

ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE VIRUSOLOGIE ȘTEFAN S. NICOLAU
BUCUREȘTI

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

***STUDIUL MODIFICĂRILOR GENETICE ȘI
EPIGENETICE ALE FACTORILOR ASOCIAȚI
CANCERELOR EPITELIALE***

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:

Dr. Lorelei Irina Brașoveanu, CS I

DOCTORAND:

Daniela Murărașu

BUCUREȘTI

- 2017 -

ROMANIAN ACADEMY
ȘTEFAN S. NICOLAU INSTITUTE OF VIROLOGY
BUCHAREST

SUMMARY OF THE PhD THESIS

***STUDY OF THE GENETIC AND EPIGENETIC
ALTERATIONS OF THE EPITHELIAL CANCER
ASSOCIATED FACTORS***

PhD Advisor:

Dr. Lorelei Irina Brașoveanu, CS I

PhD student:

Daniela Murărașu

BUCHAREST
- 2017 -

CUPRINS		Pag
Rezumat		4
Scopul, obiectivele și originalitatea tezei		5
Structura tezei		6
Materiale și metode		7
Rezultatele studiilor experimentale și discuții		9
Concluziile cercetării		32
Diseminare		35
Bibliografie selectivă		35

Cuvinte cheie: cancer colorectal, instabilitatea cromozomială, instabilitatea microsatelitică, fenotipul aberant metilat al insulelor CpG, pierderea caracterului heterozigotic, apoptoza, proliferare celulară, adeziune celulară, statusul mutațional, TP53, KRAS, BRAF, medicina de precizie.

INTRODUCERE

Abordarea tematicii de cercetare cu privire la studiul modificărilor genetice și epigenetice a unor importanți factori asociați tumorilor epiteliale, și în particular cancerului colorectal, este justificată de faptul că această maladie este o problemă de sănătate majoră pe plan mondial, inclusiv în România. În pofida îmbunătățirilor permanente în domenii precum chirurgia oncologică, chimioterapia, radioterapia și terapia neoadjuvantă, precum permanenta perfecționare a metodelor de prevenție și diagnostic timpuriu, care au contribuit la creșterea semnificativă, atât a răspunsului la tratament, cât și a speranței de viață a pacienților oncologici, în multe țări ale lumii valorile incidenței și ale mortalității se mențin la cote alarmante. În aceste condiții, în ultimul deceniu s-a acordat o atenție deosebită înțelegerii mai amplă a evenimentelor moleculare care stau la baza inițierii, dezvoltării și progresiei cancerului, dar și a identificării de noi biomarkeri și tratamente inovative, precum și a perfecționării tehnicilor de detecție ale modificărilor moleculare celulare.

Medicina „de precizie” sau „personalizată” reprezintă o nouă eră a tratamentului orientat al cancerului. Aceasta permite medicilor să selecteze cele mai bune tratamente bazându-se pe modificările moleculare caracteristice fiecărui pacient (alterări genetice, epigenetice, biochimice). Ideea medicinei de precizie nu este nouă, însă progresele științifice și tehnologice din ultimii ani fac ca o astfel de abordare terapeutică să fie mult mai accesibilă în prezent.

Cancerul colorectal (CRC) ocupă primele locuri în ceea ce privește incidența și decesul datorate cancerului, atât în țările industrializate, cât și în cele în curs de dezvoltare - inclusiv în țara noastră. De cele mai multe ori, boala este asimptomatică sau cu simptome similare altor tipuri de maladii, din acest motiv diagnosticarea se face în etapele avansate. CRC apare sporadic în majoritatea cazurilor, și doar un număr mic de pacienți dezvoltă CRC familial sau moștenit. Din punct de vedere anatomic, boala se dezvoltă dintr-un polip benign care evoluează spre un adenom displazic și mai apoi, într-un adenocarcinom cu potențial de metastazare. La nivel molecular, această secvență evolutivă a bolii se datorează unui proces complex și dinamic, caracterizat prin acumularea secvențială a alterațiilor genetice și epigenetice în timp. Principalele căi moleculare implicate în patogeneza colorectală sunt: instabilitatea cromozomială, instabilitatea microsatelitică, și fenotipul aberant metilat al insulelor CpG. Acestea se datorează

alterărilor moleculare a numeroase gene care conduc la funcționarea defectuoasă a proceselor celulare vitale pentru menținerea fenotipului normal precum apoptoza, ciclul celular, adeziunea celulară sau angiogeneza. Celulele tumorale achiziționează abilități noi pe care celulele normale nu le posedă, și care vor conduce în final, la progresia bolii și metastazare (Krogan și colab., 2015).

SCOPUL, OBIECTIVELE ȘI ORIGINALITATEA TEZEI

Scopul general al acestei lucrări de doctorat a constat în **examinarea profilelor mutaționale, epigenetice și de expresie genică ale unor biomarkeri implicați în tumorigeneza colorectală sporadică**. În prezent este bine cunoscut faptul că boala tumorală este determinată atât de factori intrinseci (rasă, fondul genetic moștenit și/sau dobândit, etc.), cât și de mediu (localizarea geografică, stil de viață, etc.), iar prin anomalii genetice și epigenetice determină dereglarea proceselor celulare cheie implicate în funcționarea normală a organismului. În țara noastră astfel de studii sunt relativ puține, iar fondul genetic al pacientului oncologic român este puțin cunoscut.

Obiectivele generale ale studiului au constat în:

1. Investigarea spectrului mutațional al unor gene asociate tumorilor colorectale (TP53, KRAS și BRAF).
2. Evaluarea nivelului de instabilitate microsatelitică (MSI) și a caracterului heterozigotic (LOH) la nivelul locusului TP53 în neoplasmelor de colon și rect.
3. Determinarea fenotipului metilat al insulelor CpG în cancerul colorectal (CIMP).
4. Studiul expresiei unui set original de gene (BIRC5, CDH1, KLF4, SPARC, TACSTD1, EZH2, PLK11, TP53, TP53INP1, WRAP53) implicate în proliferare, adeziune celulară și apoptoză. Moleculele sunt implicate direct sau indirect în activitatea proteinei p53, cel mai important supresor tumoral.
5. Analiza corelațiilor dintre modificările moleculare identificate și variabilele clinico-patologice ale tumorilor colorectale prelevate de la pacienți.

Originalitatea studiilor care au făcut obiectul tezei este demonstrată de următoarele aspecte și rezultate:

- abordarea extinsă, cel puțin la nivelul României, a domeniului modificărilor genetice și epigenetice în cancerul colorectal, sub multiple metode de investigare și caracterizare: statusul mutațional a genelor asociate tumoral, LOH, MSI, CIMP. Unele rezultate

obținute în această lucrare sunt originale. Spre exemplu, din informațiile noastre și după consultarea literaturii de specialitate, este pentru prima dată când duplicația c.709-710insACTACA, din exonul 7 al genei TP53 este raportată în cancer (Murărașu (a) și colab., in press, 2017),

- dezvoltarea și optimizarea unor metode moderne de investigare a modificărilor genetice, cu instrumente de ultimă generație: secvențiere Sanger, Tehnici PCR (TaqMan, RT-PCR, nested PCR, qPCR, allele specific PCR, MethyLight), HRMA,
- studiul expresiei unui set original de zece gene implicate în evenimente celulare esențiale pentru funcționarea normală a celulei, care sunt direct sau indirect legate de activitatea proteinei p53.

Astfel, lucrarea permite o viziune vastă asupra acestor aspecte moleculare, iar continuarea și dezvoltarea unor astfel de studii poate contribui spre o orientare actualizată și individualizată a tratamentului CRC, ceea ce asigură creșterea ratei de răspuns pozitiv la tratament, a speranței de viață a pacientului oncologic, și contribuie la dezvoltarea generală a cunoașterii științifice în domeniu.

STRUCTURA TEZEI

Lucrarea intitulată „Studiul modificărilor genetice și epigenetice ale factorilor asociați cancerelor epiteliale” conține 238 de pagini, fiind redactată în zece capitole sistematizate în două părți: fundamentarea științifică și cercetările proprii.

