

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "IULIU  
HAȚIEGANU"**

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**REZUMAT**

**"Implicațiile Mucinei 1 (MUC1) în endometrioză  
și cancerul ovarian**

Conducător științific:  
Prof. Dr. Robert Săndulescu

Doctorand:  
Dr. Iulia Diaconu

## Cuprins

<b>INTRODUCERE</b> .....	15
<b>DATE DIN LITERATURĂ</b> .....	17
1 Mucina 1 (MUC1).....	19
1.1 Funcțiile proteinei MUC1.....	21
1.2 Polimorfismul proteinei MUC1.....	22
1.3 Statusul de glicozilare al proteinei MUC1 .....	23
1.4 MUC1 ca și țintă pentru limfocitul B.....	23
1.5 MUC1 ca și țintă pentru limfocitul T.....	24
1.6 Statusul exprimării proteinei MUC1 .....	25
2 Endometrioza .....	27
2.1 Diagnosticul endometriozei.....	28
2.2 Tratamentul endometriozei.....	28
2.3 Teorii în patogeneză endometriozei.....	29
2.4 Endometrioza ca și neoplasm – dovezi histologice.....	31
3 Cancerul ovarian.....	33
3.1 Caracteristici clinico-patologice ale carcinoamelor ovariene epiteliale .....	34
3.2 Carcinomul ovarian seros.....	34
3.3 Carcinomul ovarian mucinos.....	35
3.4 Carcinomul ovarian endometrial .....	35
3.5 Carcinomul ovarian cu celule clare .....	37
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b> .....	39
1 Ipotezele și obiectivele tezei.....	41
2 MUC1: un antigen tumoral .....	43
2.1 Introducere.....	43
2.2 Ipoteză.....	44
2.3 Materiale și metode .....	45
2.3.1. Imunohistochimia .....	45
2.3.2 Detectarea MUC1 prin ELISA.....	46
2.4 Rezultate.....	46
2.4.1Validarea tehnicii imunohistochimice/tehnica LSAB .....	46
2.4.2Histopatologia uterului .....	47
2.4.3Histopatologia ovarului.....	49
2.4.4Histopatologia endometriozei.....	50
2.4.5Histopatologia tumorilor ovariene.....	51
2.4.6Răspunsul umoral: dozarea anti-MUC1 in serul uman.....	57
2.5 Discuții .....	60
3 Modelul condițional de șoarece cu leziuni de endometrioză pozitive pentru MUC1 .....	63
3.1 Introducere.....	63
3.2 Ipoteză.....	64
3.3 Materiale și metode .....	64
3.3.1Animale.....	64
3.3.2PCR .....	64
3.3.3Administrarea adenovirusului recombinant .....	65
3.3.4 Detectarea MUC1 prin ELISA.....	65
3.3.5Flow-citometrie .....	66
3.3.6Imunohistochimie .....	66

	3.3.7qPCR.....	67
	3.3.8Analiza statistică.....	67
3.4	Rezultate.....	67
	3.4.1Analiza modelelor animale pentru exprimarea MUC1 .....	67
	3.4.2Dezvoltarea endometriozei la șoarecii MUC1/Kras .....	70
	3.4.3Raspunsul imun adaptativ la șoarecii MUC1/Kras .....	71
3.5	Discuții .....	72
4	Modularea expresiei MUC1 în modele de cancer.....	75
4.1	Introducere.....	75
4.2	Ipoteză.....	77
4.3	Materiale și metode .....	77
	4.3.1Animale.....	77
	4.3.2Reactivi și linii celulare.....	77
	4.3.3Izolarea și cultivarea liniei celulare MKOSE.....	77
	4.3.4Clonarea celulelor MKOSE.....	78
	4.3.5Creșterea celulelor MKOSE .....	78
	4.3.6Dezvoltarea liniei celulare de cancer ovarian IG10-MUC1... 78	
	4.3.7Analiza carcinogenicității liniei celulare în modele animale 78	
	4.3.8Flow citometrie.....	79
	4.3.9Imunohistochimie .....	79
4.4	Rezultate.....	80
	4.4.1Expresia MUC1 în linii celulare umane .....	80
	4.4.2Tratamentul liniilor celulare cu inhibitori.....	81
	4.4.3Expresia MUC1 în modele animale.....	84
	4.4.4Expresia MUC1 în modelul animal singenic.....	85
	4.4.5Raspunsul imun adaptativ.....	86
4.5	Discuții .....	86
5	Concluzii finale.....	89
6	Originalitatea tezei .....	91
	<b>REFERINȚE.....</b>	<b>93</b>

**Cuvinte cheie:** Mucina 1 (MUC1), endometrioza, cancerul ovarian, raspunsul imun, factor de prognostic, marker de diagnostic, modele animale.

Mai mult de 90% din cazurile de cancer ovarian sunt rezultatul transformării maligne a epitelului ovarian. În țările occidentale cancerul ovarian epitelial este principala cauză de mortalitate dintre afecțiunile tractului genital feminin. Numeroase studii arată că endometrioza poate induce cancerul ovarian și în special este dovedită implicarea ei în dezvoltarea carcinomului cu celule clare și a adenocarcinomului endometrioid. Endometrioza este o boala benignă, definită de prezența țesutului endometrial uterin în afara uterului. Endometrioza, ca și cancerul ovarian, se caracterizează prin invazia celulelor și creșterea necontrolată a tumorilor. A fost demonstrat că mutații ale genelor care sunt implicate în patogeneză endometriozei duc la progresia cancerului ovarian. Studii intensive încearcă să înțeleagă legătura dintre endometrioza și cancerul ovarian. S-a pus accentul pe markeri, care pot prezice progresia cancerului ovarian de la leziuni benigne de endometrioza. Metodele de prevenire a cancerului ovarian sunt de interes primar. Depistarea precoce a leziunilor preneoplazice este esențială pentru supraviețuirea pe termen lung. Chiar dacă patofiziologia endometriozei este puțin cunoscută se presupune că aceste leziuni se datorează unei deficiențe de raspuns a sistemului imunitar. Mucina umană 1 (MUC1) a fost identificată ca marker a leziunilor preneoplazice a mai multor boli cronice inflamatorii. Glicoproteina MUC1 transmembranară este un membru al familiei mucinelor și este exprimată la nivelul bazal al celulelor normale epiteliale ductale ale organelor secretorii. Proteina este supra exprimată și

aberant glicozilată în majoritatea carcinoamelor. Un nivel ridicat de MUC1 poate indica progresia tumorii și în special un rol în procesul de metastazare.

În țesuturile normale, MUC1 este exprimată în componenta epitelială a mai multor organe. În carcinoamele corespunzătoare, MUC1 are un nivel crescut de expresie, este nepolarizată și hipo glicozilată inducând o imunogenitate crescută a proteinei. Expresia lui MUC1 crește odată cu progresia bolii. Dacă proteina este la niveluri scăzute sau absente în țesutul normal, în leziunile precursorale ale neoplasmelor MUC1 pozitive, proteina este supra exprimată. Informațiile incomplete cu privire la rolul imunității în endometrioză și cancerul ovarian ar putea fi explicate parțial prin faptul că, studii relevante care necesită monitorizarea înainte și după inducerea bolii sunt imposibil de realizat la oameni, iar modelele animale utilizate până în prezent folosind primare sunt foarte costisitoare. Având în vedere acestea, există o nevoie imperativă de noi modele animale care ar putea dezvălui o mai bună înțelegere a sistemului imun în patogeneza endometriozei și a cancerului ovarian.

Deși acest studiu evidențiază modificări ale expresiei proteinei MUC1 și consecințele acesteia asupra sistemului imun, credem că MUC1 ar putea fi direct implicată în patogeneza endometriozei și a cancerului ovarian.

## 1. Obiectivele tezei

- a. Confirmarea exprimării proteinei MUC1 în probe umane cu scopul de a evidenția utilizarea sa ca marker de prognostic și diagnostic în endometrioză și cancerul ovarian.
- b. Identificarea unui nou model animal MUC1/Kras cu endometrioză indusă. Acest model ar putea servi pentru o mai bună înțelegere a imuno-biologiei proteinei MUC1 și implicațiile sale în patogeneza și dezvoltarea endometriozei
- c. Dezvoltarea de noi linii celulare primare care exprimă MUC1 pentru a analiza efectele inhibitorii/stimulatorii ale proteinei.
- d. Identificarea unui model animal pentru cancerul ovarian în care MUC1 să fie exprimată, servind ca și platformă pentru testarea de noi imunoterapii.

## 2. Materiale și metode

**Probe umane:** oferite de către Institutul Oncologic „Prof. Dr. Ion Chiricuță”, Cluj-Napoca, România. Probele au fost colectate și depozitate într-o bancă de țesuturi.

**Animale:** șoarecii transgenici heterozigoți MUC1 + / - (MUC1 șoareci) au fost crescuți la zoobaza din Magee Womens Hospital, Pittsburgh, USA. Șoarecii Kras au fost obținuți de la zoobaza National Institute of Health (NIH), USA. Toate procedurile experimentale folosite în acest studiu au fost aprobate de către IACUC de la Universitatea din Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA. Toate experimentele cu animale și procedurile utilizate sunt descrise în detaliu pentru fiecare studiu în parte.

**Linii celulare:** SKOV3, TOV-112, MCF7, HuT28 și OvCa 420, 429, 432, 433 au fost achiziționate de la ATCC, USA și menținute în condițiile recomandate de producător. Liniile celulare MKOSE, OSE și IG10-MUC1 au fost dezvoltate în cadrul Departamentului de Imunologie, Universitatea din Pittsburgh și cultivate așa cum este descris în teză.

**Imunohistochimie (IHC):** metoda detaliată / protocolul optimizat pentru toți anticorpii utilizați în această lucrare sunt prezentate în teză. Pe scurt, secțiuni de parafină de 4 microni au fost incubate cu anticorpii primari în conformitate cu diluțiile obținute după validarea fiecărui anticorp. Secțiunile au fost incubate cu anticorpii secundari corespunzători și reacția imunologică a fost evidențiată cu 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Pozitivitatea a fost notată în funcție de intensitatea colorației și a numărului de celule pozitive cu +, ++, +++.

**ELISA:** Pe scurt, plăci de 96 de godeuri au fost incubate peste noapte cu peptida MUC1. A doua zi s-a aplicat serul și au fost tratate cu anticorpi. Plăcile au fost spălate și apoi incubate cu soluție de substrat pentru evidențierea complexului imunologic format. Achiziția de date și analiza au fost efectuate utilizând software-ul Ascent pentru Multiskan (Thermo Scientific).

**Flow-citometrie:** fenotipul imunitar al limfocitelor de la șoareci și analiza liniilor celulare au fost efectuate în conformitate cu protocoalele Bioscience BD. Pe scurt, celulele au fost colectate de la șoareci și

disociate mecanic. Celulele izolate au fost marcate cu anticorpi în termen de 24 de ore. Pentru detectarea citokinelor intracelulare, celulele au fost stimulate cu PMA și ionomicină, în prezența Plug Golgi. Toți anticorpii au fost diluați în conformitate cu instrucțiunile producătorilor. Celulele marcate au fost analizate cu citometru LSR II utilizând softul FACSDiva pentru analiza datelor.

**PCR și qPCR:** codițele de șoareci au fost folosite pentru izolarea de ADN și s-a testat prezența genei Kras de tip sălbatic și mutanta LSL-KrasG12D / +. Condițiile de PCR sunt descrise în detaliu în teză. ARN-ul total a fost izolat cu reactiv Trizol și apoi purificat cu ajutorul kitului RNeasy Mini. Rezultatele reprezintă cuantificarea nivelului de expresie al genelor cu metoda PCR în timp real cu ajutorul tehnologiei ABI Prism 7700 și Testele TaqMan.

### **3. Studiul 1: MUC1: antigen tumoral**

MUC1 este o glicoproteină de suprafață prezentă în leziunile de endometrioză și exprimată de către toate tipurile de tumori ovariene epiteliale. Proteina este intens studiată ca și antigen tumoral asociat și în prezent sunt ipoteze care susțin folosirea proteinei ca și vaccin pentru tratamentul cancerului. Imunohistochimie este principala metodă de diagnostic de detecție a proteinelor în țesuturile umane. Nivelul de expresie al proteinelor confirmat prin IHC urmând a fi corelat cu datele clinice.

