru pentru analiza ploidiei ADN prin flow-citometrie, datele obținute prin această metodă fiind ulterior comparate cu cele rezultate la determinarea aneuploidiei 3 cu ajutorul FISH-ului interfazic. Măsurarea fluorescențelor a fost realizată cu ajutorul flow-cytometrului Becton-Dickinson FACScan, iar evaluarea histogramelor ADN cu ajutorul softului CellQuestPro (Becton- Dickinson). Pentru control extern au fost utilizate probe de țesut ovarian non-tumoral.

Rezultate: Cazurile analizate prin metoda flow-citometrică și prin FISH interfazic au prezentat rezultate similare, existând câteva probleme de supraexprimare a ploidiei ADN, date în special de numărul mai mare de nucleii tumorali suprapuși sau de subexprimare a ploidiei ADN în probele cu număr insuficient de nucleii, datorită utilizării acestora în testările anterioare. Determinarea ploidiei ADN prin flow-citometrie necesită suspensii monodispersate cu număr suficient de mare de celule tumorale pentru a evita apariția unor erori de tipul supra sau subexprimării ploidiei.

Cap. 12 Analiza statusului HER2 în carcinomul ovarian prin tehnicile IHC și CISH

Expresia imunohistochimică a proteinei c-erb b2/HER2 și amplificarea genei HER2/neu evaluată prin CISH (chromogenic in situ hybridization) au fost studiate pe un lot de 95 cazuri de tumori ovariene (1 tumora ovariană seroasă borderline, 77 carcinoame seroase, 10 carcinoame endometrioide, 2 carcinoame mucinoase, 2 carcinoame cu celule clare, 3 carcinoame nediferențiate).

Rezultate: Rata de pozitivitate a HER2 în carcinoamele ovariene (cazurile cu scor IHC 3+ și cele cu scor IHC 2+ confirmate prin CISH) din studiul nostru a fost de aproximativ 16%. Nu au fost găsite corelații ale statusului HER2 nici cu grupul anomaliilor cromozomului 3, nici cu parametrii clinico-patologici ai cazurilor. O diferență semnificativă în ceea ce privește supraviețuirea a fost evidentă între pacientele HER2 negative (0/1+) și cele HER2 pozitive (2+/3).

Cap. 13 Expresia imunohistochimică a proteinei p53 în carcinoamele ovariene

Expresia imunohistochimică a proteinei p53 a fost studiată pe același lot de 95 cazuri de tumori ovariene (1 tumora ovariană seroasă borderline, 77 carcinoame seroase, 10 carcinoame endometrioide, 2 carcinoame mucinoase, 2 carcinoame cu celule clare, 3 carcinoame nediferențiate).

Rezultate: Supraexpresia p53 a fost găsită pozitivă în 58% din cazuri. Tumorile ovariene pozitive pentru p53 au fost carcinoame majoritatea de tip histologic seros (50,5%), de grad înalt, aflate în stadiul avansat (FIGO IIIC-IV). Colorația imunohistochimică pentru p53 a fost absentă în tumora seroasă borderline, în carcinomul cu celule clare, în carcinoamele endometrioide și mucinoase aflate în stadiul incipient (FIGO I-II).

O analiză a supraexpresiei p53 în grupurile studiate pentru anomaliile cromozomului 3 a evidențiat următoarele aspecte: ►lipsa supraexpresiei p53 în grupurile cu status diploid pentru cromozomul 3; ►supraexpresia p53 a fost identificată în grupurile cu anomalii ale cromozomului 3 (deleții CER1 la nivelul 3p21.3, polisomie, amplificări la nivelul 3q26), numai în carcinoamele ovariene de tip seros, grad înalt și stadiu avansat, fără însă a putea stabili cu certitudine o corelație cu tipul anomaliei genetice; o ușoară preponderență a cazurilor p53 pozitive a fost observată în grupul cu amplificări la nivelul 3q26.1 și 3q26.33 pentru cazurile cu > 6 copii ale cromozomului 3;

Utilizând testul χ^2 au fost găsite corelații cu semnificație statistică între supraexpresia p53 și vârsta de peste 55 de ani a pacientelor (p=0.01), stadiul FIGO avansat (IIIC-IV)(p<0.01), tipul histologic seros (p=0.03), gradul înalt (p<0.01), prezența ascitei (p<0.01) și tumora reziduală > 2cm după intervenția chirurgicală citoreducțională (p<0.01).

CURRICULUM VITAE

Numeși prenume: LELUȚIU LUMINIȚA

Data și locul nașterii: 13.03.1969, Argeș

Cetățenie: Română

Stare civilă: căsătorită, un copil

Locul de muncă actual: Institutul Oncologic „Prof. Dr. I. Chiricuta” Cluj

Depart. Anatomie Patologică – GENETICĂ

Strada Republicii nr. 34-36, 400015, Cluj-Napoca

Tel. +40-264-598 361 int 245

E-mail: luminita_lelutiu@yahoo.com

Funcția ocupată în prezent:

- cercetător științific-medic specialist anatomo-patolog la Institutul Oncologic „ Prof. Dr. Ion Chiricuță”, Cluj-Napoca, Romania;

- doctorand al Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Romania;

Educație :

- Liceul de Științe ale Naturii „ Zinca Golescu” Pitești, Argeș;

- Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Medicină Generală, 1995;
- Stagiatură: Spitalul Clinic Județean Cluj decembrie 1995- octombrie 1996;
- Rezidențiat în Anatomie patologică: Prosectura Spitalului Clinic Județean Cluj-Napoca, aprilie 1997-2002;
- Specialitate: medic specialist anatomo-patolog, confirmat în martie 2002;

Afilieri la Societăți Medicale Profesionale:

- Societatea de Morfologie Normală și Patologică
- Societatea Română de Radioterapie și Oncologie Medicală
- Societatea Europeană de Patologie

Limbi straine cunoscute: engleza, franceza

Experiențe relevante:

- Symposium on Pediatric Pathology, 21-24 mai 1997, Cluj-Napoca, Romania;
- Curs de formare de analist programator (390 ore), Centrul de pregătire în informatică, mai- iulie 2000, Cluj-Napoca, Romania;
- Stagiu de specializare în domeniul citogeneticii umane în Laboratorul de Genetică Medicală al Institutului „Victor Babeș” București, iulie-august 2002.
- Curs de specializare în domeniul biologiei moleculare a cancerului și a tehnicilor de citogenetică la Institutul Karolinska, Microbiology Cell and Tumor Biology Center (MTC), Stockholm, Suedia, septembrie - decembrie 2003.
- Curs de patologie onco-ginecologică, 5-6 octombrie 2004, Cluj-Napoca, Romania;
- Școala de Vară Națională: Genomica Funcțională în Terapia și Biologia Cancerului, 2-12 iulie 2006, Cluj-Napoca, Romania
- Guest Scholarship Programme (Swedish Institute), desfășurat în Karolinska Institute, Microbiology and Tumorbiology Center (MTC), Stockholm, Suedia, august-decembrie 2006.
- ESMO Supported Course: Breast Cancer Management: A European Perspective, Cluj-Napoca, 2-4 octombrie 2008.
- Bioscience Short Course: A-Z Workshop for HER2, The University of Westminster, Londra, Marea Britanie, 1-2 aprilie 2009.
- Institute of Biomedical Science: “ICC & ISH Tissue based diagnostics: The Next Decade”, Dublin, Irlanda, 1-4 iulie 2010.