Prima parte cuprinde 63 de pagini structurate în șapte capitole, reprezentând 26.5% din numărul total de pagini a lucrării. În această parte a tezei este sintetizat cadrul general actual al cunoașterii legat de epidemiologia, strategii terapeutice, aspecte clinico-patologice ale CRC, mecanismele majore implicate în tumorigeneza colorectală, precum și motivația, scopul și obiectivele lucrării.

Partea de originalitate a tezei este extinsă pe 175 de pagini, reprezentând 73.5% din conținutul lucrării, și include capitole care descriu materialele și metodele utilizate, rezultatele obținute cu discuții asupra relevanței, interpretării și al noutății acestora și concluziile aduse în urma realizării cercetării. O vastă și actualizată bibliografie, lista figurilor și a tabelelor, lista abrevierierilor și diseminarea rezultatelor obținute sunt enumerate în 44 de pagini.

MATERIALE ȘI METODE

În studiile genetice aprofundate realizate pe parcursul tezei s-a utilizat un lot de 63 de pacienți cu CRC, de la care s-au prelevat fragmente de țesut tumoral, la 60 dintre pacienți prelevându-se și fragmente pereche de țesut aparent normal.

Investigarea statusului mutațional al genelor KRAS, BRAF și TP53, evaluarea porfilului LOH la nivelul locusului TP53 și determinarea statusului MSI s-au realizat pe întregul lot de studiu de 63 de pacienți. În plus, în studiile mutaționale s-au utilizat și liniile celulare tumorale umane colorectale standardizate LoVo și Colo-201 drept controale, dar și pentru crearea curbelor de sensibilitate.

Pe 40 dintre pacienții cu CRC s-au realizat studii de evaluare a expresiei genice pentru 10 molecule implicate în proliferare, adeziune celulară și apoptoză, și a CIMP-ului. Toate probele biologice au fost prelevate în tuburi *RNA Later TissueProtect* (Qiagen), de la pacienții supuși rezecției chirurgicale curative în perioada 2009-2016, în cadrul Institutului Oncologic *Prof. Dr. Alex. Trestioreanu (IOB)*, București, cu respectarea condițiilor de etică. Analiza probelor biologice din acest studiu s-a făcut cu aprobarea Consiliului de Etică al IOB. Probele biologice incluse în studiu au fost caracterizate din punct de vedere histopatologic în Departamentul de Anatomie Patologică din cadrul IOB, stadializarea făcându-se în acord cu criteriile AJCC.

Liniile celulare LoVo și Colo-21 s-au utilizat în două scopuri: crearea curbelor de sensibilitate și controale pentru studiile genetice.

În prima parte a cercetării s-a izolat, purificat și cuantificat materialul genetic din țesuturi și linii celulare (ADN, ARN). Extracția ARN-ului total s-a făcut cu Trizol, apoi a fost purificat în două etape conform specificațiilor producătorului kit-urilor utilizate: digestia ADN-ului, și purificarea pe coloane și concentrarea ARN-ului. De asemenea, ADN-ul genomic a fost izolat și purificat pe coloane conform specificațiilor producătorului. Concentrațiile și puritatea ARN/ADN s-au determinat cu spectrofotometrul *Nanodrop1000* (Thermofisher Scientific).

Toate tehnicile utilizate în această teză au fost optimizate. Detecția mutațiilor în exonii 2, 3 și 4 ai genei KRAS și exonii 11 și 15 ai genei BRAF s-a realizat prin Real Time-PCR urmată de topirea de înaltă rezoluție (HRMA) cu ajutorul instrumentului *LightCycler 480 Real-Time PCR System* (Roche). Documentarea tipurilor de mutații de la nivelul genelor KRAS și BRAF, dar și a exonilor 2-11 ai genei TP53, s-a realizat cu ajutorul tehnicii de secvențiere Sanger. Ampliconii obținuți au fost purificați cu *ExoSAP-IT* (Affymetrix Inc., California, USA), și apoi fost amplificați ciclic cu *primeri universali M13* (Invitrogen) și *Big Dye Terminator v3.1* (Thermofisher Scientific). Producții pentru secvențiere au fost purificați cu *BigDye X Terminator Purification Kit* (Thermofisher Scientific), iar electroforeza capilară s-a realizat cu *Analizorul*

Genetic 3500 cu 8 capilare și polimer POP-7 (Thermofisher Scientific). Rezultatele au fost analizate cu programele *Variant Reporter v1.1* (Thermofisher Scientific), și *Mutation Surveyor* (SoftGenetics). Totodată, tehnica de discriminare alelică s-a utilizat pentru confirmarea mutației hotspot în codonul 600 al genei BRAF. Amplificarea secvențelor specifice s-a efectuat cu primerii BRAF 51F și BRAF 176R și sonde *TaqMan*, pe instrumentul *7900HT* (Thermofisher Scientific). Rezultatele au fost analizate cu programul *SDS* (Thermofisher Scientific).

Produșii PCR au fost supuși migrării electroforetice pe un gel de agaroză 2% (Invitrogen, Thermofisher Scientific), în tampon 1X TBE (Tris-Borat-EDTA). Markerii ADN utilizați au fost: *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen), pentru determinarea aproximativă a dimensiunii ampliconilor, și *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) pentru estimarea cantitativă a ampliconilor.

Caracterul heterozigotic la nivelul locusului TP53 și instabilitatea microsatelitică au fost determinate prin tehnica PCR cuplată cu analiza de fragmente ADN. Dezechilibrul alelic la situsul genei TP53 s-a determinat cu ajutorul a doi markeri microsatelitici: *TP53-(AT)_n* localizat în intronul 1 al genei TP53, și *TP53-(CA)_n* localizat în exonul 11 (Invitrogen). Fragmentele au fost supuse migrării cu *Analizorul Genetic 3500*, și analizate cu programul *GeneMapper* (Thermofisher Scientific).

Statusul MSI s-a determinat conform protocolului *MSI Analysis System versiunea 1.2* recomandat de firma Promega. Primeri marcați fluorescent au co-amplificat șapte markeri microsatelitici: cinci markeri repetitivi mononucleotidici (*BAT-25*, *BAT-26*, *NR-21*, *NR-24* și *MONO-27*) pentru determinarea statusului MSI, și doi markeri repetitivi pentanucleotidici pentru detecția posibilelor contaminări, dar și pentru confirmarea faptului că țesutul normal și tumoral provin de la același pacient (*Penta C* și *Penta D*). Produșii PCR au fost supuși electroforezei capilare pe *Analizorul Genetic 3500 cu 8 capilare*, iar datele au fost analizate cu programul *GeneMapper*. Probele cu ≥ 2 markeri alterați din cei 5 au fost clasificate ca tumori MSI-H, iar probele cu un singur marker alterat și cele fără modificări ale markerilor au fost clasificate ca fiind stabile microsatelitic (MSS).

Analiza expresiei genice relative s-a făcut pe un set original de gene, TP53, BIRC5, PLK1, EZH2, KLF4, TP53INP1, WRAP53, CDH1, EPCAM și SPARC, implicate în proliferare, adeziune celulară, apoptoză, și care au strânse legături cu supresorul tumoral p53. Experimentele s-au desfășurat în două etape: revers-transcrierea ARN-ului în ADN complementar (ADNc), și polimerizarea cantitativă în lant în timp real a ARN-ului revers transcris (RT-qPCR). Pentru revers-transcrierea ARN-ului în ADNc, fără componenta 18S, s-au utilizat *hexameri Random* (Thermo Fisher Scientific). RT-qPCR s-a realizat cu ajutorul testelor *TaqMan gene expression assay*, și a instrumentului *7900HT*. Programul *RQ Manager 1.2* (Thermo Fisher Scientific) a fost folosit pentru analiza comparativă a valorilor C_T ($\Delta\Delta C_t$) și generarea valorilor de expresie genică

relativă RQ. Valorile cutt-off ale raportului: RQ probă tumorală/ RQ probă normală au fost stabilite arbitrar astfel: probele cu $RQ \leq 2.0$ au fost supraexprimate țesuturi, probele cu $RQ > 0.5$ au fost scăzute în țesuturi, iar restul probelor au fost irelevante. Studiile de corelații între nivelurile de expresie genică și parametri clinico-patologici și moleculari s-au realizat cu după ce valorile RQ au fost logaritmate în bază 10.