#### **3.1 Ipoteză**

Nivelul de expresie al proteinelor în țesuturile umane pot fi indicatori precoce pentru dezvoltarea unor leziuni canceroase. Pentru a stabili nivelul de expresie al proteinelor este necesară o metodă de detecție riguroasă a cărei rezultate pot fi corelate cu datele clinice. O asemenea metodă este imunohistochimie prin care putem detecta proteinele de interes (în special MUC1), în țesuturi umane, începând cu țesut normal, leziuni precanceroase (ex. endometrioza) și finalizând cu țesut ovarian malign. Datele noastre preliminare de la analiza histologică ar putea servi ca o platformă pentru studii suplimentare pentru a valida MUC1 ca un marker de prognostic și diagnostic pentru endometrioza și cancerul ovarian.

#### **3.2 Rezultate și discuții**

Tumorile sunt țesuturi heterogene cu morfologie celulară diferită, cu o rată de proliferare crescută și cu multiple abordări de tratament. Factorii care favorizează dezvoltarea tumorilor rămân în mare parte necunoscute. Astfel, există o nevoie imperativă de noi markeri tumorali de prognostic pentru a identifica noi metode de tratament. Există mai multe clase de markeri tumorali exprimați în sânge care indică apariția leziunilor canceroase: PSA pentru cancerul de prostată, CA-125 în cancerul ovarian sau CEA pentru cancerul colorectal. Cu toate acestea, expresia acestor markeri, nu este un rezultat de diagnostic final a cancerului. Analiza histologică a tumorilor este principala metodă de diagnostic și indiscutabil cea mai fiabilă. În prezent, analiza histologică este întotdeauna însoțită de imunohistochimie pentru determinarea markerilor tumorali care conferă o mai bună înțelegere a originii tumorii și oferă opțiuni de tratament.

Deoarece imunohistochimie a devenit o metodă indispensabilă pentru diagnostic și pentru testarea de noi markeri de prognostic, în acest studiu am optimizat metoda pentru condițiile noastre de laborator așa cum este descris în Studiul 1 și Capitolul 2. Am analizat o varietate de markeri pe specimene umane și am evaluat panouri diferite de anticorpi pentru diferite tipuri de cancer. După efectuarea acestor analize am constatat că tehnica de imunohistochimie / LSAB poate da rezultate fals negative și fals pozitive. Totuși, aceste probleme pot fi rezolvate printr-o examinare atentă a colorației de către un patolog, care poate folosi datele clinice și morfologia țesutului pentru elaborarea diagnosticului final. Numărul de antigeni care pot fi detectați prin imunohistochimie este în creștere tot timpul. În teorie, fiecare substanță care este un antigen și antigenicitatea sa este parțial conservată în țesuturi ar putea fi detectată prin această metodă. Cu ajutorul tehnologiei monoclonale o gamă largă de anticorpi au devenit disponibili. Chiar dacă imunohistochimie / tehnica LSAB este foarte utilă, pentru elaborarea diagnosticului final histopatologic trebuie luate în considerare toate aspectele țesutului și a bolii cum ar fi: morfologia primară a țesutului exprimată prin colorația hematoxilină-eozină, datele clinice ale bolii și panourile de IHC folosite.

MUC1 este o glicoproteină care suferă modificări de glicozilare în patogenza bolii. În continuare, obiectivul nostru principal este de a analiza nivelul de expresie a acestui marker pornind de la țesut

normal la leziuni maligne. Progresia leziunilor preneoplazice la condiții maligne este un proces care necesită timp. MUC1 își schimbă statusul de glicozilare în timpul progresiei bolii. În țesuturile umane normale expresia MUC1 este scăzută/negativă pe suprafața epiteliului ovarian. În fig. 10 suprafața epiteliului și a stromei ovariene sunt negative pentru MUC1, confirmând rezultatele din literatură despre expresia de proteine MUC1 în țesutul normal. MUC1 a fost identificat ca un marker al condițiilor preneoplazice pentru mai multe boli cronice inflamatorii. În studiul acesta evidențiem diferite izoforme (normală-hiperglicozilată și tumorală-hipoglicozilată) ale lui MUC1 în țesuturi de la pacienți cu endometrioza. Ambele izoforme au fost găsite pozitive în aceste țesuturi, ceea ce indică faptul că MUC1 suferă modificări de glicozilare în dezvoltarea endometriozei și ar putea fi folosit ca și marker de prognostic pentru progresia acestor leziuni. Studiile noastre imunohistochimice în diferite tumori ovariene umane au arătat că prezența proteinei poate fi corelată cu gradul de proliferare al acestor tumori invazive, fiind un factor de predicție a unei evoluții nefavorabile. În toate cazurile de cancer ovarian epitelial, am observat o expresie crescută atât a MUC1 normal cât și a izoformei tumorale.

Imunologia tumorii este diversă și devine clar faptul că este principalul factor care trebuie rezolvat pentru înțelegerea modului în care tumorile apar și se dezvoltă. Supravegherea apariției și dezvoltării tumorilor de către sistemul imunitar este deficitară din cauza unor factori încă necunoscuți. Tumorile au capacitatea să evadeze și să scape de vigența sistemului imunitar și prin inducerea unui mediu înconjurător imunosupresor. Răspunsul imun umoral anti-MUC1 la pacienții cu cancer se corelează cu rata de supraviețuire a pacienților cu cancer. În studiul nostru (fig. 20-22.), toate cele nouă cazuri cu cancer ovarian au niveluri detectabile de anticorpi IgG, IgM și într-o mai mică măsură anticorpi IgA. În patru din patru afecțiuni maligne testate (fig. 23.) am observat o creștere a nivelului de anticorpi anti-MUC1. Pacienții 1-3 au un nivel scăzut de anticorpi în timp ce pacienții 4-9 au răspunsuri crescute de anticorpi. Deși toți pacienții au leziuni pozitive pentru MUC1, nu răspund la fel în ceea ce privește nivelul de anticorpi indicând importanța supravegherii sistemului imunitar.

Dacă MUC1 a fost exprimată doar în tractul luminal al glandelor din uterul normal și absentă în epiteliul ovarian, în carcinoamele corespunzătoare a fost exprimată aberant atât forma normal glicozilată cât și omoloaga sa hipoglicozilată. Mai mult decât atât, aceste rezultate ar putea fi considerate ca evidențe pentru folosirea MUC1 ca marker de prognostic pentru estimarea potențialului apariției tumorilor ovariene epiteliale de la leziuni de endometrioza. Chiar dacă a fost sugerat că unele carcinoame ovariene, ca cel cu celule clare sau cel endometrioid sunt derivate din endometrioza, în ceea ce privește nivelul de expresie al lui MUC1 nu a fost nici o diferență. Aceste rezultate sunt în conformitate cu literatura și dovedesc încă o dată importanța de a studia modalitățile de a preveni transformarea malignă a leziunilor precanceroase, în cazul nostru endometrioza.

Există o nevoie urgentă de noi markeri pentru prognosticul și diagnosticul leziunilor carcinoamelor în vederea unor noi opțiuni de tratament. În acest sens, proteina propusă în acest studiu, MUC1, este un bun marker pentru leziunile endometriotice care pot da naștere anumitor carcinoame și reprezintă concomitent o nouă opțiune de tratament al acestor leziuni prin folosirea acestei proteine ca și vaccin.

#### **4. Studiul 2: Modelul de soarece conditional MUC1-pozitiv cu leziuni de endometrioza**

Studiile anterioare au raportat un model de soarece în care activarea oncogenei Kras în epiteliul de suprafață ovarian poate induce leziuni, cum ar fi endometrioza, care ulterior poate da naștere unor tumori ovariene endometrioidice.

##### **4.1 Ipoteză**

Pe baza studiului anterior al acestei teze în care am arătat că MUC1 ar putea fi utilizat ca și marker al epiteliului glandular în endometrioza și cancerul ovarian, un nou model animal, cum ar fi modelul soarecelui MUC1/Kras, ar putea elucida unele din mecanismele prin care sistemul imunitar are influență asupra genezei și progresiei endometriozei.

##### **4.2 Rezultate și discuții**

Cel mai bun model animal pentru studierea patogenezei endometriozei ar fi un model animal în care putem induce boala și ulterior să urmărim progresia acesteia, împreună cu analiza unui marker, care este exprimat încă din faze incipiente și suferă modificări în diferite stadii ale bolii. Pentru a putea genera

acest model am încrucișat șoareci Kras descriși anterior, care sunt capabili de a dezvolta endometrioză, cu șoareci transgenici MUC1 care exprimă proteina în diferite stadii de glicozilare în funcție de stadiul bolii. În acest fel, avem un model în care boala poate să apară și să prezinte diferite forme de exprimare ale proteinei MUC1 care ne va conferi o bună platformă pentru evaluarea răspunsului imun. Șoarecii Kras, MUC1 + și MUC1/Kras au fost analizați pentru nivelul de expresie al proteinei umane MUC1 în epiteliul ovarian și în uter. Cum era de așteptat, în mod normal, proteina este exprimată de celulele glandulare și lumenale epiteliale ale endometrului și este prezentă la niveluri scăzute pe suprafața epiteliului ovarian. În uterul șoarecilor MUC1 proteina este exprimată în căptușeala endometrului și în celulele epiteliale ale structurilor glandulare. Totuși, acest model nu este 100% comparabil pentru a evalua cu exactitate boala umană, datorită diferențelor dintre proteina de șoarece Muc1 și umană MUC1. Cele două proteine au 87% omologie în coada citosolică și domeniul extracelular, domenii care sunt responsabile de interacțiunile celule-celule, receptor-ligand și în reglementarea sistemului imunitar. Pentru a studia proteina de șoarece Muc1 am avea nevoie de un model de șoarece singenic, dar pentru acest model încă nu s-au dezvoltat reactivii necesari și posibilitățile de analiză ar fi restricționate.

Folosind noul nostru model, șoarecii MUC1/Kras, am putut observa dezvoltarea leziunilor de endometrioză și am observat modificări histopatologice importante la nivelul ovarelor. Leziunile de endometrioză în acești șoareci au exprimat un nivel ridicat de MUC1. Extravazarea celulelor și migrarea ectopică a acestora conferă un mecanism de supraviețuire al acestor leziuni crescând gradul imunogenic al proteinei. În șoarecii MUC1/Kras cu leziuni endometriotice am observat și un nivel ridicat de anticorpi anti-MUC1 specifici cum ar fi IgM și IgG1. Acești anticorpi ar putea fi o indicație a răspunsului imun de tip Th2 așa cum s-a observat și în studii anterioare în literatură. Studii suplimentare privind valoarea prognostică a proteinei MUC1 în geneza și dezvoltarea endometriozei ar trebui să fie luate în considerare.

Componenta celulară a sistemului imun adaptativ este mediată prin celulele T helper (CD4 +) și T citotoxice (CD8 +). Dezechilibrul între diferitele subpopulații de celule T poate limita răspunsul imun. Am observat o creștere a subpopulației de celule T reglatoare CD4 + Foxp3 +, care este un subset de celule T helper responsabile pentru suprimarea sistemului imunitar inducând o stare de toleranță pentru auto-antigene. În plus, când am analizat ganglionii limfatici de la șoarecii MUC1/Kras am observat prezența celulelor Foxp3+, concomitent cu prezența acestor celule la nivelul leziunilor. Cu toate acestea, acest tip de celule nu a fost detectat în sânge la femeile cu endometrioză.

Luate împreună, toate aceste rezultate de la noul nostru model animal, MUC1/Kras, demonstrează generarea unui răspuns imun antitumoral față de aceste leziuni datorită exprimării endogene a proteinei. Acești șoareci transgenici pot oferi un model util pentru a investiga mai departe mecanismele care intervin în toleranța imunologică la antigenele tumorale și va facilita studiarea de formule noi de imunoterapie anti-MUC1. Introducerea acestui model ar facilita studii suplimentare privind rolurile proteinei MUC1 în dezvoltarea și progresia endometriozei.