Lucrări publicate în extenso în reviste naționale și internaționale:

- **Luminița Leluțiu**, C.D. Olinici: *Contribuția citogeneticii moleculare la progresul oncologiei clinice*. Radioter & Oncol. Med. 2002, 4: 240-243.
- Liliana Resiga, Magda Petrescu, Mihaela Muresan, **Luminița Leluțiu**, Stefan Hica, C.D.Olinici: *Tumora desmoplazica intraabdominală cu celule mici rotunde*. Romanian J Surg Oncol. 2002, 3:20.
- **Lelutiu L**, Olinici CD: *Biologia moleculară a cancerului ovarian: genele supresoare tumorale*. Radioter & Oncol. Med. 2003, 3: 157-160.
- **Lelutiu L**, Olinici CD, Imreh S: *CER1 on 3p21.3 and ovarian carcinoma*. Radioter & Oncol. Med 2004, 3: 161-168.
- **Luminița Leluțiu**, C.D. Olinici: *Noi aspecte privind structura și funcția regiunilor organizatoare nucleolare(NORs)*. Jurnalul Român de Patologie 2004, 3&4(7): 282-287.
- **Lelutiu L**, Olinici CD: *Angiogeneza în tumorile ovariene*. Jurnalul Român de Patologie 2004, 7(1 & 2): 66-74.
- **Leluțiu L**, Olinici CD, Todea D: *Supraexpresia HER2 - factor prognostic în carcinomul ovarian* . Jurnalul Român de Patologie 2005, 8(1&2):118-129.

- **Lelutiu L**, Olinici CD, Imreh S, Ghilezan N: *Analysis of CER1 (3p21.3) in ovarian carcinoma using Fluorescence In Situ Hybridization*. Radioter & Oncol.Med 2005, 1: 19-28.
- Todea D, Barsu M, Coroianu S, Muresan G, Buiga R, Laszlo G, **Lelutiu L**, Resiga L, Costin N: *Angiogeneza in carcinomul in situ, microinvaziv si invaziv al colului uterin*. Clujul Medical 2005, Vol. LXXVII, 2: 358-364.
- **Leluțiu L**, Olinici CD: *Diagnosticul diferențial al melanoamelor cutanate primare și secundare cu trăsături mixoide*. Prezentare de caz. Jurnalul Român de Patologie 2007, 9(3-4): 323-335.
- Mihaela Hedeșiu, **Luminița Leluțiu**, Sorana Bolboacă, Popiță V, Guttman T, Mihaela Băciuț: *Expression of CD44S cell adhesion molecule in maxillofacial squamous cell carcinomas and its imaging significance*. Rev. Med.Chir.Soc.Med.Iași 2008, 112(1): 312-319, ISSN:0300-8738, [PubMed](#);
- **Luminița Leluțiu**, Rareș Buiga, Liliana Resiga, Alexandru Eniu, Nicolae Ghilezan, Corneliu Olinici: *HER2 Testing in Breast Cancer Using Immunohistochemical Analysis and Chromogenic In Situ Hybridization: The Ion Chiricuță Cancer Institute Experience*. Journal of Radiotherapy & Medical Oncology 2009, 1: 29-35.
- Buiga R, Pais R, Irimie A, **Lelutiu L**, Rogoian L, Balacescu O, Olinici CD: *Human papilloma virus and the molecular biology of cervical carcinogenesis. A review*. Biology and Therapy of Cancer Cell 2009, 1: 12-26.
- Rodica Cosgarea, Sorina Dănescu, Ruxandra Cutuș, Simona Șenilă, Victorina Macovei, Ioana Bâldea, Radu Pop, Victor Pop, Beatrix Ferencz, Octavian Popescu, **Luminița Leluțiu**: *Diagnosticul molecular într-un caz de epidermoliză buloasă distrofică forma dominantă*. DermatoVenerol.(Buc.) 2009, 54: 7-11, CNCSIS B, ISSN 1220-3734;
- Cristian Leluțiu, Sergiu Nedevschi, **Luminița Leluțiu**, Anca Bojan: *Integrated Informatic System used to Optimize the Diagnostic and Therapeutical Evaluation of the Patients with Chronic Myeloid Leukemia*; în curs de publicare ACAM 2011;
- Sorina Dănescu, Simona Șenilă, **Luminița Leluțiu**, Nedevschi S, Rodica Cosgarea: *Dystrophic epidermolysis bullosa: two case reports*. Rom J Morphol Embryol 2011, 52(2):919-922, indexat Medline, CNCSIS A, cotat ISI-Thomson.

Comunicări științifice prezentate la Conferințe sau Simpozioane naționale și internaționale:

- Al II-lea Congres Național al Societății Române de Anatomie Patologică, București, 21-22 mai 2005; lucrările prezentate:
 - *Angiogeneza în carcinomul in situ, microinvaziv și invaziv al colului uterin*- Daniela Todea, Marina Bârsu, Rareș Buiga, Liliana Resiga, **Luminița Leluțiu**, George Simu;
 - *Importanța imunohistochemiei în diagnosticul tumorilor ginecologice*- Rareș Buiga, Mihaela Galatâr, Liliana Resiga, Daniela Todea, **Luminița Leluțiu**, Gavril Laszlo, Corneliu Olinici;
- International Conference on Advancements of Medicine and Health Care through Technology, Cluj-Napoca, 27-29 septembrie 2007; lucrarea prezentată:
 - *Modeling the Precess of Protein Synthesis using a Hierarchical Self-constructing Multi-Agent System*. C.Leluțiu, **L. Leluțiu**, S. Nedevschi;
- Al 18-lea Congres Anual al Societății Române de Radioterapie și Oncologie Medicală, Cluj-Napoca, 2-4 octombrie 2008; lucrarea prezentată:

- *HER2 Testing in Breast Cancer Using Immunohistochemical Analysis and Chromogenic in situ Hybridization: The Experience of Cancer Institute on 1255 cases* – **Luminița Leluțiu**, Rareș Buiga, Liliana Resiga, Alexandru Eniu, Nicolae Ghilezan;
- Zilele Institutului Oncologic “Prof. Dr. Ion Chiricuță” 80 de ani de luptă împotriva cancerului, 1-3 octombrie 2009; lucrările prezentate:
 - *Caracteristicile imunohistochimice și citogenetice ale tumorii desmoplazice cu celule mici rotunde. Analiza cazurilor diagnosticate în IOCN* – **Luminița Leluțiu**, Liliana Resiga, Mihaela Galatâr, Rodica Păiș, Rareș Buiga;
 - *HER2 status evaluation in gastric cancer: is the breast system applicable?*-R. Buiga, **L. Leluțiu**, B. Fetica, D. Todea, C. Cebotaru;
 - *Tumora solidă-pseudopapilară a pancreasului – Prezentare de caz și discuția literaturii*- Liliana Resiga, Rodica Cosnarovici, **Luminița Leluțiu**, Rareș Buiga;
- “The 12th Romanian-Hungarian Meeting of Pediatric Oncology”, 23-24 octombrie 2009, Cluj-Napoca; lucrarea prezentată:
 - BCR-ABL Positive Chronic Myeloid Leukemia in Infancy* – G. Popa, Cristina Blag, Dana Olosutean, Mirela Marian, Manuela Sfichi, Anca Ilea, **Luminița Leluțiu**.
- Congresul National de Chirurgie, Editia a XXV-a, 3-6 mai 2010, Cluj-Napoca, Romania cu lucrarea prezentată:
 - Asociere morbida rară – cancer mamar și cancer de col uterin sincron – managementul therapeutic multidisciplinar* – Ignat Florin, A. Irimie, C. Lisencu, P. Achimas, E. Puscas, O. Coza, R. Tănăsescu, Carmen Lisencu, V. Popiță, Claudia Ros, **Luminița Leluțiu**;
- 2011 IEEE International Conference on Intelligent Computer Communication and Processing, 26-28 august 2011, Cluj-Napoca, Romania cu lucrarea prezentată:
 - An Algorithmic Approach to the Genetic Evaluation of the Patients with Chronic Myelogenous Leukemia* - Cristian Leluțiu, Sergiu Nedevschi, Luminița Leluțiu, Anca Bojan;

Experiența acumulată în programe/proiecte naționale:

1. CEEEX: Evaluarea riscului de cancer în populațiile expuse cronic la metale grele- RISCAMET – funcția deținută: *cercetător*; perioada: 2005-2007.
2. CEEEX: Terapia cu celule stem în regenerarea și reconstrucția vasculară – STEMCELLS – funcția deținută: *cercetător*; perioada: 2005-2007.
3. CEEEX: Controlul posttranscripțional al expresiei genelor în tumorile maligne. ARN de intreferență în biologia și tratamentul cancerului -ARNiARRAY - funcția deținută: *cercetător*; perioada: 2005-2007.
4. CEEEX: Utilizarea tehnologiilor micro- si tissue-array in stabilirea semnaturii moleculare a tumorilor ovariene epiteliale cu potential redus si inalt de malignitate. Identificarea genelor candidate in angiogeneza tumorilor borderline - MT ARRAY - funcția deținută: *cercetător*; perioada: 2006-2008.
5. CEEEX - 5166: Predicția evoluției și estimarea răspunsului la tratament a tumorilor maligne prin modelare morfologică și hemodinamică, utilizând tehnici imagistice, matematice și de inteligență artificială- ANGIOTUMOR - funcția deținută: *cercetător*; perioada: 2006-2008.

6. CEEEX - 508: Sistem inteligent de detectare și evaluare neinvazivă a fibrozei, restructurării și a nodulilor displazici ai ficatului cu ajutorul ultrasonografiei 2D/3D și a markerilor moleculari- SÍDEF- funcția deținută: *cercetător*; perioada: 2006-2008.
7. CEEEX - 3693: Diagnostic molecular al epidermolizelor buloase. Tehnici moderne de cercetare, diagnosticare, tratament și prevenire a epidermolizelor buloase. Realizarea unui registru național al genodermatozelor- DEGEB- funcția deținută: *responsabil științific IOCN*; perioada: 2006-2008.
8. CEEEX: Steroizi animala și implicația lor asupra tumorilor genitale la om- STEROTUM- funcția deținută: *cercetător*; perioada: 2006-2008.
9. CEEEX: Optimizarea diagnosticului și terapiei cancerului vezical în contextul apariției noilor markeri tumorali urinari, a analizei citogenetice și a metodelor terapeutice minim invazive - VEZUVIUM- funcția deținută: *cercetător*; perioada: 2006-2008.
10. PN II: Celule stem placentare. O sursă alternativă pentru terapia celulară- PLACSTEM -funcția deținută: *cercetător*; perioada: 2007-2010.
11. PN-II-Idei-PCE-2008-2: Modularea răspunsului la radioterapie în cancerul de col uterin prin compuși biologici cu acțiune asupra mecanismelor moleculare ale cancerogenezei- ANGIOCOL- funcția deținută: *cercetător*; perioada: 2009-2011.