Metoda MethyLight cu sonde marcate TaqMan recomandată de către Weisenberger și colab. a fost utilizată determinarea fenotipului metilat al insulelor CpG pentru genele CACNAG1, NEUROG1, SOCS1, IGF2 și RUNX3. Gena de referință a fost COL2A1 (Weisenberger și colab., 2016). De asemenea, s-a determinat și statusul de metilare a genei MLH1. Conversia cu bisulfit și purificarea ADN-ului s-au realizat cu kit-ul *EpiTect Bisulfite* (Qiagen) conform instrucțiunilor producătorului. Reacția PCR s-a efectuat pe instrumentul 7900 HT, iar analiza datelor s-a făcut cu programul *RQ Manager 1.2*. Pe baza valorilor C_T s-a calculat procentul relativ de metilare de referință (PMR). Probele cu valori ale $PMR > 10$ au fost desemnate ca fiind pozitive pentru metilare. Dintre acestea, probele care au avut ≥ 3 markeri metilați au fost CIMP pozitive (CIMP+), iar cele cu ≤ 2 markeri metilați au fost CIMP negative (CIMP-).

Studiile de corelații parametrice, non-parametrice, de asociere, studii care folosesc o variabilă independentă și o variabilă continuă între parametri moleculari analizați și caracteristicile clinico-patologice ale tumorilor CRC s-au efectuat cu programul *GraphPad Prism 7.0* (GraphPad Software). Valorile ale parametrului statistic $p < 0.05$ au fost semnificative.

Programul *Haploview 4.2* a fost utilizat pentru a determina dezechilibrul de legătură între variațiile polimorfice detectate la nivelul genei TP53, calculul deviației de la echilibrul Hardy–Weinberg, construirea și determinarea frecvenței haplotipurilor la nivel populațional, precum și pentru studii de corelații ale acestora și variabilele clinico-patologice.

REZULTATELE STUDIILOR EXPERIMENTALE ȘI DISCUȚII

Spectrul mutațional al genelor KRAS, BRAF și TP53 la pacienții cu CRC sporadic

KRAS și BRAF sunt doi efectori esențiali ai căii de semnalizare Ras/Raf/MAP/MEK/ERK. Mutațiile activatoare la nivelul genelor codante ale acestor efectori reprezintă alterări somatice comune la pacienții cu CRC. Acestea apar în etapele timpurii ale progresiei adenom-carcinom. Documentația tipurilor de mutații în genele KRAS și BRAF este foarte importantă în vederea selectării tratamentului sistemic al pacienților cu CRC avansat și

recurent, precum și pentru identificarea subiecților cu prognostic nefavorabil. Pacienții cu mutații în gena KRAS, în special cu mutații hotspot, sunt non-responsivi la terapia cu anticorpi monoclonali anti-EGFR. Totuși, 40-60% dintre subiecții cu KRAS sălbatic (wt) nu răspund la terapia monoclonală. O posibilă explicație este dată de prezența mutațiilor în gena BRAF. În rutina clinică cetuximabul și panitumumabul sunt recomandate ca terapii de primă linie în combinație cu chimioterapia în cazul pacienților cu KRAS sălbatic. Statusul mutațional al genei BRAF nu reprezintă un marker predictiv independent pentru terapia cu anticorpi anti-EGFR. Cel mai probabil, acest lucru se datorează faptului că multe trialuri clinice nu dispun de un număr suficient de mare de pacienți cu mutații (mt) în gena BRAF pentru a atinge o valoare semnificativă statistic, dar și faptului că astfel de pacienți, în special cei cu tumorii MSS, au un prognostic nefavorabil independent de terapia administrată. Cu toate acestea, studiile de meta-analiză arată clar că pacienții cu mutații în gena BRAF nu răspund la terapia anti-EGFR, și ar trebui testați înainte de a li se administra tratamentul cu anticorpi monoclonali (Pietrantonio și colab., 2015). Este important de menționat faptul că în multe cazuri, pacienții care au răspuns inițial la terapie dezvoltă în timp rezistență ca urmare a selecției clonelor mutate KRAS sau BRAF ce apar în tumorile cu RAS sălbatic.

Analiza mutațională a lotului de 63 de pacienți a demonstrat că alterările genelor KRAS și TP53 sunt evenimente frecvente în tumorigeneza colorectală, acestea fiind mutate în 47.6% (30/63), și respectiv 46.0% (29/63) dintre probe analizate, în timp ce frecvența mutațiilor genei BRAF a fost de 14.3% (9/63). Toate mutațiile au avut caracter heterozigotic.

În acord cu datele din literatură, majoritatea mutațiilor genei **KRAS** detectate prin secvențiere Sanger, au afectat exonul 2. Mutațiile hotspot din codonii 12 și 13 au reprezentat 80% din totalul mutațiilor detectate în această gene, în timp ce mutațiile în exonii 3 și 4 au reprezentat 6.7%, și respectiv 13.3%. Cea mai frecventă mutație a fost G12[D,G], detectată în 8 probe CRC (26.7%). Șase pacienți (20%) au avut mutația G12[V,G], cinci pacienți (16.6%) au avut mutația G13[D,G], trei pacienți (10%) au avut mutația G12[S,G], și câte un pacient a avut mutația G12[A,G] și respectiv G12[C,G]. Deși toate mutațiile identificate în codonul 13 au fost G13[D,G], unii autori au raportat și mutațiile G13C și G13R la pacienții cu CRC, însă incidența acestora și variază între 0.2% și 0.8% din numărul total de mutații din această oncogenă (Neumann și colab., 2009). Codonul 146 din exonul 4 al genei KRAS a fost alterat la 13.3% dintre pacienți, iar cumulativ, 6.6% dintre pacienți au avut mutații Q22[K,Q] și Q61R (c.182_183AA>GT). Tipurile de alterări ale genei KRAS au constat din 21 de tranziții și zece transversii.

Deși rezultatele sunt controversate, studiile au demonstrat că mutații KRAS specifice exercită efecte biologice și biochimice diferite și afectează conformația structurală și funcțiile

proteinei. Mutațiile activatoare la nivelul exonilor 2 și 3 au un efect similar asupra activității GTP-azice a proteinelor Ras, în timp ce mutațiile din exonul 4 afectează rata de conversie a moleculelor guanozin difosfat (GDP) ↔ guanozin trifosfat (GTP). Glutamina din poziția 61 este esențială pentru hidroliza intrinsecă a GTP-ului și interacția cu efectorii căii de semnalizare Ras/Raf/MAP/MEK/ERK. Alterările situsuri blochează proteinele Kras într-o conformație activă ca urmare a legării la GTP și devin ținte constitutive ale kinazelor Raf, inclusiv Braf. Dacă mutațiile în codonii 12 și 13 afectează activitatea GTP-azică a proteinei, mutațiile în situsul 146 nu influențează funcția enzimatică, însă determină scăderea nivelurilor de GTP-RAS și sunt acompaniate de conversia la statusul homozigot și creșterea numărului de copii genice. Pe lângă rezistența la terapia cu anticorpi anti-EGFR, alterările somatice în codonii hotspot 12 și 13 pot determina producția de VEGF, cresc capacitatea invazivă a celulelor tumorale, au posibil rol în progresia tumorală și conferă rezistență la terapia. Unele studii au arătat că mutațiile “missense” ale codonului 12 sunt asociate cu fenotipul mucinos, în timp ce mutațiile în codonul 13 sunt caracterizate de un fenotip non-mucinos, localizare în colonul proximal, agresivitate tumorală și potențial de metastazare crescut (Chen și colab., 2014).

Datele studiilor RASCAL ale lui Russo și colaboratorii sugerează că rata de supraviețuire a pacienților CRC cu mutații hotspot în codonul 12 este mai mică comparativ cu pacienții cu KRAS sălbatic, sau care au alte tipuri de mutații, iar riscul de recurență și deces este de 30%. Mai mult, în cazul pacienților aflați în stadiul Duke C, riscul de recurență și deces crește la 50%. (Russo (a) și colab., 2005). Totodată, pacienții CRC cu mutații în codonul 12 au o rată de supraviețuire globală mai mică comparativ cu pacienții cu mutații în codonul 13. Mai mult, pacienții cu mutația G12V prezintă un risc mai crescut de recurență și deces, decât în cazul altor mutații din codonul 12.