## **5. Studiul 3: Modularea MUC1 in modele animale de cancer**

Studiile pe linii celulare tumorale indică faptul că tipul și nivelul de expresie al proteinei MUC1 pot modula răspunsuri imune împotriva acestor celule. MUC1 este diferent glicozilată în multe celule canceroase, expunând epitopi specifici tumoralii care pot declanșa un răspuns imun. Cu toate acestea, MUC1 are rol și în protejarea celulele canceroase de atacul celulelor imunitare, indicând atât rolul imunostimulator cât și cel imunosupresor al acestei proteine.

### **5.1 Ipoteză**

MUC1 este exprimată la un nivel scăzut în ovarele femeilor sănătoase. În cazul endometriozei, expresia MUC1 crește în timp cu progresia bolii și în cele din urmă este supra exprimată în toate tipurile histologice de carcinoame ovariene epiteliale. Ipoteza de lucru al acestui studiu este că expresia lui MUC1 poate fi inhibată cu medicamente care influențează anumite căi de semnalizare și putem modula nivelul de expresie al proteinei în favoarea noastră. Acest lucru ar putea fi evidențiat prin evaluarea proteinei în noi modele singenice de șoareci, modele ce permit inducerea cancerului ovarian și analiza răspunsului imun al șoarecilor împotriva proteinei MUC1. Cum am arătat în studiul 2, MUC1 poate induce un răspuns

imun de tip Th2 în șoarecii MUC1/Kras cu endometrioză concomitent cu prezența celulelor T reglatorii în ganglionii limfatici și leziunile endometriotice și un nivel crescut de anticorpi anti-MUC1. Un alt obiectiv al tezei este studiul modulării expresiei proteinei și în stadii mai avansate de boală cum este cancerul ovarian. Pentru aceasta au fost elaborate și analizate noi modele animale pentru o mai bună înțelegere a mecanismului de funcționare al proteinei.

## 5.2 Rezultate și discuții

S-a demonstrat anterior că proteina MUC1 are rol în proliferarea și invazia celulelor tumorale prin prevenirea morții celulare. În acest studiu, am evaluat gradul de expresie al MUC1 în diferite linii celulare de carcinoame umane. Majoritatea liniilor celulare testate, 7 din 8, și toate cele 5 linii celulare de cancer ovarian au exprimat un nivel crescut de MUC1 (fig. 26 și 27). În al doilea rând, am dezvoltat un nou model animal singeneic care exprimă MUC1 în tumori ovariene de șoarece.

Diferitele grade de glicozilare ale proteinei MUC1 afectează profilul epitopilor prezentați de celulele B, care sunt responsabile de răspunsul imun umoral. Acesta a fost unul dintre motivele pentru care se crede că MUC1 în calitate de antigen asociat tumorilor poate fi utilizat în imunoterapie. Mucinele joacă un rol important în modularea semnalului și comportamentului celulelor canceroase, ele contribuind la potențarea carcinogenității acestora și a gradului lor de metastazare. Studii recente au caracterizat o cale de semnalizare sensibilă la rapamicină care reglementează traducerea specifică a unei clase de mRNAs în celulele umane. Activarea proteinei mTOR poate fi inhibată prin tratamentul cu rapamicină. Scopul acestui studiu a fost de a determina dacă tratamentul cu rapamicină ar putea induce modificări de expresie ale proteinei MUC1 în linii celulare de cancer ovarian. În consecință, am analizat doi agenți de inhibare a proteinei mTOR, rapamicina și LY care acționează pe calea de semnalizare în aval de mTOR. Nivelul de expresie al proteinei a fost inhibat pentru toate concentrațiile de agent folosit corelând nivelul de expresie cu doza folosită. Aceste rezultate sunt benefice pentru o evaluare ulterioară a gradului de inhibare a lui MUC1 în celulele canceroase. Rolul proteinei MUC1 în patogeneză bolii ar putea consta în declanșarea unor mecanisme anti-apoptotice, de supraviețuire și amplificare a agresivității tumorii.

Linia celulară MKOSE dezvoltată în acest studiu este singura linie celulară disponibilă în prezent pentru cancerul ovarian de șoarece care exprimă endogen o proteină umană. Linia celulară a fost dezvoltată de la șoareci sănătoși MUC1/Kras. Rata de transformare și cinetica liniei celulare au fost comparate cu o linie celulară derivată de la șoarecii C57BL/6 tipul sălbatic. Nu a fost observată nici o diferență între cele două linii celulare, fapt care demonstrează că oncogenul Kras nu este esențial pentru transformarea *in vitro*.

Mai mult, am dezvoltat încă o linie celulară de cancer ovarian IG-10 care să exprime antigenul MUC1 uman. Această linie celulară a fost folosită pentru a induce tumori într-un model animal singeneic. După ce am identificat modelul animal cu tumori induse care să exprime un antigen uman am analizat influența sistemului imun. Tumorile s-au răspândit peste tot în cavitatea peritoneală și au fost însoțite de ascită hemoragică. Am arătat că expresia de MUC1 în aceste tumori a fost menținută în timp, concomitent cu prezența antigenului în celulele din ascită. Lichidul de ascită a fost analizat pentru prezența de celule ale sistemului imunitar, cum ar fi celule T reglatorii și subclasa Th 17. Aceste tipuri de celule au fost depistate atât în lichidul de ascită cât și în ganglionii limfatici. Celulele Th17 pot contribui la stimularea sistemului imun împotriva tumorii, prin inducerea unui răspuns de tip Th1, finalizând cu o rată de supraviețuire crescută a pacienților cu cancer. Pe de altă parte, există câteva teorii care susțin că celulele Th17 pot promova creșterea tumorii și progresia acesteia. Toate aceste studii demonstrează că este nevoie de analize suplimentare pentru a înțelege rolul celulelor Th17 în biologia tumorii. Cu toate acestea, observațiile noastre că unele citokine inflamatorii pot influența expresia lui MUC1 în epiteliul ovarian de suprafață au relevanță nu numai în contextul biologiei cancerului, dar și în înțelegerea fiziologiei ovarului normal. În experimentele noastre arătăm că citokinele inflamatorii induc nivele crescute de expresie ale proteinei MUC1, care sugerează rolul acesteia în tumorigeneza ovarului.

În concluzie, studiul nostru prezintă pentru prima dată un model de șoarece tumoral singeneic pozitiv pentru antigene umane. Acest model ne-a permis să studiem imunobiologia proteinei MUC1 atât *in vitro* cât și *in vivo*.



## 6. Concluziile finale

Riscul de a dezvolta un cancer ovarian la femei este de aproximativ 1,5%. Depistarea cancerului ovarian este adesea făcută în stadiile avansate ale bolii prin măsurarea de markeri tumorali și din acest motiv este nevoie de noi metode de detecție a acestor leziuni în stadii incipiente.

Dezvoltarea leziunilor ectopice presupune că celulele endometriale sunt capabile de implantare și proliferare în țesuturi non-uterine. În acest studiu am postulat că similar cu rolurile proteinei MUC1 în procesul de metastazare, proteina poate juca un rol important în creșterea și / sau diseminarea celulelor endometriale. Studii pe celule tumorale și celule T au arătat că MUC1 este o moleculă pro-adezivă și este capabilă să lege molecule de adeziune prin intermediul reziduurilor de carbohidrați. Aceste caracteristici pot fi importante pentru migrația și metastazarea tumorilor și ar putea explica corelația între nivelul de exprimare al lui MUC1 cu potențialul de metastazare văzut în unele forme de cancer. În acest studiu am arătat că toți pacienții cu cancer ovarian au niveluri detectabile de anticorpi IgG, IgM, și într-o anumită măsură IgA în ser, care ne conduce la concluzia că o terapie imunitară ar putea fi un beneficiu real pentru tratamentul lor. Deși toți pacienții au leziuni cu pozitivitate intensă pentru MUC1, nivelul anticorpilor este diferit. Toate aceste rezultate indică importanța supravegherii imune în timpul prezentării antigenilor indicată și de prezența limfocitelor CD 20+ și CD 3+ la imunohistochimie

MUC1 asociat tumorilor este diferit de MUC1 prezent în celulele normale. Diferența cea mai mare constă în statusul de glicozilare al celor două proteine. Dacă MUC1 normal (clona HMPV) este o moleculă hiperglicozilată și este exprimată în toate țesuturile precanceroase și maligne, forma sa tumorală (clona UV-4H5) este hipoglicozilată și este exprimată modest în leziunile precanceroase și supra exprimată în carcinoamele ovariene. Modularea exprimării MUC1 este intens studiată de mai multe grupuri, și de asemenea, cum am arătat și în acest studiu, folosind inhibitori ale diferitelor căi de semnalizare, putem reduce exprimarea proteinei, astfel încât putem modula expresia proteinei în favoarea noastră.

În timp ce prezența și rolul proteinei MUC1 în endometrul eutopic (normal) este abordată de numeroase studii, mai puțin se știe despre rolurile lui MUC1 și / sau proprietățile imunogene ale acesteia în leziunile extrauterine de endometrioză. În această teză, am studiat histologia a două cazuri de endometrioză și am confirmat prin IHC că MUC1 este pozitivă în leziunile de endometrioză la toți cei două pacienți. MUC1 este exprimată în epiteliului glandular de endometrioză benignă și este supra exprimată în toate cazurile de cancer ovarian epitelial. În concluzie, am identificat că expresia lui MUC1 crește de la țesutul normal la un nivel înalt de exprimare în carcinomul ovarian.

Lipsa de modele animale adecvate face dificilă analiza imunobiologiei proteinei în patogeneza bolii. În acest studiu am stabilit două modele animale care exprimă endogen proteina umana MUC1. În primul rând, am arătat expresia MUC1 în timpul dezvoltării leziunilor de endometrioză în șoarecii Kras/MUC1 și răspunsul imun declanșat de expresia proteinei. Cum leziunile au progresat, au fost observate modificări cantitative (supra expresie) și calitative (hipoglicozilare) ale proteinei MUC1 și o inducere a unui răspuns imun de tip Th2. Prin generarea șoarecilor MUC1/Kras am dezvoltat leziuni similare cu endometrioza umană pozitive pentru MUC1, oferind un nou model mai relevant pentru a studia boala umană. În al doilea rând, modelul de animal singeneic stabilit (C57Bl6-IG10-MUC1), ne oferă o mai bună înțelegere a implicațiilor lui MUC1 în cancerul ovarian și a răspunsului imun declanșat împotriva tumorii.

Studiul de expresie al proteinei MUC1 în țesuturi umane și posibilitatea de a folosi proteina ca și un marker tumoral pentru diagnosticul precoce de cancer ovarian pot conduce la curabilitatea bolii maligne.