Data:
1 septembrie 2011

Semnătura

**“IULIU HATIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND
PHARMACY CLUJ-NAPOCA**

**CITOGENETIC AND MOLECULAR BIOLOGY OF OVARIAN
CARCINOMA**

DOCTORAL THESIS

Abstract

**Scientific Coordinator
PROF. DR. CORNELIU DORIN OLINICI**

**Ph. D. Student
LUMINITA LELUTIU**

2011

CONTENTS

Part one-STATE OF KNOWLEDGE

Introduction	
Ovarian cancer	7
Chapter 1. Cytogenetics in ovarian carcinoma	11
1.1 Conventional cytogenetic analysis	11
1.2 Cytogenetic mechanisms in solid tumors –General	13
1.3 Cytogenetic abnormalities in ovarian carcinoma.....	16
1.3.1 Numerical cytogenetic abnormalities	16
1.3.2 Structural cytogenetic abnormalities.....	18
1.4 Diagnostic and prognostic applications of cytogenetic analysis in ovarian cancer	22
Chapter 2. Molecular biology of ovarian carcinoma	25
2.1 Role of oncogenes in ovarian carcinogenesis	26
2.2 Role of TSG in ovarian carcinogenesis	28
Chapter 3. Chromosome 3 abnormalities in ovarian carcinoma.....	33
3.1 Chromosomal instability.Chromosomal rearrangements in ovarian carcinoma	36
3.2 Fragile loci	38
3.3 Segmental duplications	39
3.4 Simple repetitive sequences	39
Chapter 4. Elimination test (Et)	40
4.1 Suppression of tumorigenicity by somatic cell fusion.....	42
4.2 Monochromosomal hybrids in the study of malignancy genes	43
4.3 TSG candidate at 3p arm in ovarian tumorigenesis	45
4.4 Candidate oncogenes at 3q in ovarian carcinogenesis.....	46
Chapter 5. Modern cytogenetic techniques.....	47
5.1 Fluorescence in situ hybridization (FISH).....	48
5.2 Chromogenic in situ hybridization (CISH).....	50
Chapter 6. HER2 overexpresion and gene amplification in ovarian carcinoma.....	50
6.1 Biology of HER2/neu gene	53
6.2 HER2 oncoprotein	54
6.3 HER2 overexpresion and gene amplification	54
Chapter 7. Role of p53 in ovarian carcinoma	57

Part two

ORIGINAL CONTRIBUTIONS

Work objectives	61
Material and method	62
Chapter 8. Experimentation and standardization of a protocol for nuclei isolation in fixed and paraffin-embedded tumor material	68
8.1 Material and method	68
8.2 Working protocol.....	69

	8.3 Conclusions	76
Chapter 9.	Experimentation and standardization of a FISH protocol for the cytogenetic analysis of fixed and paraffin-embedded tumor material	77
	9.1 Material and method.....	77
	9.2 Working protocol.....	77
	9.2.1 DNA isolation. PACs probes preparation	77
	9.2.2 DNA isolation for BACs probes	83
	9.2.3 Methods for determining the DNA concentration.....	85
	9.2.4 Marking and testing of PACs and BACs probes.....	88
	9.2.5 FISH protocol optimization on ovarian tumor tissue	92
	9.2.5.1 Pretreatment slides with ovarian tumor nuclei.....	92
	9.2.5.2 Denaturation the DNA from probes PAC, BAC and CEP3 probes	93
	9.2.5.3 Denaturation and hybridization the DNA from ovarian tumoral tissue	94
	9.2.5.4 Posthybridization washing	95
	9.2.5.5 Probes detection	96
	9.2.5.6 FISH signals detection	97
Chapter 10.	Analysis of chromosome 3 abnormalities in ovarian carcinoma	100
	10.1 Analysis of chromosome 3 aneuploidy in ovarian carcinoma.....	100
	10.2 Analysis of CER1 deletions in ovarian carcinoma.....	109
	10.3 Establishment of some correlations between CER1 deletions and the clinical-pathological characteristics	124
	10.4 Identification using the FISH techniques of 3q26 genetic abnormalities in ovarian carcinoma	126
	10.5 Establishment of some correlations between 3q26 genetic abnormalities and the clinical-pathological characteristics	139
	10.6 CER1 deletions and 3q26 amplifications – possible prognostic factors in ovarian carcinoma.....	142
Chapter 11.	Determination of DNA ploidy by the flow cytometry method on fixed and paraffin-embedded ovarian tumor tissue	147
Chapter 12.	Analysis of HER2 status in ovarian carcinoma using the IHC and CISH techniques.....	155
	12.1 Analysis of HER2 overexpression by immunohistochemical Method	155
	12.2 Detecting of HER2 gene amplification by CISH method.....	159
	12.3 Establishment of some correlations between HER2 status and the clinical-pathological characteristics.....	166
Chapter 13.	Immunohistochemical expression of the p53 protein in ovarian carcinomas	169
	13.1 Analysis of p53 overexpression	172
	13.2 Establishment of some correlations between p53 overexpression and clinical-pathological parameters	175
	GENERAL CONCLUSIONS	177
	REFERENCES	179
	ANNEXES	196
	ARTICLES	200

Key words: ovarian carcinoma, chromosome 3, aneuploidy, deletions, amplifications, fluorescence in situ hybridization (FISH), chromogenic in situ hybridization (CISH), flow cytometry, immunohistochemistry.

INTRODUCTION

Despite all the progress made by surgery and chemotherapy, ovarian cancer continues to be the leading cause of death among patients with gynecological cancers.

Over the last two decades, deciphering the molecular biology of the ovarian carcinoma has increasingly gained interest. Recent studies maintain that the theory of ovarian carcinogenesis, as it was asserted until recently, has many weak points, therefore other models are currently suggested, models which include molecular mechanisms. One of such studies, which considers the clinical, pathological and molecular aspects of the disease, proposes a dualist model for ovarian carcinogenesis, which classifies ovarian carcinoma into two types of tumors: low grade (type 1) and high grade (type 2), types which show different genetic abnormalities and biological behavior.

Over the last two decades, cytogenetic research into ovarian carcinoma, using techniques such as metaphase or interphase FISH, and CGH, has helped identify complex chromosome abnormalities and functional abnormalities of the genes on these chromosomes (Mitelman Database).

Chromosome 3 is one of the human chromosomes on which modern methods have identified 3p level interstitial deletions in a large number of malignancies. Chromosome 3's involvement in ovarian carcinogenesis has been proven over time both by conventional cytogenetic analysis, and by high-end molecular biology techniques, which have reported a series of 3p level "candidate" tumor-suppressor genes. Cytogenetic studies have shown that chromosome 3 abnormalities include non-random deletions of portions of 3p or the entire 3p arm. The evidence of such chromosomal losses as early events in ovarian carcinogenesis has led to the proposal to introduce a genetic classification, which describes several subtypes of ovarian carcinoma according to the size of 3p genetic material losses. 3p deletions are very different from the deletions of other chromosomes, due to the high level of breakpoints, and the increased frequency of deletions of telomeric 3p and 3q ends as compared to the centromeric area. Besides the 3p genetic material losses, this chromosome has also shown 3q26-qter genetic material gains in a number of tumors.

This paper has proposed to analyze the role of chromosome 3 in the evolution of ovarian carcinoma by using the results of an experimental functional system (elimination test - Et) on the tumor material, which was fixed and paraffin embedded; the system used modern cytogenetic techniques (FISH, CISH) and flow cytometry to

analyze DNA ploidy; it is the only study published in Romania so far that uses this type of material, and its own operating protocols.

The paper has two parts: a general part – current state of knowledge – and a personal part – personal contributions.

The first part, which is structured into chapters, presents the most recent literature data on the subject of the paper.

Chapter 1 summarizes data in the specialized literature on classical cytogenetics and the cytogenetic mechanisms that take place in solid tumors, numerical and structural chromosome abnormalities that occur in ovarian carcinomas grouped into histological subtypes, and diagnostic and prognostic applications of cytogenetic analysis for this tumor type with karyotypic evolution models.