Mutația Q61R, c.182A>G a fost raportată anterior în CRC de către unii autori, dar din câte știu nu există nici un studiu cu privire la substituția dublă c.182_183AA>GT în CRC. În catalogul de mutații COSMIC această mutație este raportată o singură dată în neoplasmul tractului gastro-intestinal.

Rolul prognostic al mutațiilor în codonul 146 în CRC este controversat. Există date conform cărora modificările în exonul 4 sunt asociate cu un prognostic favorabil, în timp ce alte studii raportează o scădere semnificativă a supraviețuirii globale a pacienților cu mutații în exonii 3 și 4 și rezistența la terapia anti-EGFR (Therkildsen și colab., 2014).

Calea de semnalizare Ras/Raf/MAP/MEK/ERK interacționează cu p53. Activarea KRAS influențează capacitatea funcțională a p53 prin două mecanisme: creșterea vitezei de degradare a supresorului tumoral mediată de către MDM2, și scăderea transcripției genice a TP53. Recent, s-a demonstrat că proteinele p53 nu cooperează cu moleculele KRAS promovând formarea

adenocarcinoamelor pancreatice. În neoplazmele umane pe lângă mutații, gena KRAS este amplificată sau poate suferi LOH.

Ca parte a căii de semnalizare Ras/Raf/MAP/MEK/ERK, alterarea genei **BRAF** are importante implicații în creșterea celulară, proliferare, apoptoză, diferențiere, migrare celulară și supraviețuire. Mutațiile în gena BRAF afectează câteva situsuri localizate în domeniul kinazic, iar peste 70% dintre acestea sunt alterări ale codonului V600E. Cum era de așteptat, în urma secvențierii directe a genei BRAF, 77.8% din totalul mutațiilor detectate în lotul nostru au fost V600[E,V]. De asemenea, s-au detectat două substituții: D594[N,D] și D594[G,D], fiecare afectând câte un pacient. Nici o mutație nu a fost detectată în exonul 11 al acestei gene. Tipurile de alterări ale genei BRAF au constat din șapte transversii și două tranziții.

Studiile structurale au arătat că valina din poziția 600 a domeniului kinazic este esențială pentru a menține proteina Braf în conformație inactivă în absența interacției Kras-Braf. Mutațiile în acest situs determină înlocuirea restului de valină cu glutamatul și are ca rezultat activarea proteinelor Braf, legarea constitutivă a MEK și fosforilare sa.

Gruparea carboxil a acidul aspartic din poziția 594 formează legături cu ionii de Mg^{+2} și stabilizează legarea ATP-ului la situsul catalitic. Alterările genetice ale acestui situs inhibă activitatea kinazică a oncogenei Braf și nu mai poate fosforila proteinele MEK.

Pierderea caracterului heterozigot sau amplificarea genei BRAF reprezintă evenimente rare în CRC, creșterea numărului de copii genice BRAF având rol în rezistența la terapie a neoplasmelor colorectale.

Analiza statistică a celor 63 de pacienți analizați în această teză de doctorat demonstrat o asociere semnificativă a mutațiilor în gena BRAF și localizarea în colonul proximal al tumorii ($p= 0.002$), dar și o frecvență crescută a mutațiilor genei KRAS în neoplazmele de rect ($p= 0.056$). Deși ocurența mutațiilor genei KRAS a fost mai mare în tumorile cu grad infiltrativ crescut și cele cu stadii mai puțin avansate, iar în cazul genei BRAF s-a observat o frecvență mai ridicată a alterărilor la pacienții sub 65 de ani, tumorile mai avansate și cu grad infiltrativ T3+T4. Nici o asociere semnificativă între alterările genelor KRAS și BRAF și vârsta, sexul, dimensiunea tumorii, invazia nodulilor limfatici, gradul de diferențiere sau prezența metastazelor la distanță nu s-a observat. Numeroase studii au sugerat că CRC cu mutații în gena BRAF sunt asociate cu caracteristici clinice și patologice distincte precum frecvența mai crescută la femei și la pacienții în vârstă, localizarea în partea dreaptă a tumorii, histologie mucinoasă și MSI-H (Gonsalves și colab., 2014). În lotul de lucru, cu excepția asocierii semnificative a mutațiilor cu localizarea în colonul proximal a tumorii ($p= 0.002$), nu am putut stabili o asociere semnificativă între mutații și parametrii mai sus menționați, probabil datorită numărului modest de pacienți, dar și a frecvenței reduse a alterărilor mutaționale în această genă.

Pentru a confirma suspiciunilor și a mutațiilor în genele KRAS și BRAF atribuite prin secvențiere directă, probele au fost analizate prin două tehnici alternative foarte sensibile: HRMA și discriminarea alelică. Studiile de sensibilitate a tehnicii HRMA au arătat că pentru exonul 2 al genei KRAS s-a putut discrimina diluția corespunzătoare unei concentrații de 1% celule LoVo într-un amestec de celule cu KRAS mt și celule cu KRAS wt, iar pentru exonul 15 al genei BRAF s-au putut detecta celulele Colo-201 (control pozitiv) cu o concentrație de 3%.

Toate mutațiile în genele KRAS și BRAF detectate prin HRMA au generat peak-uri duble vizibile. Însă, 11/30 (36.7%) probe cu mutații ale genei KRAS detectate prin HRMA au generat peak-uri vizibile în electroferograme, dar care nu au fost atribuite de către programul de analiză. În aceste cazuri, atribuirea mutațiilor s-a făcut manual. Toate mutațiile genei BRAF au fost confirmate prin atât prin HRMA, cât și prin secvențiere directă. În plus, probele ADN cu mutația V600E au fost confirmate în 100% din cazuri prin tehnica de discriminare alelică.

Datorită specificității înalte și a prețului relativ scăzut, cele două metode sunt recomandate pentru diagnosticarea moleculară de rutină.

În această lucrare, frecvența mutațiilor genei **TP53** este în acord cu baza de date IARC, dar și cu datele raportate de către alte colective de cercetare (<http://p53.iarc.fr>). Au fost detectate 20 tipuri de mutații, dintre care 13 (65.0%) au fost substituții ale unei singure baze azotate („missense”), 6 (30.0%) au fost mutații care au trunchiat proteina (3 mutații non-sense, 1 mutație „frameshift” și 2 mutații intronice la nivelul situsului de splicing alternativ), și o mutație a fost „non-”frameshift”. De asemenea, au fost detectate trei mutații nonsens în codonii 196, 213 și 343 și două inserții: una în exonul 4 (c.214_215insG), și una în exonul 7 (c.709-710insACTACA). Din informațiile noastre și după consultarea literaturii de specialitate, este pentru prima dată când duplicația ACTACA este raportată (Murărașu (a) și colab., 2017). Această mutație nu alterează cadrul de citire a proteinei.

Așa cum era de așteptat, s-a observat că 82.8% dintre mutațiile în gena TP53 au fost localizate în domeniul de legare la ADN. Spre deosebire de datele IARC, unde s-a raportat o frecvență mai mare a mutațiilor în exonii 5 și 7, în acest studiu frecvența alterărilor genetice la celor 2 exoni a fost mai mică, în timp ce o proporție mai mare în exonul 8 a fost observată. Mutațiile în codonii hotspot R175, G245, R273 și R282 au reprezentat 48.3% din totalul acestora, cel mai frecvent alterat codon fiind 273. În afara domeniului de legare la ADN, s-a detectat o mutație nonsens în domeniul de tetramerizare (p.Glu343*), și o inserție în regiunea SH3 bogată în prolină (p.V73fs*76). Substituția E343* poate interfera în procesul de formare a dimerilor și tetramerilor p53, iar V73fs*76 afectează activitatea funcțională a proteinei. Inserțiile și mutațiile stop generează proteine care sunt repede degradate proteolitic.