**“IULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE  
AND PHARMACY**

**Doctoral Thesis**

**“The implications of Mucin 1 (MUC1) in  
endometriosis and ovarian cancer”**

Thesis supervisor:  
Prof. Dr. Robert Săndulescu

Doctoral student:  
Dr. Iulia Diaconu

## TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b> .....	15
<b>REVIEW OF THE LITERATURE</b> .....	17
1 Mucin 1 (MUC1).....	19
1.1 Functions of MUC1.....	21
1.2 Polymorphism of the MUC1 protein.....	22
1.3 MUC1 O-glycosylation and immunogenicity/antigenicity.....	23
1.4 MUC1 as a B cell immunotarget.....	23
1.5 MUC1 as a T cell immunotarget.....	24
1.6 MUC1 expression pattern.....	25
2 Endometriosis.....	27
2.1 Diagnosis of endometriosis.....	28
2.2 Treatment of endometriosis.....	28
2.3 Theories in pathogenesis of endometriosis.....	29
2.4 Endometriosis as a neoplasm – histological proofs.....	31
3 Ovarian cancer.....	33
3.1 Clinicopathological features of epithelial ovarian carcinomas.....	34
3.2 Serous ovarian carcinoma.....	34
3.3 Mucinous ovarian carcinoma.....	35
3.4 Endometrioid ovarian carcinoma.....	35
3.5 Clear cell ovarian carcinoma.....	37
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b> .....	39
1 Hypothesis and aims of the thesis.....	41
2 MUC1: a tumor antigen.....	43
2.1 Introduction.....	43
2.2 Hypothesis.....	44
2.3 Materials and methods.....	45
2.3.1Immunohistochemistry.....	45
2.3.2MUC1-specific antibody detection by ELISA.....	46
2.4 Results.....	46
2.4.1Validation of immunohistochemistry/LSAB technique.....	46
2.4.2Histopathological analysis of normal human uterus.....	47
2.4.3Histopathological analysis of normal human ovaries.....	49
2.4.4Histopathological analysis of endometriosis.....	50
2.4.5Histopathological analysis of ovarian tumors.....	51
2.4.6MUC1 specific humoral responses in human sera.....	57
2.5 Discussion.....	60
3 Conditional mouse model for human MUC1-positive Endometriosis.....	63
3.1 Introduction.....	63
3.2 Hypothesis.....	64
3.3 Materials and methods.....	64
3.3.1Mice.....	64
3.3.2PCR genotyping.....	64
3.3.3Administration of recombinant adenovirus.....	65
3.3.4MUC1-specific antibody detection by ELISA.....	65

	3.3.5	Flow-cytometry	66
	3.3.6	Immunohistochemistry	66
	3.3.7	Quantitative polymerase chain reaction – qPCR	67
	3.3.8	Statistical analyses	67
3.4		Results	67
	3.4.1	Analysis of new animal models for MUC1 expression	67
	3.4.2	Development of endometriosis in MUC1/Kras mice	70
	3.4.3	Adaptive immune responses in MUC1/Kras mice	71
3.5		Discussion	72
4		Modulation of MUC1 in cancer models	75
4.1		Introduction	75
4.2		Hypothesis	77
4.3		Materials and methods	77
	4.3.1	Animals	77
	4.3.2	Reagents and cell lines	77
	4.3.3	Isolation and culture MKOSE cell line	77
	4.3.4	Cloning of MKOSE cells	78
	4.3.5	Growth of MKOSE cells	78
	4.3.6	IG10-MUC1 ovarian cancer line	78
	4.3.7	In vivo tumorigenicity	78
	4.3.8	Flow cytometry	79
	4.3.9	Immunohistochemistry	79
4.4		Results	80
	4.4.1	MUC1 expression in human cell lines	80
	4.4.2	Drug treatment of OvCa 432 modulates MUC1 expression	81
	4.4.3	Progressive expression of MUC1 during ex vivo Transformation	84
	4.4.4	MUC1 expression in a novel syngeneic ovarian tumor bearing model	85
	4.4.5	Adaptive immune responses	86
4.5		Discussion	86
5		Final conclusions	89
6		Originality of the thesis	91
		<b>REFERENCES</b>	<b>93</b>

**Key words:** Mucin 1 (MUC1), endometriosis, ovarian cancer, immune response, prognostic marker, diagnostic marker, animal models.

More than 90% of the ovarian cancers are arising from the epithelium. Epithelial ovarian cancer counts as the deadliest malignancy of the female reproductive tract in Western countries. Increasing body of evidences show that endometriosis can induce ovarian cancer and of particular interest is the cause of the clear cell carcinoma and endometrioid adenocarcinoma. Endometriosis is a benign disease, defined as the presence of endometrial foci, uterine-like tissue, which frequently appears outside the uterus. Endometriosis, like ovarian cancer, is characterized by cell invasion and uncontrolled growth. It has been shown that mutations in the genes which are implicated in the pathogenesis of endometriosis lead to the progression of the ovarian cancer. Intensive studies are trying to understand the link between endometriosis and ovarian cancer. The focus has been made on markers which can predict the progression of ovarian cancer from these benign lesions like endometriosis. Prevention therapies for ovarian cancers are of primary interest and early detection of preneoplastic lesions is essential for long-term survival. Even though, the pathophysiology of endometriosis is poorly understood, it has been proposed that an impaired immune surveillance can induce these lesions. Human Mucin 1 (MUC1) has

been identified as a marker for preneoplastic lesions and several chronic inflammatory diseases. The MUC1 transmembrane glycoprotein is a member of the mucin family that is expressed at a basal level by normal ductal epithelial cells of secretory organs, and is over expressed and aberrantly glycosylated in most cases of adenocarcinoma. An elevated level of MUC1 protein plays a role in tumor progression, especially in the process of metastasis.

The expression of mucin genes exhibits different patterns as: organ-, tissue and cell-specific. In normal tissues, MUC1 is expressed in the epithelial component of many organs. In the corresponding carcinomas, MUC1 has frequently been found to have increased unpolarized expression as well as altered glycosylation, allowing for greater immunogenicity by revealing otherwise masked epitopes in its protein core. MUC1 expression increases with disease pathogenesis. If low levels or absent in normal tissue, the protein is already over expressed in preneoplastic lesions which are the precursor lesions of MUC1 positive neoplasms. The incomplete information on the role of immunity in endometriosis and ovarian cancer could partly be explained by the fact that, often times relevant studies, requiring monitoring responses before and after disease induction are impossible in humans and very costly in animal models like the ones employed so far, using primates. Given these, there is an imperative need of new animal models which could reveal a better understanding of the immune system in the pathogenesis of endometriosis and ovarian cancer.

Although we are focused on this study to analyze changes in MUC1 protein expression and consequences on immunogenic properties of the molecule, we believe that MUC1 could potentially be directly implicated in disease pathogenesis.

## 1. Aims of the thesis

- a. To confirm the expression pattern of MUC1 in human samples giving more proofs for its use as prognostic and diagnostic marker; a good target for new immunotherapy
- b. To establish new MUC1/Kras animal model with induced endometriosis. This model could serve for a better understanding of MUC1 immunobiology and its implications in the pathogenesis and development of endometriosis
- c. To develop new primary cell lines expressing MUC1 to analyze the inhibition/stimulation pattern
- d. To develop a new MUC1 expressing tumor model, this could serve as a platform for testing new immunotherapies

## 2. Materials and methods

**Human samples:** were provided by the Institute of Oncology, Cluj-Napoca, Romania and have been collected and stored in a tissue bank. They were provided completely deidentified and fall under the exempt category.

**Mice:** heterozygous MUC1<sup>+/-</sup> transgenic mice (MUC1 mice) were bred at the animal facility of Magee Women's Research Institute. The Kras mice were obtained from the NIH mouse repository. All the experimental procedures used in this study were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA. All the animal experimental design and procedures are described in details for each study.

**Cell lines:** SKOV3, TOV-112, MCF7, HuT28 and OvCa 420, 429, 432, 433 were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) and maintained in the recommended conditions by the manufacturer. MKOSE, OSE and IG10-MUC1 cell lines were developed in the Department of Immunology, Pittsburgh University, and cultured as described in the thesis.

**IHC:** Detailed method/protocol optimized for the all the antibodies used in this thesis are presented in the thesis. Briefly, 4  $\mu\text{m}$  sections were blotted with primary antibodies according to manufacturer instructions and laboratory validation; followed by incubation with secondary antibodies. The antigen-bound antibodies were visualized with a 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and positive cells are visualized in brown.

**ELISA:** Briefly, 96-well plates were coated overnight with MUC1 peptide and incubated with prediluted serum and then with goat anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibodies. The plates were washed and then incubated with the substrate solution. Data acquisition and analysis were performed using Ascent Software for Multiskan (Thermo Scientific).

**Flow-cytometry:** Immune phenotyping of murine lymphocytes and analysis of cell lines were performed according to BD Bioscience protocols. Briefly, cells were collected from mice and prepared by mechanical disruption. Cells were stained within 24 hours. For intracellular cytokine detection, cells were stimulated with PMA and ionomycin in the presence of Golgi Plug. All antibodies were diluted according to manufacturers' instructions. Stained cells were analyzed on a LSR II flow cytometer using the FACSDiva data analysis software.

**PCR and qPCR:** Mouse tail DNA was isolated and tested for the presence of the wild-type *Kras* and mutated *LSL-Kras<sup>G12D/+</sup>* gene. PCR conditions are described in detail in the thesis. Total RNA was isolated with Trizol reagent and then purified using an RNeasy Mini kit. Transcripts were quantified by real-time PCR on an ABI Prism 7700 Sequence Detector with TaqMan Gene Expression Assays.

### 3. Study 1: MUC1: a tumor antigen

MUC1, a cell surface glycoprotein present in lesions of endometriosis and expressed by all types of ovarian epithelial tumors is extensively studied as a tumor associated antigen and currently explored as a potential cancer vaccine candidate. Best way to show the expression of MUC1 is by immunohistochemistry where the antibody for MUC1 binds specific to its antigen and reveals the level of expression of the protein which can be correlated with the clinical data.

#### 3.1. Hypothesis

Immunohistochemistry could serve as principal method to detect our primary interest antigens (specifically MUC1) in human tissue sections starting with normal tissue, premalignant lesions like endometriosis and finalizing with ovarian cancers tissue samples. Our preliminary data from histological analysis could serve as a platform for further studies to validate MUC1 as a prognostic and diagnostic marker for endometriosis and ovarian cancer.

#### 3.2. Results and discussion

Tumors show marked heterogeneity in their cellular morphology, proliferation status, genetic lesions and treatment approaches. The causative factors of tumor development remain largely unknown. Thus, there is an imperative need of new prognostic tumor markers. There are several classes of tumor markers which are expressed in high amounts in the blood of cancer patients and just to name some of these: PSA for prostate cancer, CA-125 in ovarian cancer or CEA for colorectal cancer. Still, the expression of these markers is not a final diagnostic result of a cancer. The histology analysis of tumors is the main and indisputable most reliable diagnosis method. Nowadays, the histological analysis is accompanied by the immunohistochemistry determination of different tumor markers which confer a better understanding of the tumor origin, treatment options and outcome.

Since immunohistochemistry became an indispensable method for diagnosis and for testing new prognostic markers in this study we optimized the method to our laboratory conditions as described in Study 1 and Chapter 2. We analyzed a wide variety of markers on human specimens and we evaluated different panels of antibodies for different types of cancer. After performing these analyses few concerns have been raised. The immunohistochemistry/LSAB technique can give false negative and false positive results. Still, these concerns can be solved through a careful examination of the staining by a pathologist which correlates the clinical data and H&E morphology of the tissue with the panel used for immunohistochemistry. The number of antigens that can be detected through immunohistochemistry is

increasing all the time. In theory, each substance which is an antigen and its antigenicity is partially retained in the tissue could be detected through this method. With the help of monoclonal technology a wide plethora of antibodies became available especially for the ones where its antigenic determinant is chemically poorly defined or completely unknown. Even though immunohistochemistry/LSAB technique is very useful one should be really careful in interpreting its results.

MUC1 is a glycoprotein which undergoes glycosylation changes during disease pathogenesis. Further on, our main focus is to analyze the expression pattern of this marker from normal to malignant lesions. Progression from preneoplastic lesions to malignant conditions is a time process. MUC1 undergoes different status of glycosylation during disease progression. In humans, normal MUC1 expression is low/negative on the ovarian surface epithelia. The surface of the epithelium and the ovarian stroma are stained negative for MUC1 (fig. 10.) which confirms also the previous studies about the expression of the MUC1 protein in normal tissue. MUC1 has been identified as a marker of preneoplastic conditions and of several chronic inflammatory diseases. We stained for MUC1 protein normal and tumor isoforms paraffin-embedded tissues from patients with endometriosis. Both isoforms of MUC1 were found positive in these tissues, which indicate that MUC1 undergoes glycosylation changes during disease pathogenesis and could be used as a prognostic marker. The human MUC1 protein is commonly over expressed in ovarian carcinomas. Our immunohistochemical studies on various ovarian human tumors showed that presence of protein is related to the invasive proliferation of tumors and is predictive of a poor outcome for patients. In all our cases of epithelial ovarian cancer we noticed an increased expression of both: normal MUC1 and its tumor isoform.