The data in **chapter 2** represent just a part of the molecular biology of ovarian carcinoma, and each of the genetic abnormalities described can constitute a possible marker for early disease identification in the future.

Chapter 3 is dedicated to chromosome 3 and its role in ovarian carcinogenesis. It also discusses the causes of genetic instability in the ovarian tumor cells. Chromosome 3 abnormalities, structured into histological subtypes, represent the object of the research described in the personal contribution part of the thesis.

Chapter 4 describes an experimental functional test called the *Elimination Test (Et)*, which helped identify frequently deleted 3p chromosome regions (the CER1 region) and 3q26-qter genetic material gains (the CRR region) in many malignant human tumors, among which ovarian carcinoma. It includes a short description of the microcell fusion technology which allowed the mapping of genes and DNA sequences in the chromosome regions of the human genome.

Chapter 5 presents the modern cytogenetic techniques used in this paper to evidence 3p/3q genetic abnormalities.

The data and correlations presented in the last two chapters (**6 and 7**) on the HER2/neu protein and gene, and the role of p53 in ovarian carcinoma are also especially useful, since they not only have theoretical significance, but also useful therapeutic implications.

The second part of the doctoral thesis presents personal research, and comprises the following chapters:

Chapter 8. Experimentation and standardization of a protocol for nuclei isolation in fixed and paraffin-embedded tumor material.

In the initial stage, we experimented on an operating protocol for obtaining monodispersed tumor suspensions from the fixed and paraffin-embedded material; the suspensions would be used to analyze genetic abnormalities in human tumors by using modern cytogenetic techniques and flow cytometry.

Working material: the fixed and paraffin-embedded tumor material, obtained by surgical interventions from patients diagnosed with ovarian carcinoma. The paraffin blocks containing tumor material, selected following the analysis of HE stained histology slides, were sectioned, and the sections were processed at the MTC Center (Microbiology and Tumor Biology Center) of Karolinska Institute in Stockholm, Sweden.

Method: The protocol used to isolate the nuclei in the fixed and paraffin-embedded tumor material is a variant of the Hedley protocol for the extraction of tumor nuclei.

Results: ► The protocol for the extraction of nuclei from a fixed and paraffin-embedded tissue section can be applied to any type of tissues; ► The success of the modern cytogenetic techniques highly depends on the quality of the extracted nuclei, therefore the times for formalin fixing and immediate processing have to be complied with to avoid damaging the genetic material; ► Careful histological selection of the used sections (marking and sectioning) should be made in order to obtain accurate genetic results; ► The monodispersed tumor suspensions obtained in the final stage of the operating protocol were used to prepare slides, which were examined under a fluorescence microscope for the following aspects:

- optimal number and morphology of analyzable nuclei;
- test of the presence of cytoplasm using DAPI-Sulphorhodamine (the presence of cytoplasm determines perinuclear red fluorescence and alters test results);
- intensity of DAPI-Sulphorhodamine fluorescence (marked nuclear blue intensity means low perinuclear protein concentration).

Chapter 9. Experimentation and standardization of a FISH protocol for the cytogenetic analysis of fixed and paraffin-embedded tumor material.

Material and method: The obtained monodispersed tumor suspensions that met certain criteria were used as working material in the experimentation on a protocol for the FISH technique, which helped detect and analyze chromosome 3 abnormalities (aneuploidy, CER1 deletions, and 3q26 amplifications). The FISH technique applied to tumor cell populations is highly sensitive, and offers an opportunity to detect chromosome abnormalities in a large number of tumor cells, regardless of their *in vitro* proliferative activity. Thus, FISH has become a complementary instrument in cancer cytogenetics for the detection of numerical chromosome abnormalities in interphase nuclei, and the classification of marker chromosomes, since the cytogenetic information can be correlated with the clinical and pathological aspects of an analyzed case.

Chromosome 3 abnormalities were analyzed using some probes for the FISH technique - “P1 derived artificial chromosome” or PAC clones for the CER1 (3p21.3) region, and “Bacterial artificial chromosome” or BAC clones for the 3q26 regions (vectors used to clone DNA fragments), obtained in laboratory according to an operating protocol. DNA cloning is a method used to multiply particular (specific) DNA sequences, which are used to analyze certain chromosome regions. The BAC Probes are ideal material for the analysis of DNA sequences using cytogenetic markers. They are the most important vectors used in the sequencing of the human genome. They are also used in the FISH technique, since they are forms of cloned DNA that are stable and easy to manipulate, and give fluorescent signals both on the metaphases, and the nuclei. We used them in our study to analyze 3q26 amplifications.

All the marked PAC and BAC probes were tested using the metaphase and interphase FISH technique on slides containing tumor nuclei from a leukemic tumor suspension and a nasopharyngeal carcinoma tumor line Hone 1 - (control slides), whose cytogenetic status for the CER1 region and 3q26 was known. The FISH protocol was optimized in the final stage on the ovarian tumor suspensions by going through the stages of the FISH protocol, i.e. pretreatment, denaturation and hybridization of DNA from the PAC and BAC probes, and ovarian tumor DNA, followed by post-hybridization washing. The fluorescent signals were viewed using a system comprising a Leica fluorescence microscope, Leitz-DMRB, Heidelberg, Germany, and a CCD video camera (Hamamatsu C 4800, Herrsching, Germany). The software used for image processing was Adobe Photoshop 7.0.

CHAPTER 10. Analysis of chromosome 3 abnormalities in ovarian carcinoma

- **Analysis of chromosome 3 aneuploidy in ovarian carcinoma.**

Interphase FISH technique and centromeric probe (α -satellite) Cen 3 evidenced chromosome 3 aneuploidy in 72.6% of the analyzed ovarian carcinomas, while the remaining 27.4% represented diploid status cases. Aneuploidy was frequently found in advanced-stage ovarian serous carcinoma (87%), most of which high grade cases. 13% of the serous carcinomas were incipient stage (FIGO I-II), high grade cases. Non-serous carcinomas (the endometrioid, mucinous, clear- cell, and undifferentiated subtypes) showing chromosome 3 aneuploidy were more frequently found in advanced stage (III-IV), high grade cases. Aneuploid serous carcinomas were more frequent in stage IIIC (57%) than stage IIIA+B (10%) cases.

- **Analysis of CER1 deletions in ovarian carcinoma, and establishment of some correlations between CER1 deletions and the clinical-pathological characteristics of cases**

Band 3p21 of the short arm has been frequently reported as the location of interstitial deletions in 23 types of malignant tumors, among which ovarian carcinoma. It was used to identify a frequently deleted region in tumors called CER1 (C3CER1), and located at 3p21.3. CER1's approximate size is 2.4 Mb, and it is a gene-rich region (it contains 33 genes).