Doi pacienți au avut mutații intronice care alterează situsuri splice acceptor. Prima mutație a fost o tranziție $G \rightarrow A$ la capătul 3' al intronului 4 (c.376-1G>A), iar cea de a doua mutație a fost o tranziție $A \rightarrow G$ în poziția -2 din situsul splice acceptor, localizat în intronul 7 (c.783-2A>G). În cancer, mutațiile la nivelul acestor situsurilor reprezintă evenimente relativ rare care au ca rezultat deletarea exonilor și sinteza de proteine trunchiate. Mutația din intronul 4 a fost raportată anterior în tumorile colorectale în timp ce mutația din intronul 7 a fost detectată în carcinomul pulmonar, oral și de prostată, și din câte știm, nu a fost raportată în cancerul colorectal (Dallol și colab., 2016). Cele două mutații nu au fost detectate și în țesuturile pereche aparent normale de țesut colorectal, ceea ce demonstrează ca sunt evenimente somatice.

Tranzițiile $GC > AT$ au fost cele mai frecvente tipuri de mutații (65.5%), toate fiind localizate în insulele CpG (cu excepția celor două mutații din situsurile de splicing). Două probe prezentat tranziții $AT > GC$. Transversiile $GC > TA$ au fost detectate în 20.7% dintre cazuri, majoritatea fiind localizate în situsurile non-CpG. Nici o transversie $G \rightarrow C$ sau $A \rightarrow T$ nu a fost identificată în lotul analizat. Și în alte studii s-a raportat o frecvență mai crescută a tranzițiilor comparativ cu transversiile în CRC sporadic. În literatura de specialitate prevalența tranzițiilor $C \rightarrow T$ în tumorile colorectale este mai ridicată, comparativ cu prezentul studiu unde 34.5% dintre mutații au fost tranziții $G \rightarrow A$, și 31.0% mutații au fost de tip $C \rightarrow T$. Majoritatea transversiilor au fost detectate în tumorile rectale și la pacienți cu vârste de peste 70 de ani, deși în unele articole s-a raportat o incidență mai mare a transversiilor în tumorile de colon distal. Nici o transversie nu a fost găsită în tumorile proximale. Aceasta observație poate reflecta o etiologie diferită a neoplasmelor localizate în partea dreaptă sau stângă față de flexura splenică.

S-a demonstrat că transversiile sunt cauzate de carcinogeni externi, în timp ce tranzițiile sunt induse ca urmare a proceselor mutagenice endogene spontane. Dinucleotidele CpG din gena TP53 sunt înalt metilate în țesuturile normale. Datorită faptului că 5-metilcitozina suferă deaminări spontane cu o rată mai mare comparativ cu bazele nemetilate, numărul de nepotriviri T:G și, implicit a tranzițiilor $GC > AT$ crește. De asemenea, tranzițiile pot fi induse și de către agenți de alchilare precum compușii N-nitrozo care se formează în prezența hemului. Un exemplu îl reprezintă oxidul nitric, o moleculă cheie implicată în reglarea peristaltismului și inflamarea mucoaselor, care contribuie la creșterea numărului tranzițiilor în situsurile CpG. În mediu oxidant, acest compus deaminează direct 5-metilcitozina, iar indirect alchilează bazele de guanină. Mai mult, oxidul nitric poate inhiba repararea ADN-ului și promovează apoptoza dependentă de p53 exercitând astfel, o presiune selectivă a mutațiilor TP53. Dintre transversiile, cele de tip $G \rightarrow T$ sunt foarte frecvente și în alte forme tumorale precum cancerul pulmonar sau de ficat, și sunt asociate cu tipul de compuși mutagenici la care este expus organul respectiv. Studiile au arătat că aflatoxinele induc mutații în codonul R249 în tumorile HCC, iar

benzo(a)pirenol, component al fumului de tutun, poate afecta codonii 157, 158, 245, 248 și 273 în tumorigeneza pulmonară. Majoritatea transversiilor se găsesc pe catena netranscrisă a ADN-ului ceea ce sugerează că aducții benzo(a)pirenului nu sunt eficient înlăturați de către mecanismele de reparare a ADN-ului.

Studiile au demonstrat că activitatea funcțională a diverselor proteine p53 mutate este heterogenă. Astfel, se pot distinge trei tipuri de proteine mutate: fără activitate de transactivare, cu activitate reziduală, și mutații cu activitate comparabilă cu a proteinei fără mutații, și/sau cu câștig de funcții noi. În tumori, cele mai multe mutații, inclusiv hotspot, demonstrează o pierdere clară a activității proteinei p53 wt. Conform bazei de date IARC, cu excepția mutației din codonul 197, care determină sinteza unei proteine mutate parțial funcțională, toate mutațiile „missense” identificate în acest studiu determină codificarea unor proteine mutate non-funcționale. În cazul mutațiilor rare, care deși mai mult de jumătate își păstrează o parte din capacitatea funcțională, nu există corelație între activitatea transcripțională a proteinelor p53 mutate și abilitatea lor de a induce apoptoza.

Dintre tumorile localizate în colonul distal, 52.9% au prezentat mutații ale genei TP53. Totodată, în 43.8% dintre tumorile rectale și 42.9% tumorile de colon proximal s-au detectat mutații ale acestui supresor tumoral.

S-a observat o creștere semnificativă statistic a frecvenței mutațiilor genei TP53 în CRC cu metastaze distale ($p=0.038$), dar și o tendință de asociere a alterărilor genei TP53 în colonul proximal cu noduli regionali metastazați ($p=0.0567$). Nici o asociere semnificativă nu s-a stabilit între frecvența mutațiilor supresorului tumoral și sexul pacientului, vârsta, gradul de diferențiere, invadarea nodulilor limfatici, dimensiunea tumorii sau prezența metastazelor

Spre deosebire de majoritatea genelor supresoare ale tumorii (TSG), care sunt inactivate datorită delețiilor sau a mutațiilor ce trunchiază proteina, cele mai multe mutații asociate tumoral la nivelul supresorului p53 sunt “missense”. Acest tip de modificare genetică determină transcrierea unor proteine cu timp de înjumătățire mai mare decât în cazul proteinelor wt, majoritatea exercitând un efect dominant negativ asupra alelei wt. Din acest motiv mutațiile “missense” sunt selectate preferențial în timpul progresiei tumorale.

Totodată, proteinele p53 mutate pot dobândi funcții oncogenice neomorfe, care au capacitatea de a altera mecanismele implicate în menținerea integrității ADN-ului, și contribuie la creșterea rezistenței la o gamă variată de semnale pro-apoptice. Drept consecință, răspunsul la terapia cu agenți chimioterapeutici și radioterapie este diminuat, iar agresivitatea tumorii și potențialul de metastazare sunt crescute.

Efectul statusului mutațional al genei TP53 cu privire la răspunsul tumorilor la chimio- și radioterapie este încă larg studiat. Agentul chimioterapeutic 5-FU poate activa proteina p53 prin

diverse mecanisme și declanșează blocarea ciclului celular și/sau apoptoza. Numeroase investigații au raportat faptul că pacienții CRC cu mutații în gena TP53 sunt mai rezistenți la chimioterapie (în special cu 5-FU), și au un prognostic mai nefavorabil comparativ cu pacienții cu TP53 sălbatic. Un amplu studiu internațional care a inclus 3.583 de pacienți cu CRC proveniți de la 25 de grupuri de cercetare din 17 țări, a arătat că pacienții cu cancer de colon proximal și mutații în exonul 5 au avut un prognostic nefavorabil. De asemenea, mutațiile inactivatoare au avut incidență mai crescută în stadiile avansate ale tumorii și au fost asociate cu o rată scăzută de supraviețuire (Russo (b) și colab., 2005). Însă, mutațiile hotspot în codonul G245, dar și localizarea proximală a tumorii au fost asociate cu prognosticul nefavorabil al pacienților CRC.

Între statusul MSI și mutațiile în gena TP53 există raport invers de corelație cu privire la parametri clinici și biologici, în cazul CRC. Neoplasmele MSI-H (înalt instabile microsatelitic) sunt caracterizate în general prin diploidie, localizare mai frecventă în partea dreaptă, histologie mucinoasă și diferențiere slabă, și sunt asociate cu un prognostic mai favorabil comparativ cu tumorile MSS. Tumorile CIN sunt localizate preponderent în partea stângă a intestinului gros, demonstrează aneuploidie și au histologie non-mucinoasă. În lotul nostru majoritatea probelor cu mutații în gena TP53 au fost stabile microsatelitic.