Tumor immunology is diverse and becomes more and more clear that is the main factor which has to be solved in understanding how tumors develop and occur. Immune surveillance is hampered by factors which are still unknown. Tumors are able to escape the immune system vigilance and to induce an immunosuppressive environment surrounding. Anti-MUC1 humoral immune responses in cancer patients correlate with increased survival in these cases. In our study (figs. 20-22.) all nine ovarian cancer patients have detectable levels of IgM, IgG antibodies and at some extent IgA antibodies. In four out of four different malignancies tested (fig. 23.) we had an increase of anti-MUC1 antibodies. Ovarian patients 1-3 have low antibody levels while patients 4-9 show better humoral responses. Although all patients have highly positive lesions for MUC1, not all respond with similar antibody levels, indicative of importance of the immune environment in the host during antigen priming.

If MUC1 was expressed only in the luminal tract of the glands from normal uterus and absent in the normal human ovary, in contrast in the carcinomas was aberrantly expressed together with its tumor hypoglycosylated counterpart. Moreover, in the light of these results MUC1 could be considered a potential marker for predicting the occurrence of epithelial ovarian tumors from endometriosis lesions. Even though it has been suggested that only endometrioid and clear cell carcinoma are deriving from endometriosis like lesions, in terms of MUC1 expression there was no difference between these types of tumors and serous epithelial ovarian carcinoma. These results are well in accordance with previous literature and prove once more the importance of studying the ways to prevent the malignant transformation of the premalignant lesions like endometriosis.

There is an imperative emergency in discovering new markers to predict the disease pathogenesis and new treatment options are needed. In this regard, our proposed protein as a marker for endometriotic lesions, MUC1, is even more appealing due to its use as new vaccine therapy. These therapies are coming more close to the fully realization of the treatment of premalignant lesions.

#### **4. Study 2: Conditional mouse model for human MUC1-positive endometriosis**

Dinulescu and colleagues reported for the first time a mouse model in which the activation of the oncogene Kras in ovarian surface epithelium can induce endometriosis-like lesions which further can

develop ovarian endometrioid carcinoma. These mice represent the first genetic model of this common gynecologic disease

#### **4.1. Hypothesis**

Based on our human data MUC1 could be used as a marker of glandular epithelia in endometriosis for disease pathogenesis. New animal models, such as MUC1/Kras mouse model, could reveal a better understanding of the adaptive immune system in the pathogenesis of endometriosis.

#### **4.2. Results and discussion**

Best animal model for studying the pathogenicity of endometriosis would be such model where we can induce the disease and follow its progression together with analyzing an antigen marker which is expressed in both diseases and undergoes modifications at different stages of the disease. To be able to generate this model we crossed the Kras mice described previously, which are able to develop endometriosis, with MUC1 transgenic mice. In this way we have a model in which the disease can occur and the presence of MUC1 protein will confer us a good platform for assessing the immune response. Kras, MUC1+ and MUC1/Kras mice were analyzed for the expression pattern of the human protein in the ovaries and uterus. As expected, the protein is normally expressed by glandular and luminal epithelial cells of the human endometrium and is present only in low levels on the ovarian surface epithelium. In the uterus from these mice MUC1 is expressed in lining of the endometrium and in the epithelial cells of the glandular structures. Still, this model is not 100% suitable to predict exactly the human disease since the homology between mouse Muc1 and human MUC1 molecules is 87% in the cytosolic tail and the Muc1 extracellular domain which is responsible for cell-cell, receptor-ligand interactions and immune regulation is just 34% homologous to its human counterpart. In order to study mouse Muc1 we would need a syngeneic model for which we would need adequate reagents not available yet.

Using our new developed animal model we showed that MUC1/Kras mice with induced endometriosis display important histomorphological changes in their ovaries. These lesions expressed high levels of MUC1 which could on one hand lead to cell expansion and migration to ectopic cells conferring a pro-survival mechanism and on the other hand can render the protein to be immunogenic. In the MUC1/Kras mice which developed endometriotic lesions we noticed high levels of MUC1-specific IgM and IgG1. This antibody switch noticed in our model could be due to a Th2 bias mechanism which is in well agreement with the literature. Further studies on the prognostic value of MUC1 for disease progression should be considered.

The cellular component of the adaptive immune system is mediated through T helper cells (CD4+) and cytotoxic T-cells (CD8+). The balance between different T cells can limit the immune response. We noticed an increase of CD4+FoxP3+ regulatory T cells, which is a subset of T helper cells responsible for suppression of the immune system inducing a tolerance state to self-antigens. Furthermore, lymph nodes resected from MUC1/Kras mice revealed the prevalence of FoxP3 Tregs together with increased presence in the human lesions. However, no increase in this cell type was notice in the peripheral blood of women with endometriosis.

Taken together all these results from our new developed human MUC1/Kras transgenic mice we show the effect of endogenous expression of MUC1 on the ability of mice to generate antitumor immunity to MUC1-expressing lesions. The transgenic mice will provide a useful model to investigate further the mechanisms that regulate immunological tolerance to tumor antigens and will facilitate the investigation of anti-MUC1 immunotherapy formulations. Introducing this model would facilitate further studies on the roles of MUC1 in endometriosis development and progression.

### **5. Study 3: Modulation of MUC1 in cancer models**

Studies in tumor cells indicate that the amount and type of MUC1 expressed modulate immune responses to these cells. MUC1 is differentially glycosylated in many cancerous cells, exposing tumor-specific epitopes that may trigger an immune response; however, MUC1 also has been shown to protect cancer cells from immune cell attack, indicating both immunostimulatory and immunosuppressive functions.



### **5.1. Hypothesis**

MUC1 is expressed at low levels in the ovaries of healthy patients. In endometriosis, MUC1 expression increases over time with disease progression and finally is over expressed in all histological types of the epithelial ovarian carcinomas. We hypothesize that MUC1 expression can be inhibited with drugs altering MUC1 signaling pathways and we can modulate MUC1 in a new developed syngeneic animal model. MUC1 induced a Th2 type immune response in MUC1/Kras mice with induced endometriosis and presence of Tregs was noticed in the lymph nodes and lesions of these mice. Increasing levels of naturally occurring anti-MUC1 antibodies were noticed in human samples from different types of cancers. All these events lead us to study more in depth the modulation of MUC1 expression during ovarian transformation.

### **5.2. Results and discussion**

It has been shown that MUC1 is involved in tumor cell growth by preventing the cell death and inducing tumor invasion. First, in this study we evaluated the expression status of MUC1 on available human carcinoma cell lines. Most of human carcinoma cell lines tested 7 out of 8 and all 5 ovarian cancer cell lines analyzed expressed high levels of the protein (fig. 26 and 27). Second, we described a new human MUC1 tumor associated antigen – expressing mouse ovarian cancer model.

The differences in glycosylation status of MUC1 protein in different carcinomas are affecting the profile of epitopes presented to B cells that are responsible for the humoral immune response. This was one of the reasons for which is believed that MUC1 as a cancer associated antigen can be useful in immunotherapy. Mucins play an important role in signal transduction and modulation of cancer cell behavior leading to the potentiation of tumorigenicity and metastasis. Recent studies have characterized a rapamycin-sensitive translational signaling pathway that regulates the translation of a specific subclass of mRNAs in mammalian cells. mTOR activation can be specifically inhibited by rapamycin. In healthy women MUC1 expression on the ovarian surface epithelium is very low and progressively increases during disease pathogenesis. The purpose of this study was to determine whether the mammalian target of rapamycin (mTOR), downstream target of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), could induce changes into MUC1 expression on ovarian cancer cell lines. Indeed, in our experimental set-up we inhibited MUC1 expression with two agents: rapamycin and LY which act on the downstream signaling pathway of mTOR. These results could be of benefit for further evaluation of inhibiting MUC1 expression in cancer cells. The potential role of MUC1 in disease pathogenesis could be by triggering anti-apoptotic and survival mechanisms and augments the tumor aggressiveness.

Our newly developed MKOSE cell line is the only currently available mouse ovarian cell line expressing endogenous human MUC1 antigen. Our cell line was from healthy MUC1/Kras mice. The transformation rate and kinetic of the cell line was compared to OSE cell line from wild type C57BI/6 mice. No difference was noticed between the two cell lines which demonstrate that the oncogene Kras is not essential for in vitro transformation.

Furthermore, we engineered a mouse ovarian cancer cell line IG10 to express human MUC1 antigen. This cell line was used to induce tumors in a syngeneic animal model. Having identified a human antigen-expressing mouse tumor model we characterized the influence of the immune microenvironment on our model antigen expression. The tumors were spread all over the peritoneal cavity and accompanied by hemorrhagic ascites. We could show that the expression of MUC1 in these tumors was sustained over time concomitant with the presence of the antigen in the ascites cells. Ascites fluid was analyzed for immune cells such as Tregs and Th-17 T cells. These types of cells were detected both in ascites fluid and lymph nodes. Th17 cells may contribute to protective human tumor immunity by inducing a Th1 type response ending with improved patient survival. On the other hand, there are some other theories by which Th17 cells can promote tumor growth and progression. All together, these studies demonstrate that further analysis is needed to understand the role of Th17 in tumor biology. Nevertheless, our observations that some inflammatory cytokines can influence OSE MUC1 expression are of importance not only in the context of cancer biology but potentially in normal ovarian physiology. In our experiments

we show that inflammatory cytokines induce MUC1 over expression which suggests the potential role of MUC1 in ovarian tumorigenesis.

In conclusion, our study presents for the first time a syngeneic murine ovarian cancer model positive for human antigens. This model allowed us to study MUC1 immunobiology both *in vitro* and *in vivo*.

## 6. Final conclusions

The risk of developing an ovarian cancer in women is approximately 1,5%. There are several tumor markers used in the diagnosis of ovarian cancer, but there is still the need of approaches for detection of ovarian cancer in its earliest stages.

The development of ectopic lesions requires that endometrial cells are able to implant and proliferate at non-uterine sites (similar to metastasis in tumors) and we postulate that similar to its roles in metastasis, MUC1 could also play a role in the growth and/or dissemination of endometrial cells. Studies of tumor cells and T cells showed that MUC1 is pro-adhesive and is able to bind to adhesion molecules through its carbohydrate residues and its backbone, which may be important for tumor migration and nesting of cells at distant sites, and could also explain the correlation between MUC1 expression and increased metastatic potential seen in some cancers. We showed here that all ovarian cancer patients have detectable levels of IgM, IgG antibodies and at some extent IgA antibodies in their serum which leads us to the conclusion that an immune therapy could be a real benefit for treating these patients. Although all patients have highly positive lesions for MUC1, not all respond with similar antibody levels, indicative of importance of the immune environment in the host during antigen priming showed also in this study by immunohistochemistry for immune surveillance markers (CD20, CD3).

Cancer-associated MUC1 is different from normal cells MUC1 positive. The most striking difference between normal MUC1 and tumor MUC1 consists in their glycosylation status. Meanwhile normal MUC (clone HMPV) is hyperglycosylated and is over expressed in all premalignant and malignant tissues the tumor form of MUC1 (clone VU-4H5) is hypoglycosylated and has modest expression in premalignant lesions and upregulated in ovarian carcinomas. Modulation of MUC1 expression is intensively studied by many groups and like we also showed here, using different inhibitors of MUC1 pathways, we can decrease MUC1 expression, so then we can modulate the expression of the protein in our favor.

While the presence and roles of MUC1 on eutopic (normal) endometrium has been extensively studied, much less is known about the roles of MUC1 and/or immunogenic properties of MUC1 in ectopic lesions of endometriosis. In this thesis, we studied the histology of nine cases of endometriosis and confirmed by IHC that MUC1 positive lesions of endometriosis are present in all nine patients. MUC1 it is expressed in glandular epithelium of benign endometriosis and is over expressed in all epithelial ovarian cancers. In conclusion, we identified that MUC1 expression increases from no expression in normal tissue to high level of expression in ovarian carcinoma.

Lack of suitable animal models makes difficult the analysis of the immunobiology of MUC1 and disease pathogenesis. In this study we established two animal models which express endogenously human MUC1. First, in Kras/MUC1 mice we show the expression pattern of human MUC1 during endometriosis development and the immune response triggered by the expression of the protein. As lesions progressed, quantitative (over expression) and qualitative (underglycosylation) changes in MUC1 expression occurred and a Th2 type immune response was induced. By generating MUC1/Kras mice we developed MUC1-positive lesions, similar to human endometriosis and thus we provide a more relevant model of human disease. Second, the syngeneic animal model established (C57Bl6-IG10-MUC1) in this study gives us a better understanding of the implications of MUC1 in ovarian cancer and the immune response triggered against the tumor.