The purpose of this study was to analyze with the help of interphase FISH and PAC clones possible genetic material losses in the CER1 region in ovarian carcinomas (CER1 deletions that mean possible tumor suppressor genes – TSG – that play a certain role in ovarian carcinogenesis = “candidate” TSG), and to establish some correlations with the clinical-pathological parameters of the respective cases.

Results: Based on the analysis of the obtained data, by considering the status of the CER1 region, we have identified the following 3 study groups: **Group A:** diploid status, comprising ovarian carcinomas with a normal number of copies for all the used probes; **Group B:** comprising cases with an aneuploid status (≥ 3 copies of chromosome 3) and a small number of CER1 deletions; **Group C:** comprising ovarian carcinoma cases in which CER1 deletions predominate. Most CER1 deletions were identified in serous ovarian carcinomas, which were all high grade tumors. Most ovarian carcinomas with CER1 deletions were identified in advanced stage cases (72%), among which FIGO IIIC was predominant, although 29% of serous carcinomas were in incipient stage (FIGO I-II). CER1 deletions were also detected in the endometrioid subtype of ovarian carcinoma, but only in high grade, advanced stage cases, which corresponded to type 2 tumors of the dualist model.

- **Identification using the FISH techniques of 3q26 genetic abnormalities in ovarian carcinoma, and establishment of some correlations between such genetic abnormalities and the clinical-pathological characteristics of cases**

In order to identify possible genetic material gains at chromosome 3q in ovarian carcinomas with the help of interphase FISH, we used three BAC clones: two for 3q26.1 and one for 3q26.33, since the 3q26 region is known for the high frequency of 3q amplifications in many malignant human tumors.

Results: Genetic material gains (polysomy and/or amplification) were detected in the 3q26 region (3q26.1 and 3q26.33) in ovarian carcinomas. They were more frequent in the serous, high grade type cases, most of which in stage FIGO IIIC. Genetic material gains under the form of 3q26 amplifications were present in 14% of the cases. Genetic material gains under the form of polysomy were present in three cases of non-serous carcinoma (the

endometrioid and clear-cell subtypes); all the tumors were high grade and advanced stage (FIGO IIIC-IV) cases.

- **CER1 (3p21.3) deletions and 3q26 amplifications – possible prognostic factors in ovarian carcinoma**

Given the small number of cases (50 of the total of 95 cases used for the study of aneuploidy) that could be analyzed by the FISH technique both for CER1 deletions and 3q26 gains, the prognostic value of chromosome 3 abnormalities can only be validated on large groups of patients diagnosed with ovarian carcinoma who evidence such types of abnormalities.

The analysis of patient survival (the Kaplan-Meier method) in the three groups involved in the analysis of the 3q26 region showed a decrease in the median survival in patients with polysomy and 3q26 amplifications, as compared to the diploid group.

Chapter 11. Determination of DNA ploidy by the flow cytometry method on fixed and paraffin-embedded ovarian tumor tissue.

The monodispersed ovarian tumor suspension was used to design an operating protocol for the analysis of DNA ploidy by flow cytometry; the results obtained by this method were subsequently compared with the results of the determination of 3 aneuploidy by interphase FISH. Fluorescence was measured with a Becton-Dickinson FACScan flow cytometer, while the DNA histograms were assessed using CellQuestPro (Becton-Dickinson) software. A sample of non-tumor ovarian tissue was used for external control.

Results: The cases analyzed by the flow cytometry method and interphase FISH showed similar results; there were some problems involving overexpression of DNA ploidy, especially determined by the larger number of overlapping tumor nuclei, or underexpression of ploidy in the probes with an insufficient number of nuclei, due to their use in previous testing. The determination of DNA ploidy by flow cytometry requires monodispersed suspensions with a sufficient number of tumor cells in order to avoid the occurrence of ploidy over- or underexpression errors.

Chapter 12. Analysis of HER2 status in ovarian carcinoma using the IHC and CISH techniques

The immunohistochemical expression of the c-erb b2/HER2 protein and the amplification of the HER2/neu gene assessed by CISH (chromogenic in situ hybridization) were studied on a group of 95 cases of ovarian tumors (1 serous borderline ovarian tumor, 77 serous carcinomas, 10 endometrioid carcinomas, 2 mucinous carcinomas, 2 clear-cell carcinomas, and 3 undifferentiated carcinomas).

Results: The HER2 positivity rate in ovarian carcinomas (cases that scored IHC 3+ and IHC 2+, confirmed by CISH) in our study was approximately 16%. No correlations were found between the HER2 status and the chromosome 3 abnormality group, or the clinical-pathological parameters of the cases. A significant difference in terms of survival was found between the HER2 negative (0/1+) patients and the HER2 positive (2+/3) patients.

Chapter 13. Immunohistochemical expression of the p53 protein in ovarian carcinomas

The immunohistochemical expression of the p53 protein was studied on the same group of 95 cases of ovarian tumors (1 serous borderline ovarian tumor, 77 serous carcinomas, 10 endometrioid carcinomas, 2 mucinous carcinomas, 2 clear-cell carcinomas, and 3 undifferentiated carcinomas).

Results: p53 overexpression was found to be positive in 58% of the cases. Ovarian tumors positive for p53 were mainly high grade, advanced stage (FIGO IIIC-IV) serous carcinomas (50.5%). Immunohistochemical staining for p53 was absent in the serous borderline tumor, in the clear-cell carcinoma, and in the incipient stage (FIGO I-II) endometrioid and mucinous carcinomas.

The analysis of p53 overexpression in the groups studied for chromosome 3 abnormalities evidenced the following aspects: ► lack of p53 overexpression in the groups with a diploid state for chromosome 3; ► p53 overexpression was identified in the groups showing chromosome 3 abnormalities (CER1 deletions at 3p21.3, and 3q26 polysomy and amplifications) only in high grade, advanced stage serous carcinomas; a correlation with the type of genetic abnormality could not be established with certainty; slight predominance of p53 positive cases was noticed in the group showing 3q26.1 and 3q26.33 amplifications for the cases with > 6 copies of chromosome 3.

By using the χ^2 test, statistically significant correlations were found between p53 overexpression and patients aged 55 years and older ($p=0.01$), advanced FIGO stage (IIIC-IV) ($p<0.01$), the histological serous type ($p=0.03$), the high grade ($p<0.01$), the presence of ascites ($p<0.01$), and residual tumor > 2cm after cytoreductive surgery ($p<0.01$).