Variații polimorfice în gena TP53 la pacienții cu CRC sporadic

La nivelul genomului uman au fost identificate foarte multe variații genetice, iar 99.9% dintre acestea sunt variații ale unei singure nucleotide (SNP), și inserții-deleții mici (indel). Marea majoritate a SNP-uri se găsesc în regiunile necodante, dar sunt localizate și în exoni, regiunile reglatoare, situsurile de splicing, de legare a microARN-urilor sau epigenetice. Variațiile polimorfice localizate în regiunile codante ale unei gene pot afecta funcționalitatea proteinei transcrisă, alterând nivelurile de expresie genică, stabilitatea transcripțiilor și evenimentele de splicing criptic. Unele variații polimorfice intronice pot afecta de asemenea, mecanismele de reglare transcripțională, cresc susceptibilitatea la cancer și contribuie la dezvoltarea tumorală, însă numeroase SNP-uri nu au efect biologic cunoscut. Totuși, rezultatele studiilor de corelații dintre variatele polimorfisme și riscul de cancer sunt inconsistente. Pe lângă prezența unor polimorfisme documentate ca fiind asociate cu riscul de cancer, mutațiile germinative (sindroame familiale și moștenite), numeroase alte variații genetice, dar și factorii de mediu, reprezintă elemente de risc tumoral.

Este bine cunoscut faptul că gena TP53 este înalt polimorfică. În urma secvențierii celor 11 exoni ai genei TP53 și a regiunilor care flanchează zonele codante, s-au identificat 11 variații

polimorfice: zece au fost SNP-uri și una a fost un indel. Patru dintre polimorfisme au fost identificate în regiunea codantă, iar restul au fost localizate în introni.

În exonul 4 au fost detectate două SNP-uri: substituția non-sinonimă p.R72P (rs104522), identificată în aproape toate probele analizate, și substituția silent p.P36P (rs1800370) localizată în domeniul de transactivare al proteinei p53, identificată într-un singur caz. În două dintre cazurile analizate s-a detectat varianța sinonimă p.R213R (rs1800372) localizată în exonul 6, iar la un pacient s-a detectat varianța polimorfică p.R283C (c.847C>T) în exonul 8. Cea din urmă variație genetică a fost detectată și în țesutul normal pereche și este descrisă în literatura de specialitate ca fiind o mutație germinativă. Din câte știm acest pacient nu are istoric de CRC familial.

La nivelul regiunilor intronice ale genei TP53 au fost identificate șapte variații polimorfice (șase SNP-uri și o duplicație). SNP-urile rs1642785, identificat în 98.4% dintre cazuri, și rs17883323, detectat în 7.9% dintre probe, au fost localizate în intronul 2. În intronul 3 a fost detectat indel-ul rs17878362, cu o copie (alela A1) sau două copii (alela A2) a secvenței de 16 pb ACCTGGAGGGCTGGGG. Polimorfisme heterozigote (A1A2) și homozigote mutate (A2A2) au fost detectate în 23.8% din probe. În intronul 6 s-au identificat două SNP-uri: rs17880604, identificat la 6.4% dintre pacienți, și rs1625895, care a afectat 98.4% dintre aceștia. În intronul 10 au fost identificate două substituții heterozigote rare: rs17880847 (c.1100+30A>T), care a afectat 1.6% dintre pacienți și rs17881850 (c.1101-49C>T), identificat în 4.8% dintre probele.

Frecvențele alelelor polimorfismelor identificate la cei 63 de pacienți au fost similare cu cele raportate în baza de date dbSNP NCBI pentru populația europeană, cu excepția lui rs1042522, caz în care frecvența alelei minore la pacienții români cu CRC a fost mai mică comparativ cu incidența raportată în baza NCBI pentru populația europeană sănătoasă ($p=0.064$), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>, Phase 3 call set). Totodată, cu excepția lui rs149633775, frecvența alelelor variațiilor genetice detectate în acest studiu au fost în echilibru Hardy-Weinberg.

Polimorfismul rs1042522 este cel mai studiat. SNP-ul este o transversie $G \rightarrow C$ care are ca rezultat substituția argininei (Arg72) cu prolina (Pro72) în codonul 72, și determină modificări structurale ale proteinei codate. Codonul 72 este localizat în regiunea bogată în prolină, cunoscută ca fiind importantă pentru funcția proteinei p53, în special funcția apoptotică. Distribuția alelică a acestui SNP depinde de originea etnică. Alela minoră Pro72 este mai frecventă la populația afro-americană și chineză, iar alela majoră Arg72 este mai comună la populația europeană. Frecvența alelei minore (MAF) raportată în baza de date dbSNP pentru populația europeană este de 0.29, iar în studiul nostru a fost de 0.17. Cele două izoforme au

proprietăți biochimice și biologice diferite. Proteina Arg72 este mai eficientă în a induce apoptoza, are capacitate mai mare de a interacționa cu MDM2 facilitând astfel, exportul nuclear și localizarea în mitocondrie a supresorului tumoral. Proteina Pro72 este mai eficientă în a induce blocarea ciclului celular, repararea ADN-ului și este asociată cu longevitatea. Numeroase publicații au demonstrat că acest polimorfism afectează apoptoza nu doar în contextul unei secvențe p53 sălbatică, ci și atunci când proteina este afectată de mutații somatice. Astfel, tumorile cu mutații TP53 care exprimă alela Arg inhibă apoptoza ca urmare a legării sale la proteina pro-apoptotică p73, iar rata de răspuns la tratament și supraviețuirea globală fără boală sunt scăzute. Tumorile care exprimă Pro72 și p53 sălbatic sunt mai puțin susceptibile la apoptoză. Aceste discrepanțe se pot datora rolului complex al acestui polimorfism în cancer. Impactul biologic al celor două variante este influențat de factori precum: heterogenitatea mutațiilor genei TP53, specificitatea de țesut fondul genetic, sau alți factori neidentificați. În timpul tumorigenezei, alela Pro este frecvent pierdută la indivizii heterozigoți, iar alela Arg este frecvent mutată. Selecția preferențială a alelei Arg poate fi un rezultat al avantajului anti-apoptotic conferit de mutațiile recesive ale genei TP53.

Polimorfismul rs17878362 (PIN3) generează izoforme cu una sau două repetiții de 16 pb. În lotul analizat, frecvența alelei minore a fost de 0.13. În baza de date a NCBI frecvența acestei variații nu este raportată, însă studiile pe populația europeană au raportat o incidență a MAF în probele de control cuprinsă între 0.13-0.17. Regiunea afectată este bogată în resturi de guanină care formează structuri G-cvadrupe implicate în splicing-ul alternativ al ARNm-ului TP53. Prezența lui PIN3 modifică poziția structurii G-cvadrupe față situsul splice din intronul 2 și alterează echilibrul dintre proteina p53 completă transcrisă (FSp53) și transcriptul alternativ p53 incomplet care reține intronul 2 (p53I2). Ambele variante ale polimorfismul rs17878362 influențează splicing-ul alternativ al intronului 2, însă alela minoră A2 este asociată cu niveluri mai scăzute ale transcriptului p53I2, cu scăderea capacității de reparare a ADN-ului și cu apoptoza.

Polimorfismul rs1642785 este o substituție G → C care afectează o regiune bogată în repetiții CA din intronul 2. Frecvența MAF la caucazieni raportată de NCBI este similară cu cea raportată în lotul nostru. Echilibrul transcriptiilor FSp53 și p53I2 este influențat de către acest polimorfism prin modularea stabilității ARNm-ului alternativ. Studiile au arătat că nivelurile crescute ale celor doi transcripti sunt asociate cu haplotipul rs1642785-GG/rs17878362-A1A1, în timp ce prezența alelei rs1642785-C în combinație cu oricare alelă rs17878362 este asociată cu scăderea nivelurilor de pre-ARNm TP53, TP53 total, FSp53 și p53I2, datorită stabilității scăzute a transcriptiilor care conțin alela rs1642785-C. Se speculează că efectul destabilizator al alelei C se datorează numărului mare de repetiții CA din acest intron.