The study of patterns of MUC1 protein in humans and the possibility to use the protein like a tumor marker for the early ovarian cancer diagnostic may conduct to the curability of the malignant disease.

**UNIVERSITÉ DE MEDICINE ET PHARMACIE "IULIU  
HAȚIEGANU"**

**THÈSE DE DOCTORAT**

**RESUMÉ**

**Les implications de la mucine 1 (MUC1) dans  
l'endométriose et le cancer ovarien**

Directeur de thèse:  
Prof. Dr. Robert Săndulescu

Doctorante:  
Dr. Iulia Diaconu

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	15
<b>DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	17
1        La mucine 1 (MUC1).....	19
1.1      Les fonctions de la protéine MUC1.....	21
1.2      Le polymorphisme de la protéine MUC1.....	22
1.3      L'état de glycosylation de la protéine MUC1.....	23
1.4      MUC1 comme cible pour les lymphocytes B.....	23
1.5      MUC1 comme cible pour les lymphocytes T.....	24
1.6      L'état d'expression de la protéine MUC1.....	25
2        L'endométriose.....	27
2.1      Le diagnostic de l'endométriose.....	28
2.2      Le traitement de l'endométriose.....	28
2.3      Les théories dans la pathogenèse de l'endométriose.....	29
2.4      L'endométriose comme le cancer - la preuve histologique.....	31
3        Le cancer ovarien.....	33
3.1      Les caractéristiques cliniques et pathologiques des carcinomes épithéliales ovariennes.....	34
3.2      Le carcinome ovarien séreux.....	34
3.3      Le carcinome ovarien mucineux.....	35
3.4      Le carcinome ovarien endométriale.....	35
3.5      Le carcinome ovarien à cellules claires.....	37
<b>LA CONTRIBUTION PERSONNELLE</b> .....	39
1        Les hypothèses et les objectifs de la thèse.....	41
2        MUC1: un antigène tumoral.....	43
2.1      Introduction.....	43
2.2      Hypothèse.....	44
2.3      Matériaux et méthodes.....	45
2.3.1. Immunohistochimie.....	45
2.3.2 La détection MUC1 par ELISA.....	46
2.4      Les résultats.....	46
2.4.1 La validation de la technique immunohistochimique /la technique LSAB 46	46
2.4.2 La histopathologie utérine.....	47
2.4.3 La histopathologie ovarienne.....	49
2.4.4 La histopathologie d'endométriose.....	50
2.4.5 La histopathologie des tumeurs ovariennes.....	51
2.4.6 La réponse immunitaire: la détermination de l'anti-MUC1 dans le sérum humain.....	57
2.5      Discussions.....	60
3        Le modèle de souris sous condition des lésions d'endométriose positives pour MUC1.....	63
3.1      Introduction.....	63
3.2      Hypothèse.....	64
3.3      Matériaux et méthodes.....	64
3.3.1 Animaux.....	64
3.3.2 PCR.....	64
3.3.3 L'administration de l'adénovirus recombinant.....	65
3.3.4 La détection de MUC1 par ELISA.....	65
3.3.5 Flow-cytométrie.....	66
3.3.6 Immunohistochimie.....	66

	3.3.7 qPCR.....	67
	3.3.8 L'analyse statistique.....	67
3.4	Les résultats.....	67
	3.4.1 L'analyse des modèles animaux pour exprimer la protéine MUC1	67
	3.4.2 Le développement de l'endométriose chez les souris MUC1/Kras	70
	3.4.3 La réponse immunitaire adaptative chez les souris MUC1/Kras	71
3.5	Discussions.....	72
4	La modulation d'expression de MUC1 dans les modèles de cancer .....	75
4.1	Introduction.....	75
4.2	Hypothèse.....	77
4.3	Matériaux et méthodes.....	77
	4.3.1 Animaux.....	77
	4.3.2 Des réactifs et des lignées cellulaires .....	77
	4.3.3 L'isolement et la culture de la ligne cellulaire MKOSE.....	77
	4.3.4 Le clonage des cellules MKOSE.....	78
	4.3.5 La croissance des cellules MKOSE .....	78
	4.3.6 Le développement de la ligne cellulaire de cancer ovarien IG10-MUC1	78
	4.3.7 L'analyse de la cancérogénicité des lignes cellulaires dans des modèles animaux	78
	4.3.8 Flow-cytométrie .....	79
	4.3.9 Immunohistochimie .....	79
4.4	Résultats.....	80
	4.4.1 L'expression de MUC1 dans les lignes cellulaires humaines80	
	4.4.2 Le traitement des lignes cellulaires avec inhibiteurs.....	81
	4.4.3 L'expression de MUC1 dans les modèles animaux.....	84
	4.4.4 L'expression de MUC1 dans le modèle animal singeneic....	85
	4.4.5 La réponse immunitaire adaptative.....	86
4.5	Discussions.....	86
5	Conclusions.....	89
6	L'originalité de la thèse .....	91
	<b>RÉFÉRENCES</b> .....	93

**Mots-clés:** mucine 1 (MUC1), l'endométriose, le cancer ovarien, la réponse immunitaire, le facteur pronostique, marqueur de diagnostic, des modèles animaux.

Plus de 90% des cancers ovariens sont le résultat de la transformation maligne de l'épithélium ovarien. Dans les pays occidentaux le cancer ovarien épithélial est la principale cause de décès par les maladies du tractus génital féminin. Des nombreuses études montrent que l'endométriose ovarienne peut provoquer le cancer et en particulier son implication est prouvée dans le développement de carcinome à cellules claires et d'adénocarcinome endométrioïde. L'endométriose est une maladie bénigne, définie par la présence de tissu endométriale utérine à l'extérieur de l'utérus. L'endométriose, comme le cancer ovarien se caractérise par l'invasion des cellules et une croissance incontrôlée des tumeurs. Il a été montré que des mutations dans des gènes qui sont impliqués dans la pathogénie de l'endométriose menant à la progression du cancer ovarien. Des études intensives essaient de comprendre le lien entre l'endométriose et le cancer ovarien. L'accent est mis sur les marqueurs qui peuvent prédire la progression du cancer de l'ovaire à partir des lésions bénignes de l'endométriose. Les méthodes de prévention du cancer ovarien sont d'un intérêt primordial. La détection précoce des lésions préneoplasiques est essentielle pour la survie à long terme. Même si la physiopathologie de l'endométriose n'est pas connue est supposé que ces lésions sont dues à la réponse immunitaire avec facultés affaiblies. La mucine humaine 1 (MUC1) a été identifiée comme un marqueur des lésions préneoplasiques de nombreuses maladies inflammatoires chroniques. La glycoprotéine MUC1

transmembranaire est un membre de la famille des mucines et est exprimé dans le niveau basal des cellules normales épithéliales ductales des organes sécréteurs. La protéine est surexprimée et aberrante glycosylé dans la plupart des carcinomes. Des niveaux élevés de protéine MUC1 peut indiquer la progression tumorale et en particulier un rôle dans les métastases.

Dans les tissus normaux, MUC1 est exprimée dans la composante épithéliale de plusieurs organes. Dans les carcinomes correspondants, MUC1 à un niveau d'expression augmenté, n'est pas polarisée et hypo-glycosylé induire une immunogénicité accrue de la protéine. L'expression de MUC1 augmente avec la progression de la maladie. Si la protéine est à des niveaux faibles ou absents dans les tissus normaux, dans les lésions précurseur des néoplasmes MUC1 positives la protéine est surexprimé. Les informations incomplètes sur le rôle de l'immunité dans l'endométriose et le cancer ovarien pourraient s'expliquer en partie par le fait que des études pertinentes qui nécessitent une surveillance avant et après l'induction de la maladie sont impossibles chez les humains et les modèles animaux utilisés à ce jour en utilisant des primates sont très coûteux. Compte tenu de cela, il y a un besoin urgent de nouveaux modèles animaux peut révéler une meilleure compréhension du système immunitaire dans la pathogenèse de l'endométriose et le cancer ovarien.

Bien que cette étude montre l'évolution d'expression de la protéine MUC1 et ses conséquences sur le système immunitaire, nous croyons que MUC1 pourrait être directement impliquée dans la pathogenèse d'endométriose et du cancer ovarien.

## 7. Les objectifs de la thèse

- e. La confirmation d'expression de la protéine MUC1 dans des échantillons humains afin de souligner son utilisation comme marqueur pronostique et diagnostique de l'endométriose et du cancer ovarien
- b. L'identification d'un nouveau modèle MUC1/Kras avec endométriose induite. Ce modèle-là pourrait servir pour une meilleure compréhension de l'immunobiologie de la protéine MUC1 et ses implications dans la pathogenèse et le développement de l'endométriose.
- c. Le développement des nouvelles lignes cellulaires primaires qui expriment MUC1 pour analyser les effets inhibitoires/stimulantes de la protéine.
- d. L'identification d'un modèle animal pour le cancer ovarien où MUC1 soit exprimée, étant une plateforme pour tester des nouvelles immunothérapies.

## 8. Matériaux et méthodes

**Echantillons humains:** offerts par l'Institut d'Oncologie „Prof. Dr. Ion Chiricuță”, Cluj-Napoca, Roumanie. Les échantillons ont été collectés et déposés dans une banque de tissus.

**Animaux:** les souris transgéniques hétérozygotes MUC1 + / - (MUC1 souris) ont été élevées dans la zoo-base de Magee Womens Hospital, Pittsburgh, USA. Les souris Kras ont été obtenues dans la zoo-base de National Institute of Health (NIH), USA. Toute procédure expérimentale utilisée dans cette étude-là a été approuvée par IACUC de l'Université de Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA. Toutes les expériences aux animaux et les procédures utilisées sont décrites pour chaque étude en détail.

**Lignes cellulaires:** SKOV3, TOV-112, MCF7, HuT28 et OvCa 420, 429, 432, 433 ont été acquis de ATCC, USA et maintenues dans les conditions recommandées par le producteur. Les lignes cellulaires MKOSE, OSE et IG10-MUC1 ont été développées dans le cadre du Département d'Immunologie d'Université de Pittsburgh et cultivées comme il est décrit dans la thèse.

**L'immunohistochimie (IHC):** la méthode détaillée / le protocole optimisé pour tous les anticorps utilisés dans ce travail sont présentés dans la thèse. En bref, des sections de paraffine de 4 microns ont été incubées avec les anticorps primaires respectant les dilutions obtenues après la validation de chaque anticorps. Les sections ont été incubées avec les anticorps secondaires correspondants et la réaction immunologique a été révélée avec 3,3'-diaminobenzidine (DAB). La positivité a été marquée en fonction de l'intensité de la coloration et du nombre de cellules positives avec +, ++, +++.

**ELISA:** En bref, des plaques aux 96 godées ont été incubées pendant la nuit avec le peptide MUC1. Le lendemain, on a appliqué le sérum et on les a traitées aux anticorps. Les plaques ont été lavées et puis

incubées avec une solution de substrat pour révéler le complexe immunologique formé. L'acquisition des données et l'analyse ont été faites à l'aide du logiciel Ascent pour Multiskan (Thermo Scientific).

**Cytométrie en flux:** le phénotype immunitaire des lymphocytes des souris et l'analyse des lignes cellulaires ont été effectuées respectant les protocoles Bioscience BD. En bref, les cellules ont été collectées des souris et dissociées mécaniquement. Les cellules isolées ont été marquées dans 24 heures avec des anticorps. Pour la détection des cytokines intracellulaires, les cellules ont été stimulées avec PMA et ionomycine, dans la présence de Plug Golgi. Tous les anticorps ont été dilués respectant les instructions des producteurs. Les cellules marquées ont été analysées avec le cytomètre LSR II utilisant le logiciel FACSDiva pour l'analyse des données.