CURRICULUM VITAE

Name: LELUȚIU LUMINIȚA

Birth date and place: 13 martie 1969, Argeș

Citizenship: Romanian

Marital status: Married, one child

Work Place: Cancer Center “Prof.Dr. Ion Chiricuta”
Pathology Department - GENETICS

34-36 Republicii Street
400015, Cluj-Napoca, Romania
Tel. +40264598361 int 245
Email: luminita_leluti@yahoo.com

Present position:

- scientific researcher- medical doctor specialist in Pathology at the Cancer Center
“Prof.Dr. Ion Chiricuță” Cluj-Napoca, Romania
- Ph D Student in Medical Sciences, University of Medicine and Pharmacy
“Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, Romania

Education:

- High School for Natural Sciences “Zinca Golescu”, Pitești, Argeș;
- University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, licensed medical doctor (MD), graduated 1995;
- Internship: County Hospital of Cluj-Napoca december 1995-October 1996;
- Resident in Pathology: County Hospital Cluj, April 1997- March 2002;
- Specialit in Pathology: confirmed as medical doctor specialist in Pathology, București, March 2002;

Scientific Medical Societies Affiliation:

- Member of Society of Normal and Pathological Morphology
- Member of Romanian Society of Radiotherapy and Oncology
- Member of European Society of Pathology

Foreign languages: English, French

Other Relevant Experience:

- Symposium on Pediatric Pathology, 21-24 May 1997, Cluj-Napoca, Romania;
- Programmer analyst training (390 hours), Computer Training Center, May-July 2000,
Cluj-Napoca, Romania;
- Postgraduate Training in Molecular Biology of Cancer and Cytogenetic Techniques at Karolinska Institute, Microbiology Cell and Tumor Biology Center (MTC), september – December 2003, Stockholm, Sweden;
- Curs de patologie oncoginecologică, 5-6 October 2004, Cluj-Napoca, Romania;
- Școala de Vară Națională: Genomica Funcțională în Terapia și Biologia Cancerului, 2-12 July 2006, Cluj-Napoca, Romania;
- Guest Scholarship Programme (Swedish Institute) at Karolinska Institute, Microbiology Cell and Tumor Biology Center (MTC), August-December 2006, Stockholm, Sweden;
- ESMO Supported Course: “Breast Cancer Management: A European Perspective”, 2-4 October 2008, Cluj-Napoca, Romania;
- OECI PATHOBIOLOGY WORKSHOP: Structure and Genetics, the new Paradigm, 24-25 October 2008, Cluj-Napoca, Romania;
- Bioscience Short Course: “A-Z Workshop for HER2”, The University of Westminster, 1-2 April 2009, London, Great Britain.
- Institute of Biomedical Science: “ICC & ISH Tissue based diagnostics: The Next Decade”, 1-4 July 2010, Dublin, Ireland.

Papers published in extenso in national and international journals:

- **Luminița Leluțiu**, C.D. Olinici: *Contribuția citogeneticii moleculare la progresul oncologiei clinice*. Radioter & Oncol. Med. 2002, 4: 240-243.

- Liliana Resiga, Magda Petrescu, Mihaela Muresan, **Luminița Leluțiu**, Stefan Hica, C.D.Olinici: *Tumora desmoplazica intraabdominală cu celule mici rotunde*. Romanian J Surg Oncol. 2002, 3:20.
- **Lelutiu L**, Olinici CD: *Biologia moleculară a cancerului ovarian: genele supresoare tumorale*. Radioter & Oncol. Med. 2003, 3: 157-160.
- **Lelutiu L**, Olinici CD, Imreh S: *CER1 on 3p21.3 and ovarian carcinoma*. Radioter & Oncol. Med 2004, 3: 161-168.
- **Luminița Leluțiu**, C.D. Olinici: *Noi aspecte privind structura și funcția regiunilor organizatoare nucleolare(NORs)*. Romanian J Path 2004, 3&4(7): 282-287.
- **Lelutiu L**, Olinici CD: *Angiogeneza în tumorile ovariene*. Romanian J Path 2004, 7(1 & 2): 66-74.
- **Leluțiu L**, Olinici CD, Todea D: *Supraexpresia HER2 - factor prognostic în carcinomul ovarian* . Romanian J Path 2005, 8(1&2):118-129.
- **Lelutiu L**, Olinici CD, Imreh S, Ghilezan N: *Analysis of CER1 (3p21.3) in ovarian carcinoma using Fluorescence In Situ Hybridization*. Radioter & Oncol. Med 2005, 1: 19-28.
- Todea D, Barsu M, Coroianu S, Muresan G, Buiga R, Laszlo G, **Lelutiu L**, Resiga L, Costin N: *Angiogeneza in carcinomul in situ, microinvaziv si invaziv al colului uterin*. Clujul Medical 2005, Vol. LXXVII, 2: 358-364.
- **Leluțiu L**, Olinici CD: *Diagnosticul diferențial al melanoamelor cutanate primare și secundare cu trăsături mixoide. Prezentare de caz*. Romanian J Path 2007, 9(3-4): 323-335.
- Mihaela Hedeșiu, **Luminița Leluțiu**, Sorana Bolboacă, Popiță V, Guttman T, Mihaela Băciuț: *Expression of CD44S cell adhesion molecule in maxillofacial squamous cell carcinomas and its imaging significance*. Rev. Med.Chir.Soc.Med.Iași 2008, 112(1): 312-319, ISSN: 0300-8738, [PubMed](#).
- **Luminița Leluțiu**, Rareș Buiga, Liliana Resiga, Alexandru Eniu, Nicolae Ghilezan, Corneliu Olinici: *HER2 Testing in Breast Cancer Using Immunohistochemical Analysis and Chromogenic In Situ Hybridization: The Ion Chiricuță Cancer Institute Experience*. Journal of Radiotherapy & Medical Oncology 2009, 1: 29-35.
- Buiga R, Pais R, Irimie A, **Lelutiu L**, Rogoian L, Balacescu O, Olinici CD: *Human papilloma virus and the molecular biology of cervical carcinogenesis. A review*. Biology and Therapy of Cancer Cell 2009, 1: 12-26.
- Rodica Cosgarea, Sorina Dănescu, Ruxandra Cutuș, Simona Șenilă, Victorina Macovei, Ioana Bâldea, Radu Pop, Victor Pop, Beatrix Ferencz, Octavian Popescu, **Luminița Leluțiu**: *Diagnosticul molecular într-un caz de epidermoliză buloasă distrofică forma dominantă*. DermatoVenerol.(Buc.) 2009, 54: 7-11, CNCSIS B, ISSN 1220-3734;
- Cristian Leluțiu, Sergiu Nedevschi, **Luminița Leluțiu**, Anca Bojan: *Integrated Informatic System used to Optimize the Diagnostic and Therapeutical Evaluation of the Patients with Chronic Myeloid Leukemia*; ACAM 2011;
- Sorina Dănescu, Simona Șenilă, **Luminița Leluțiu**, Nedevschi S, Rodica Cosgarea: *Dystrophic epidermolysis bullosa: two case reports*. Rom J Morphol Embriol 2011, 52(2): 919-922, Medline, CNCSIS A, ISI-Thomson.