Frecvența alelei minore ale celorlalte polimorfisme identificate a variat între 0.04 și 0.01. SNP-urile rs1800370 (p.P36P) și rs1800372 (p.R213R) sunt două polimorfisme rare identificate în regiuni codante ale genei TP53. Deși inițial se credea că SNP-urile exonice sinonime (care nu modifică secvența de aminoacizi din structura proteinei), nu afectează funcțiile biologice ale proteinei wt, s-a constatat că unele dintre acestea pot modifica expresia, împachetarea sau funcția proteinei sau pot determina noi evenimente de splicing alternativ. Spre exemplu, SNP-ul rs1800370 modulează afinitatea p53 pentru MDM2 și afectează capacitatea activare a apoptozei și nivelurile celulare ale p53, în timp ce SNP-ul rs1800372 nu descrie nici un efect cunoscut.

Variațiile polimorfice de la nivelul unei regiuni cromozomiale nu sunt moștenite aleatoriu. Multe dintre acestea sunt interconectate printr-un fenomen denumit *dezechilibru de legătură* (LD) și împreună formează blocuri de haplotipuri. Frecvența SNP-urilor și gradul de LD variază semnificativ între populații. Variațiile polimorfice, care individual nu sunt cunoscute ca având efecte biologice, pot fi într-un puternic LD cu SNP-uri funcționale, împreună demonstrând un efect cumulativ în ceea ce privește riscul de cancer. În această lucrare, analiza Haploview a identificat un bloc de haplotipuri format din polimorfismele rs1625895, rs1042522, rs1642785 și rs17878362 aflate într-un puternic LD ($D' > 0.8$, $r^2 > 0.3$). Cele mai frecvente haplotipuri au fost GGA1 și ACCA2, împreună reprezentând 86.4% din totalul haplotipurilor observate în lotul de studiu. Deși rolul polimorfismelor rs1625895, rs1042522, rs1642785 și rs17878362 în CRC a fost larg studiat și, deși s-a demonstrat că afectează funcțiile proteinei și/sau nivelurile de expresie a ARNm, în urma studierii literaturii de specialitate nu am găsit articole despre acest bloc de haplotipuri.

Rezultatele studiilor de corelații între variabilele clinico-patologice și polimorfismele genei TP53 în CRC din literatură sunt inconsistente. În această lucrare s-a observat o scădere semnificativă statistic a valorilor MAF ale celor patru polimorfisme aflate în LD la pacientele cu CRC, comparativ cu bărbații. Totodată, frecvența alelelor majore ale celor patru variații genetice a fost mai ridicată la pacienții cu vârsta la diagnosticare mai mare de 50 de ani, atingându-se și în acest caz valoarea statistică (Murărașu (b) și colab., 2017). Din câte știu, în literatură astfel de studii sunt puține și descriu SNP-ul rs1042522. Două exemple sunt studiile lui Oliveira și Mahmood. Primul autor și colab., au arătat că expresia alelei G a SNP-ului rs1042522 a fost mai frecventă la femei, în tumorile cu grad infiltrativ scăzut și moderat, și în tumorile recurente (Oliveira și colab., 2013). În cel de al doilea studiu s-a observat că pacienții tineri sub 50 de ani purtători ai genotipului GC a polimorfismului rs1042522 prezintă un risc mai scăzut de dezvoltare CRC, iar prezența genotipului CC este mai frecventă la femei cu tumora localizată în colon (Mahmood și colab., 2014).

Tendințe similare de distribuție a frecvențelor alelelor s-au observat și în cazul corelațiilor haplotipurilor identificate cu parametrii analizați în acest studiu. Astfel, haplotipul ACCA2 a afectat preponderent bărbații și pacienții tineri cu CRC, în timp ce haplotipul GGGA1 a fost identificat mai frecvent la femei și pacienți în vârstă. Nici o asociere semnificativă statistic nu s-a observat între cele patru polimorfisme, haplotipuri și localizarea anatomică a neoplaziei, gradul de diferențiere histologică, infiltrarea tumorală, invazia nodulilor limfatici, stadiul Duke, prezența metastazelor distale și parametri moleculari: statusul mutațional al genei TP53 și LOH.

Analiza mutațiilor sincrone în genele KRAS, BRAF și TP53

În timpul progresiei tumorale colorectale este de așteptat ca alterările în genele KRAS, BRAF și TP53 să se acumuleze, astfel încât numărul de mutații sincrone ar trebui să fie mai mare comparativ cu cazul în care mutațiile în cele trei gene sunt evenimente independente. În realitate acest lucru nu se observă, ceea ce sugerează că existența unei mutații nu exercită presiune de selecție a mutațiilor în celelalte gene, iar alterările în genele KRAS/BRAF și TP53 sunt o consecință a două căi separate implicate în dezvoltarea CRC.

În lotul de 63 de pacienți cu CRC, nici unul nu a prezentat mutații multiple în aceeași genă, însă 23.8% dintre pacienți au avut mutații simultane la nivelul a două gene, iar 3.2% au prezentat mutații simultan în genele KRAS, BRAF și TP53. Distribuția mutațiilor duble a fost următoarea: 14.3% dintre cazuri au avut mutații simultane în genele KRAS și TP53, 6.3% au avut mutații simultane în genele BRAF și TP53, și în 3.2% dintre cazuri s-au detectat mutații în genele KRAS și BRAF. Incidențe similare a mutațiilor în TP53 și KRAS, și TP53 și BRAF au fost raportate și în alte studii (Cai și colab., 2014). Doi pacienți purtători de mutații în codonul 594 al genei BRAF au avut mutații și în gena KRAS. Nici unul dintre pacienți nu au prezentat simultan mutații hotspot în genele KRAS și BRAF ceea ce confirmă că mutațiile în cele două gene sunt mutual exclusive. Merită menționat că acești doi pacienți au avut mutații și în gena TP53, ceea ce poate sugera un prognostic nefavorabil și o evoluție proastă a bolii.

Analiza pierderii caracterului heterozigotic la nivelul locusului genei TP53

Pierderea caracterului heterozigotic este un fenomen frecvent întâlnit în timpul tumorigenezei colorectale. Mutațiile în gena TP53 sunt frecvent însoțite de pierderea alelei sălbatice, ceea ce determină diviziunea necontrolată a celulelor și implicit, creșterea numărului de mutații. Între 50-70% dintre cazurile de CRC manifestă LOH la locusul genei TP53. Prezența

simultană a LOH și a mutațiilor la nivelul acestui supresor tumoral sunt asociate cu rezistența la terapie, creșterea potențialului de metastazare și prognostic nefavorabil. În prezentul studiu s-au analizat doi markeri microsatelitici care flanchează gena TP53. Întrucât studiul s-a realizat pe țesuturi tumorale heterogene (conțin atât celule tumorale, cât și celule normale), nici o probă nu a demonstrat LOH, ci doar dezechilibru alelic (AI). Dintre cazurile de CRC analizate în teza de doctorat, 50% au manifestat AI. Markerul intragenic TP53(CA)_n a fost mai frecvent alterat (94.2%), comparativ cu pentanucleotidul TP53(AAAAT)_n, (78.8%). AI la nivelul ambilor markeri s-a observat la 32.7% dintre pacienți. Cum era de așteptat, frecvența mutațiilor în gena TP53 s-a corelat semnificativ cu statusul AI ($p < 0.0001$). Deși nu s-a atins valoarea semnificativă statistic, incidența AI a fost mai crescută în tumorile de colon distal (47.1%), comparativ cu tumorile de colon proximal (42.9%) și de rect (37.5%). Rezultate similare au fost raportate și de către alte colective de cercetare (Perez și colab., 2016). Nu am găsit nici o asociere între statusul AI și ceilalți parametrii clinico-patologici investigați (vârsta, sexul, localizarea tumorii, gradul histologic, stadiul, etc.).

Analiza instabilității microsateliților în tumorile colorectale

Instabilitatea microsatelitică (MSI) reprezintă o alterare moleculară distinctă determinată de deficiențe în sistemul de reparare mismatch al ADN-ului, și este caracterizată de mutații care modifică lungimea microsateliților. Alterarea secvențelor repetitive din regiunile codante sunt în marea majoritate mutații “frameshift” care modifică întreg cadrul de citire al ADN-ului.