**PCR et qPCR:** les queues des souris ont été utilisées pour isoler l'ADN et tester la présence de la gène Kras de type sauvage et la mutante LSL-KrasG12D / +. Les conditions PCR sont détaillées dans la thèse. L'ARN total a été isolé avec le réactif Trizol et puis purifié à l'aide du kit RNeasy Mini. Les résultats représentent la quantification du niveau d'expression des gènes avec la méthode PCR en temps réel à l'aide de la technologie ABI Prism 7700 et les Tests TaqMan.

## **9. Etude 1: MUC1: antigène tumoral**

MUC1 est une glycoprotéine de surface présente dans les lésions d'endométriose et exprimée par tous les types de tumeurs ovariennes épithéliales. Cette protéine-là est intensivement recherchée comme antigène tumoral associé et aujourd'hui il y a des hypothèses qui soutiennent l'utilisation de la protéine comme vaccin pour le traitement du cancer. L'immunohistochimie la principale méthode de diagnostic de détection des protéines dans les tissus humaines, le niveau d'expression des protéines confirmé par IHC étant puis corrélé avec les données cliniques.

### **9.1 Hypothèse**

Le niveau d'expression des protéines dans les tissus humaines peuvent être des indicateurs précoces pour le développement des lésions cancéreux. Pour établir le niveau d'expression des protéines, il est nécessaire une méthode rigoureuse de détection dont les résultats peuvent être corrélées avec les données cliniques. Une telle méthode est l'immunohistochimie où on peut détecter les protéines d'intérêt (spécialement MUC1), dans les tissus humaines, à partir du tissu normal, lésions précancéreuses (ex. endométriose) et jusqu'au tissu ovarien maligne. Nos données préliminaires d'analyse histologique pourraient servir comme plateforme pour des études supplémentaires pour valider MUC1 comme marqueur de pronostic et diagnostic pour l'endométriose et le cancer ovarien.

### **9.2 Résultats et discussions**

Les tumeurs sont des tissus hétérogènes avec morphologie cellulaire différente, avec un taux de prolifération élevé et multiples approches de traitement. Les facteurs qui favorisent le développement des tumeurs restent largement inconnus. Ainsi, il y a un besoin impératif de nouveaux marqueurs tumoraux de pronostic pour identifier des nouvelles méthodes de traitement. Il y a plusieurs classes de marqueurs tumoraux exprimés dans le sang qui indiquent l'apparition des lésions cancéreuses: PSA pour le cancer de prostate, CA-125 dans le cancer ovarien ou CEA pour le cancer colorectal. Cependant, l'expression de ces marqueurs n'est pas le résultat de diagnostic final du cancer. L'analyse histologique des tumeurs est la principale méthode de diagnostic et, indiscutable, la plus fiable. Actuellement, l'analyse histologique est toujours accompagnée par l'immunohistochimie pour déterminer les marqueurs tumoraux qui donnent une meilleure compréhension de l'origine de la tumeur et offrent des options de traitement.

Parce que l'immunohistochimie est devenue une méthode indispensable pour le diagnostic et pour tester des nouveaux marqueurs de pronostic, dans cette étude-là on a optimisé la méthode pour nos conditions de laboratoire comme il est décrit en Etude 1 et Chapitre 2. On a analysé plusieurs marqueurs sur spécimens humaines et évalué des différents panneaux d'anticorps pour des différents types de cancer. Après effectuer ces analyses, on a constaté que la technique d'immunohistochimie / LSAB peut donner des résultats faussement négatifs et faussement positifs. Cependant, ces problèmes peuvent être résolus par un examen attentif de la coloration par un pathologiste, qui peut utiliser les données cliniques et la morphologie du tissu pour élaborer le diagnostic final. Le nombre d'antigènes qui peuvent être détectés par l'immunohistochimie est toujours augmentant. Théoriquement, chaque substance qui est un

antigène et son antigénicité partiellement conservée dans les tissus, pourrait être détectée par cette méthode-là. A l'aide de la technologie monoclonale, plusieurs anticorps sont devenus disponibles. Même si l'immunohistochimie / la technique LSAB est très utile pour élaborer le diagnostic histopathologique final, il faut prendre en considération tous les aspects du tissu et de la maladie comme : la morphologie primaire du tissu exprimée par la coloration hématoxyline-éosine, les données cliniques de la maladie et les panneaux de IHC utilisés.

MUC1 est une glycoprotéine qui souffre des modifications de glycosylation dans la pathogenèse de la maladie. Ensuite, notre objectif principal est d'analyser le niveau d'expression de ce marqueur à partir du tissu normal jusqu'aux lésions malignes. La progression des lésions pré-néoplasiques aux conditions malignes est un processus qui exige du temps. MUC1 change son statut de glycosylation pendant la progression de la maladie. Dans les tissus humains normaux l'expression MUC1 est faible/négative à la surface de l'épithélium ovarien. Dans la fig. 10 la surface de l'épithélium et du stroma ovarien sont négatifs pour MUC1, confirmant les résultats dans la littérature sur l'expression des protéines MUC1 dans le tissu normal. MUC1 a été identifié comme marqueur des conditions pré-néoplasique pour plusieurs maladies chroniques inflammatoires. Dans cette étude-là, on met à l'évidence des différentes isoformes (normale-hyperglycosylée et tumorale-hypoglycosylée) de MUC1 dans les tissus des patients avec endométriose. Les deux isoformes ont été trouvées positives dans ces tissus-là, ce qui indique le fait que MUC1 souffre des modifications de glycosylation dans le développement de l'endométriose et elles pourraient être utilisées comme marqueur de pronostic pour la progression de ces lésions. Nos études d'immunohistochimie pour des différentes tumeurs ovariennes humaines ont montré que la présence de la protéine peut être corrélée avec le degré de prolifération de ces tumeurs invasives, étant un facteur de prédiction d'une évolution non-favorable. Dans tous les cas de cancer ovarien épithélial, on a observé une expression augmentée même pour le MUC1 normal, que pour l'isoforme tumorale.

L'immunologie de la tumeur est diverse et il devient clair que ce le principal facteur à examiner pour comprendre comment les tumeurs apparaissent et se développent. La surveillance de l'apparition et du développement des tumeurs par le système immunitaire est déficitaire à cause des facteurs toujours inconnus. Les tumeurs ont la capacité d'évader et d'échapper à la vigilance du système immunitaire même par l'induction d'un environnement immunosuppresseur. La réponse immune humorale anti-MUC1 aux patients avec cancer est corrélée avec le taux de survie des patients avec cancer. Dans notre étude (fig. 20-22.), tous les neuf cas de cancer ovarien ont des niveaux détectables d'anticorps IgG, IgM et d'une moindre mesure des anticorps IgA. Dans quatre sur quatre affections maligne testées (fig. 23.), on a observé une augmentation du niveau des anticorps anti-MUC1. Les patients 1-3 ont un niveau faible d'anticorps, mais les patients 4-9 ont présenté des réponses augmentées d'anticorps. Même si tous les patients ont des lésions positives pour MUC1, ils ne répondent pas de la même manière en ce qui concerne le niveau d'anticorps indiquant l'importance de la surveillance du système immunitaire.

Si MUC1 était exprimé seulement dans la voie luminale des glandes de l'utérus normal et absente dans l'épithélium ovarien, il a été exprimé d'une manière aberrante dans les carcinomes correspondants, même dans la forme normal-glycosylée que dans son homologue hypoglycosylée. Même en plus, ces résultats pourraient être considérés comme évidences pour utiliser MUC1 comme marqueur de pronostic pour estimer le potentiel de l'apparition des tumeurs ovariennes épithéliales à partir des lésions d'endométriose. Même si on avait suggérerait que certains carcinomes ovariens, comme celui avec cellules claires ou celui endométrioïde sont dérivés d'endométriose, en ce qui concerne le niveau d'expression de MUC1 il n'y a pas de différence. Ces résultats sont conformes à la littérature et montrent encore une fois l'importance d'étudier les modalités de prévenir la transformation maligne des lésions précancéreuses, dans ce cas-là, l'endométriose.

Il y a un besoin urgent de nouveaux marqueurs pour le pronostic et diagnostic des lésions cancéreuses en vue des nouvelles options de traitement. A cet effet, la protéine proposée dans cette étude-là, MUC1, est un bon marqueur pour les lésions d'endométriose qui peuvent générer des certains carcinomes et représentent toujours une nouvelle option de traitement de ces lésions-là par utiliser cette protéine comme vaccin.

#### **10. Etude 2: Le modèle de souris conditionnel MUC1-positif avec des lésions d'endométriose**



Des antérieures études ont rapportés un modèle de souris où l'activation de l'oncogène Kras dans l'épithélium ovarien de surface peut induire des lésions, comme l'endométriose, qui après peut générer aux tumeurs ovariennes endométrioïdes.

### **10.1 Hypothèse**

A la base de l'étude antérieur de cette thèse où on a montré que MUC1 pourrait être utilisé comme marqueur de l'épithélium glandulaire en endométriose et cancer ovarien, un nouveau modèle animal, comme celui du souris MUC1/Kras pourrait élucider des mécanismes par quels le système immunitaire a une influence sur la genèse et la progression de l'endométriose.

### **10.2 Résultats et discussions**

Le meilleur modèle animal pour étudier la pathogenèse de l'endométriose était un modèle animal dans lequel on peut induire la maladie et puis suivre sa progression, avec l'analyse d'un marqueur, qui s'exprime à partir des premières étapes et souffre des modifications pendant les différentes phases de la maladie. Pour pouvoir générer ce modèle-là, on a croisé des souris Kras décrits avant, qui sont capables de développer endométriose, avec des souris transgéniques MUC1 qui expriment la protéine dans des différentes étapes de glycosylation en fonction de la phase de la maladie. A cet effet, on a un modèle où la maladie peut apparaître et présenter des différentes formes d'expression de la protéine MUC1 qui nous donnera une bonne plateforme pour l'évaluation de la réponse immune. Les souris Kras, MUC1 + et MUC1/Kras ont été analysés pour leur niveau d'expression de la protéine humaine MUC1 dans l'épithélium ovarien et dans l'utérus. Comme prévu, normalement, la protéine est exprimée dans les cellules glandulaires et luminales épithéliales de l'endomètre et elle est présente aux niveaux faibles sur la surface de l'épithélium ovarien. Dans l'utérus des souris MUC1 la protéine est exprimée dans la paroi de l'endomètre et dans les cellules épithéliales des structures glandulaires. Cependant, ce modèle n'est pas 100% comparable à évaluer avec précision la maladie humaine, en raison de différences dans la protéine de souris MUC1 et celle humaine MUC1. Les deux protéines ont une homologie de 87% dans la queue cytosolique et dans le domaine extracellulaire, domaines qui sont responsables des interactions cellule-cellule, récepteur-ligand et de la restauration immunitaire. Pour étudier la protéine de souris MUC1 nous avons besoin d'un modèle de souris singénétique, mais pour ce modèle il n'y a pas encore développé les réactifs nécessaires et les possibilités d'analyse seraient limitées.

Grâce à notre nouveau modèle, MUC1/Kras souris, nous avons observé le développement des lésions d'endométriose et nous avons observé des changements histopathologiques importants dans les ovaires. Les lésions d'endométriose chez ces souris ont exprimé des niveaux élevés de la protéine MUC1. L'extravasation des cellules et leur migration extra-utérine leur donnent un mécanisme de survie de ces lésions améliorant le degré immunogène de la protéine. Dans les souris MUC1/Kras avec des lésions d'endométriose nous avons observé des niveaux élevés d'anticorps anti-MUC1 spécifiques comme IgM et IgG1. Ces anticorps pourraient être une indication de la réponse immunitaire de type Th2 comme on a observé dans les études précédentes dans la littérature. Des autres études sur la valeur pronostique de la protéine MUC1 dans la genèse et le développement de l'endométriose doivent être envisagées.

La composition cellulaire du système immunitaire adaptatif est médiée par les cellules T helper (CD4 +) et T cytotoxiques (CD8 +). Le déséquilibre entre les différentes sous-populations de cellules T peut limiter la réponse immunitaire. Nous avons observé une augmentation de la sous-population des cellules T régulatrices CD4 + Foxp3 +, qui est un sous-ensemble de lymphocytes T auxiliaires chargés de réprimer le système immunitaire induisant un état de tolérance à l'autoantigènes. En outre, lorsque nous avons analysé les ganglions lymphatiques de souris MUC1/Kras, nous avons observé la présence des cellules Foxp3 +, tandis que les cellules ont été présentes aussi dans ces lésions. Toutefois, ce type de cellules n'a pas été détecté dans le sang de femmes souffrant d'endométriose.