Scientific Communication presented at National and International Conferences and Symposiums:

- Al II-lea Congres Național al Societății Române de Anatomie Patologică, București, 21-22 mai 2005:
 - *Angiogeneza în carcinomul in situ, microinvaziv și invaziv al colului uterin*- Daniela Todea, Marina Bârsu, Rareș Buiga, Liliana Resiga, **Luminița Leluțiu**, George Simu;
 - *Importanța imunohistochimiei în diagnosticul tumorilor ginecologice*- Rareș Buiga, Mihaela Galatâr, Liliana Resiga, Daniela Todea, **Luminița Leluțiu**, Gavril Laszlo, Corneliu Olinici;
- International Conference on Advancements of Medicine and Health Care through Technology, Cluj-Napoca, 27-29 September 2007:
 - *Modeling the Precess of Protein Synthesis using a Hierarchical Self-constructing Multi-Agent System*. C.Leluțiu, **L. Leluțiu**, S. Nedevschi;
- Al 18-lea Congres Anual al Societății Române de Radioterapie și Oncologie Medicală, Cluj-Napoca, 2-4 octombrie 2008:
 - *HER2 Tessting in Breast Cancer Using Immunohistochemical Analysis and Chromogenic in situ Hybridization: The Experience of Cancer Institute on 1255 cases* – **Luminița Leluțiu**, Rareș Buiga, Liliana Resiga, Alexandru Eniu, Nicolae Ghilezan;
- Zilele Institutului Oncologic “Prof. Dr. Ion Chiricuță” 80 de ani de luptă împotriva cancerului, 1-3 octombrie 2009:
 - *Caracteristicile imunohistochimice și citogenetice ale tumorii desmoplazice cu celule mici rotunde. Analiza cazurilor diagnosticate în IOCN* – **Luminița Leluțiu**, Liliana Resiga, Mihaela Galatâr, Rodica Păiș, Rareș Buiga;
 - *HER2 status evaluation in gastric cancer: is the breast system applicable?*-R. Buiga, **L. Leluțiu**, B. Fetica, D. Todea, C. Cebotaru;
 - *Tumora solidă-pseudopapilară a pancreasului – Prezentare de caz și discuția literaturii*- Liliana Resiga, Rodica Cosnarovici, **Luminița Leluțiu**, Rareș Buiga;
- “The 12th Romanian-Hungarian Meeting of Pediatric Oncology”, 23-24 October 2009, Cluj-Napoca:
 - *BCR-ABL Positive Chronic Myeloid Leukemia in Infancy* – G. Popa, Cristina Blag, Dana Olosutean, Mirela Marian, Manuela Sfichi, Anca Ilea, **Luminița Leluțiu**.
- Congresul Național de Chirurgie, Editia a XXV-a, 3-6 mai 2010, Cluj-Napoca, Romania:
 - *Asociere morbida rară – cancer mamar și cancer de col uterin sincron – managementul therapeutic multidisciplinar* – Ignat Florin, A. Irimie, C. Lisencu, P. Achimas, E. Puscas, O. Coza, R. Tănăsescu, Carmen Lisencu, V. Popiță, Claudia Ros, **Luminița Leluțiu**;
- 2011 IEEE International Conference on Intelligent Computer Communication and Processing, 26-28 August 2011, Cluj-Napoca, Romania:
 - *An Algorithmic Approach to the Genetic Evaluation of the Patients with Chronic Myelogenous Leukemia* - Cristian Lelutiu, Sergiu Nedevschi, Luminița Leluțiu, Anca Bojan;

Acquired experience in National Projects:

1. CEEEX: Evaluarea riscului de cancer în populațiile expuse cronic la metale grele - RISCAMET – *researcher*, 2005-2007.

2. CEEX: Terapia cu celule stem în regenerarea și reconstrucția vasculară –STEMCELLS – *researcher*; 2005-2007.
- 3.CEEX: Controlul posttranscripțional al expresiei genelor in tumorile maligne. ARN de intreferență în biologia și tratamentul cancerului -ARNiARRAY – *researcher*, 2005-2007.
4. CEEX: Utilizarea tehnologiilor micro- si tissue-array în stabilirea semnăturii moleculare a tumorilor ovariene epiteliale cu potențial redus și înalt de malignitate. Identificarea genelor candidate în angiogeneza tumorilor borderline - MT ARRAY- *researcher*, 2006-2008.
5. CEEX - 5166: Predicția evoluției și estimarea răspunsului la tratament a tumorilor maligne prin modelare morfologică și hemodinamică, utilizând tehnici imagistice, matematice și de inteligență artificială- ANGIOTUMOR – *researcher*, 2006-2008.
6. CEEX - 508: Sistem inteligent de detectare și evaluare neinvazivă a fibrozei, restructurării și a nodulilor displazici ai ficatului cu ajutorul ultrasonografiei 2D/3D și a markerilor moleculari- SIDEF- *researcher*, 2006-2008.
7. CEEX -3693: Diagnostic molecular al epidermolizelor buloase.Tehnici moderne de cercetare, diagnosticare, tratament și prevenire a epidermolizelor buloase.Realizarea unui registru național al genodermatozelor- DEGEB-: *IOCN Project coordinator*, 2006-2008.
8. CEEX: Steroizi animali și implicația lor asupra tumorilor genitale la om- STEROTUM-*researcher*, 2006-2008.
9. CEEX: Optimizarea diagnosticului si terapiei cancerului vezical în contextul apariției noilor markeri tumorali urinari, a analizei citogenetice și a metodelor terapeutice minim invazive- VEZUVIUM- *researcher*, 2006-2008.
10. PN II: Celule stem placentare.O sursa alternativă pentru terapia celulară - PLACSTEM - *researcher*, 2007-2010.
11. PN-II-Idei-PCE-2008-2: Modularea răspunsului la radioterapie în cancerul de col uterin prin compuși biologici cu acțiune asupra mecanismelor moleculare ale cancerogenezei-ANGIOCOL- *researcher*, 2009-2011.

Date:
1 September 2011

Signature