Pris ensemble, tous ces résultats de notre nouveau modèle animal MUC1/Kras prouvent la génération d'une réponse immunitaire antitumorale envers ces lésions en raison de l'expression endogène de la protéine. Ces souris transgéniques peuvent fournir un modèle utile de continuer à étudier les mécanismes impliqués dans la tolérance immunologique aux antigènes tumoraux et de faciliter l'étude de nouvelles formes de l'immunothérapie anti-MUC1. L'introduction de ce modèle devrait faciliter des

nouvelles études sur le rôle de la protéine MUC1 dans le développement et la progression de l'endométriose.

### **1. L'étude 3: La modulation de MUC1 dans les modèles animaux du cancer**

Les études sur les lignées cellulaires tumorales montrent que le type et le niveau d'expression de la protéine MUC1 peuvent moduler les réponses immunitaires contre ces cellules. MUC1 est glycosylé différent dans les cellules cancéreuses, ce qui expose des épitopes spécifiques des tumeurs qui peuvent déclencher une réponse immunitaire. Toutefois, MUC1 a un rôle dans la protection des cellules immunitaires attaquent les cellules cancéreuses, indiquant à la fois le rôle immunosuppresseur et immunostimulant de cette protéine.

#### **1.1 L'hypothèse:**

MUC1 est exprimée à faible niveau dans les ovaires des femmes en bonne santé. Dans l'endométriose, l'expression du MUC1 augmente au fil du temps avec la progression de la maladie et elle est finalement plus exprimée dans tous les types histologiques de cancers épithéliaux de l'ovaire. L'hypothèse de travail de cette étude est que l'expression de MUC1 peut être inhibée par des médicaments qui affectent les voies de signalisation spécifiques et peut moduler l'expression de la protéine en notre faveur. Cela pourrait être mis en évidence par l'évaluation de la protéine dans les nouveaux modèles singénétiques, des modèles qui peuvent induire le cancer de l'ovaire et l'analyse de la réponse immunitaire des souris contre la protéine MUC1. Comme nous avons montré dans l'étude 2, MUC1 peut induire une réponse immunitaire de type Th2 chez les souris MUC1/Kras atteintes d'endométriose tout en présence des cellules T régulatrices dans les ganglions lymphatiques et dans les lésions endométriotiques et du niveau élevé d'anticorps anti-MUC1. Un autre objectif de cette thèse est l'étude de la modulation de l'expression de la protéine aussi dans les stades avancés de la maladie comme le cancer de l'ovaire. Pour cela ont été développés et analysés des nouveaux modèles animaux pour comprendre mieux le mécanisme de la protéine.

#### **1.2 Résultats et discussion**

Auparavant on a démontré que la protéine MUC1 a un rôle dans la prolifération et l'invasion des cellules tumorales en empêchant le décès cellulaire. Dans cette étude, nous avons évalué le degré d'expression de MUC1 dans des diverses lignées cellulaires humaines de cancer. La plupart des lignes cellulaires testées, 7 sur 8, et toutes les cinq lignes cellulaires de cancer ovarien ont exprimé du niveau élevé de la protéine MUC1 (fig. 26 et 27). Deuxièmement, nous avons développé un nouveau modèle d'animal singénétique exprimant MUC1 dans les tumeurs de l'ovaire de souris.

Différents degrés de glycosylation de la protéine MUC1 affectent le profil des épitopes présentés par les cellules B, qui sont responsables de la réponse immunitaire humorale. C'était l'une des raisons croyaient que MUC1 comme un antigène associé aux tumeurs peuvent être utilisé en immunothérapie. Les mucines jouent un rôle important dans la modulation du signal et du comportement des cellules cancéreuses, ce qui contribue à l'augmentation de leur cancérogénicité et leur degré de métastases. Des études récentes ont caractérisé une voie de signalisation sensible au rapamycine qui régule la traduction spécifique de la classe d'ARNm dans les cellules humaines. L'activation de la protéine mTOR peut être inhibée par le traitement avec la rapamycine. Le but de cette étude était de déterminer si un traitement avec de la rapamycine pourrait induire des changements dans l'expression de la protéine MUC1 dans les lignes cellulaires de cancer ovarien. Par conséquent, nous avons examiné deux agents pour inhiber la protéine mTOR, la rapamycine et LY agissant sur les voies de signalisation en aval de mTOR. Le niveau d'expression de la protéine a été inhibé pour toutes les concentrations d'agent utilisé faisant la liaison entre le niveau d'expression et la dose utilisée. Ces résultats sont bénéfiques pour une évaluation plus approfondie du degré d'inhibition de la protéine MUC1 dans les cellules cancéreuses. Le rôle de la protéine MUC1 dans la pathogenèse de la maladie serait de déclencher des mécanismes anti-apoptotiques, de survie et de l'amplification de l'agressivité tumorale.

La ligne cellulaire MKOSE développée dans cette étude est la seule lignée cellulaire actuellement disponible pour le cancer de l'ovaire de souris exprimant une protéine humaine endogène. La lignée cellulaire a été développée à partir de MUC1/Kras souris en bonne santé. Le degré de la transformation et la cinétique de la lignée cellulaire ont été comparés avec une lignée cellulaire dérivée à partir de souris

C57BL / 6 de type sauvage. Il n'y avait pas de différence entre les deux lignées cellulaires, ce qui montre que l'oncogène Kras n'est pas essentielle pour la transformation in vitro.

De plus, nous avons développé une autre lignée cellulaire de cancer ovarien IG-10 exprimant l'antigène MUC1 humaine. Cette lignée cellulaire a été utilisée pour induire des tumeurs dans un modèle animal singenic. Après avoir identifié le modèle animal avec des tumeurs induites exprimant des antigènes humaines, nous avons analysés l'influence du système immunitaire. Les tumeurs se sont propagées dans toute la cavité péritonéale et ont été accompagnées par une ascite hémorragique. Nous avons montré que l'expression de MUC1 dans ces tumeurs a été maintenue au fil du temps, tandis que la présence de l'antigène aussi dans les cellules de l'ascite. Le liquide d'ascite a été analysé pour la présence de cellules immunitaires telles que les cellules T régulatrices et la sous-classe Th17. Ces types de cellules ont été trouvés tant dans le liquide ascitique et dans les ganglions lymphatiques aussi. Les cellules Th17 peuvent stimuler le système immunitaire contre la tumeur en induisant une réponse de type Th1, se terminant par un taux de survie accru des patients atteints d'un cancer. D'autre part, il y a des plusieurs théories qui suggèrent que les cellules Th17 peuvent favoriser la croissance et la progression tumorale. Toutes ces études montrent qu'il est nécessaire d'analyses en plus pour comprendre le rôle des cellules Th17 dans la biologie des tumeurs. Cependant, nos observations que certaines cytokines inflammatoires susceptibles d'influer sur l'expression de MUC1 dans l'épithélium de surface de l'ovaire ont une pertinence non seulement dans le contexte de la biologie du cancer, mais aussi dans la compréhension de la physiologie de l'ovaire normal. Dans nos expériences nous montrons que les cytokines inflammatoires induisent des niveaux élevés de l'expression de la protéine MUC1, suggérant son rôle dans la tumorigenèse ovarienne.

Pour conclure, notre étude montre pour la première fois un modèle de souris tumoral singenic positif pour des antigènes humains. Ce modèle nous a permis d'étudier l'immunobiologie de la protéine MUC1 in vitro et in vivo.

## **2. Conclusions finales**

Le risque de développer un cancer de l'ovaire chez les femmes est d'environ 1,5%. La détection du cancer de l'ovaire est souvent faite dans les étapes avancées de la maladie par la mesure de marqueurs tumoraux et pour cette raison il est nécessaire de nouvelles méthodes de détection de ces lésions à un stade précoce.

Le développement des lésions ectopiques suppose que les cellules endométriales sont capables de l'implantation et de la prolifération dans les tissus non-utérins. Dans cet étude nous avons postulé les rôles de la protéine MUC1 dans l'étape de métastase et que la protéine peut jouer un rôle important dans la croissance et / ou la dissémination des cellules endométriales. Des études sur des cellules tumorales et des lymphocytes T ont montré que MUC1 est une molécule pro-adhésive et elle est capable de lier des molécules d'adhérence par l'intermédiaire des résidus glucidiques. Ces caractéristiques peuvent être importantes pour la migration et la métastase des tumeurs et pourraient expliquer la corrélation entre le niveau d'expression de MUC1 avec un potentiel métastatique vu dans certaines formes de cancer. Dans cette étude nous avons montré que tous les patients atteints de cancer de l'ovaire ont des niveaux détectables d'anticorps IgG, IgM, et dans une certaine mesure IgA dans le sérum, cela nous mène à conclure que la thérapie immunitaire peut être un réel avantage pour leur traitement. Bien que tous les patients aient des lésions avec la positivité intense pour MUC1, le niveau d'anticorps est différent. Tous ces résultats indiquent l'importance de la surveillance immunitaire au cours de la présentation des antigènes révélée aussi par la présence des lymphocytes CD 20 et CD + 3 + à l'immunohistochimie.

MUC1 associé à une tumeur est différent par le MUC1 présente dans les cellules normales. La plus grande différence est dans l'état de glycosylation des deux protéines. Si MUC1 normale (clone HMPV) est une molécule hipérglycosylée et si elle est exprimée dans tous les tissus précancéreux et malins, sa forme tumorale (clone VU-4H5) est hipoglycosylée et elle est exprimée modestement dans les lésions précancéreuses et plus exprimée dans les carcinomes ovariens. La modulation de l'expression de MUC1 est intensivement étudiée par plusieurs groupes, et aussi, comme nous l'avons montré dans cette étude, utilisant des inhibiteurs des différentes voies de signalisation, nous pouvons réduire l'expression de la protéine, de sorte que nous pouvons moduler l'expression de la protéine en notre faveur.

Tandis que la présence et le rôle de la protéine MUC1 dans l'endomètre eutopique (normale) est abordée par des nombreuses études, on en sait moins sur les rôles de MUC1 et / ou ses propriétés immunogènes dans les lésions d'endométriose extra-utérines. Dans cette thèse, nous avons étudié l'histologie de neuf cas de l'endométriose et confirmé par IHC que MUC1 est positive dans les lésions d'endométriose dans tous les neuf patients. MUC1 est exprimée dans l'épithélium glandulaire de l'endométriose bénigne et elle est surexprimée dans tous les cancers ovariens épithéliaux. Pour conclure, nous avons constaté que l'expression de MUC1 augmente du tissu normal à un niveau élevé d'expression dans le carcinome ovarien.

Le manque de modèles animaux appropriés fait difficile l'analyse de l'immunobiologie de la protéine dans la pathogenèse de la maladie. Dans cette étude nous avons établi deux modèles animaux exprimant la protéine humaine endogène MUC1. Tout d'abord, nous avons montré l'expression de MUC1 au cours du développement des lésions d'endométriose chez les souris Kras/MUC1 et la réponse immunitaire déclenchée par l'expression de la protéine. Comme les lésions ont progressé, des changements quantitatifs ont été observés (hipér/sur expression) et qualitatives (hipoglycosylation) de la protéine MUC1 et l'induction d'une réponse de type Th2. En générant des souris MUC1/Kras nous avons développé des lésions similaires avec l'endométriose humaine positives pour MUC1, fournissant un nouveau modèle plus pertinent d'étudier les maladies humaines. Deuxièmement, le modèle animal établi singeneic (C57BL6-IG10-MUC1), nous donne une meilleure compréhension des implications de MUC1 dans le cancer de l'ovaire et de la réponse immunitaire contre la tumeur.

L'étude de l'expression de la protéine MUC1 dans les tissus humains et la capacité à utiliser les protéines comme marqueur tumoral pour le diagnostic précoce du cancer de l'ovaire peuvent conduire à la curabilité de l'affection maligne.