Neoplasmele MSI-H reprezintă o categorie clinico-patologică distinctă, caracterizată de incidența crescută la femei, în tumorile slab diferențiate, cu histologie mucinoasă, metastaze în nodulii limfatici, localizare în colonul proximal a neoplaziei, stadii timpurii ale tumorii, mutații în gena BRAF, CIMP+, prognostic favorabil și rezistență la chimioterapia cu 5-FU. Heterogenitatea moleculară a tumorilor MSI-H depinde și de rasă. Astfel, frecvența MSI-H raportată în țările vestice este de 12-20%, în timp ce în țările estice incidența este cuprinsă între 6-13%.

În prezent MSI și statusul mutațional al genei BRAF reprezintă markeri utilizați în rutina clinică în vederea evaluării riscului de cancer familial.

În lotul de 63 de pacienți cu CRC, 11.1% au prezentat MSI-H la nivelul tuturor celor cinci markeri analizați, iar singur pacient a fost caracterizat de MSI la nivelul markerului NR-21. Dintre neoplasmele cu MSI-H, 71.4% au fost slab diferențiate ($p = 0.002$), iar 28.6% au avut histologie mucoidă, însă fără a se atinge valoare cu semnificație statistică. Mutația hotspot V600E în gena BRAF a fost identificată la 42.9% dintre tumorile MSI-H ($p = 0.025$). Totodată, s-

a observat o bună asociere a caracterului MSI-H cu localizarea proximală a tumorii ($p= 0.025$). Deși fără valoare semnificativă statistic, MSI-H a fost mai frecventă în tumorile aflate în stadii timpurii, și cele caracterizate de o incidență mai crescută a genelor KRAS și TP53 wt, comparativ cu tumorile cu stabilitate microsatelitică (MSS).

Pentanucleotidele sunt unități repetitive polimorfice cu o lungime de cinci nucleotide și au fost incluse în protocolul de analiză MSI Promega cu scopul identificării posibilelor contaminări, dar și de a confirma dacă țesutul tumoral și perechea normală aparțin aceluiași individ. Penta C este localizat pe cromozomul 9p, și Penta D pe cromozomul 21q. Cu toate că cei doi markeri sunt mult mai stabili în celulele cu deficiențe ale sistemului de reparare MMR decât mono-, di- sau tetranucleotidele, în tumori sunt frecvent alterați. În lotul de studiu, 19.0% dintre pacienți au demonstrat AI la nivelul markerului Penta D, și 12.7% dintre cazuri au fost caracterizate de AI la situsul Penta C. De asemenea, s-a observat MSI la nivelul lui Penta C în 4.8% dintre probe, și la nivelul lui Penta D în 3.2% dintre cazuri.

Studiul fenotipului metilat al insulelor CpG în tumorile colorectale

În tumorigeneza colorectală metilarea aberantă a ADN-ului este un eveniment timpuriu care poate afecta până la 30% dintre tumorile colorectale sporadice. Fenotipul metilat al insulelor CpG (CIMP) reprezintă fenomenul de hipermetilare simultană a numeroase insule CpG, care se găsesc la nivelul promotorilor unor gene supresoare a tumorii, și este un important mecanism de inactivare a expresiei genice.

Tumorile CRC cu un caracter CIMP crescut (CIMP+), au un profil clinic și molecular distinct, caracterizat prin localizarea proximală a tumorii, asocierea cu statusul MSI-H, preponderență mai mare la femei și la pacienții în vârstă, frecvență mai mare a mutațiilor în gena BRAF, precum și inactivarea căii WNT/ β -catenin.

Datele din literatură sunt contradictorii cu privire la distincția clară între tumorile CIMP+ și cele cu fenotip CIMP redus sau negativ datorită lipsei unor metode uniforme de detecție a nivelurilor de metilare în cancer, a unui panel de markeri CIMP standardizat, a criteriilor de evaluare a CIMP, dar și a numărului mic de loturi analizate în multe studii.

În teza de doctorat, studiul fenotipului CIMP s-a realizat pe un lot de 40 de pacienți cu CRC cu ajutorul tehnicii MethyLight, pe setul de gene: CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3 și SOCS1. De asemenea, s-a analizat și statusul de metilare în gena MLH1. Ca urmare a stabilirii valorii de cut-off ≥ 3 markeri metilați, 15% dintre cazuri au fost CIMP+, iar 12.5% dintre pacienți au prezentat un nivel scăzut de metilare. În urma analizei distribuției numărului de markeri metilați, s-a constatat că: 10% dintre probe au prezentat un singur marker metilat, 2.5% au

avut doi markeri metilați, 10% au avut trei markeri metilați, și 5% au avut patru markeri metilați. Nici o probă nu a prezentat CIMP la nivelul tuturor celor cinci markeri. Markerii NEUROG1, RUNX3 și IGF2 au cel mai fost frecvent metilați.

Analiza de corelații dintre statusul CIMP și variabilele clinico-patologice a demonstrat o asociere semnificativă statistică între fenotipul metilat și mutația hotspot din gena BRAF ($p=0.002$), localizarea în colonul proximal a tumorii ($p=0.003$) și MSI-H ($p=0.0008$). Nici o asociere semnificativă nu s-a găsit între fenotipul CIMP, mutațiile în genele KRAS și TP53, histologie mucoidă și sexul pacienților.

Studiile cu privire la o posibilă asociere între mutațiile în genele KRAS, TP53 și CIMP sunt parțial contradictorii. Deoarece inactivarea epigenetică a genei MGMT predispune la mutații $G \rightarrow A$, s-a sugerat că există o legătură între CIMP și mutațiile în genele KRAS și TP53. Studiile sunt contradictorii cu privire la frecvența mutațiilor genei KRAS în tumorile CRC CIMP+, unele au raportat o incidență crescută, în timp ce alte colective au raportat o frecvență mai redusă. Într-un studiu de meta-analiză recent s-a raportat că tumorile CIMP- sunt caracterizate de o frecvență mare a mutațiilor în gena TP53, iar neoplasmalele cu status intermediar de metilare sunt asociate cu mutațiile în gena KRAS (Jia și colab., 2016).

Rolul prognostic, predictiv și de diagnostic în CRC al markerilor epigenetici este controversat. Multe studii au raportat un prognostic nefavorabil al pacienților CIMP+ comparativ cu pacienții CIMP-, dar de cele mai multe ori nu s-a reușit atingerea unei semnificații statistice datorită numărului mic de probe analizate (Jia și colab., 2016). Însă, s-a raportat un prognostic favorabil al neoplasmelor CIMP+. Deși evoluția clinică favorabilă este o caracteristică a tumorilor CRC cu MSI-H, rolul prognostic al pacienților cu CIMP+ în tumorile cu MSI-H este controversat. Unii autori au constatat că efectul advers al CIMP poate fi inversat de MSI, în timp ce în alte studii s-a constatat un prognostic nefavorabil al pacienților CIMP+/MSI-H (Bae și colab., 2011). În tumorile stabile microsatelitic, statusul CIMP+ și mutația V600E în gena BRAF sunt asociate cu un prognostic mai nefavorabil comparativ cu tumorile cu BRAF wt.

Este binecunoscut faptul că neoplasmalele colorectale sporadice MSI-H sunt caracterizate de inactivarea epigenetică a supresorului tumoral MLH1. Produsul acestei are un rol cheie în repararea mismatch a ADN-ului. În sindromul Lynch, MSI se datorează mutațiilor germinative la nivelul acestei gene sau a delețiilor în gena TACSTD1. În rutina clinică, statusul metilat al MLH1 reprezintă un marker de selecție al pacienților care vor beneficia de testarea genetică pentru sindromul Lynch.

În lotul de studiu, promotorul genei MLH1 a fost hipermetilat la 12.5% dintre pacienții CRC, iar 80% dintre aceștia au fost CIMP+. Deși lotul analizat a fost modest, s-a observat o corelație semnificativă a hipermetilării MLH1 cu frecvența crescută la femei ($p=0.031$),

localizarea proximală a tumorii ($p= 0.015$), CIMP+ ($p= 0.0008$) și MSI-H ($p= 0.0003$). Deși fără valoare semnificativă statistic s-a observat o frecvență mai crescută la pacienții cu vârste de peste 65 de ani, și în neoplasmele cu BRAF, KRAS și TP53 fără mutații. Merită menționat că toate probe CIMP+ cu MLH1 metilat au fost MSI-H.

Evaluarea expresiei genelor implicate în proliferare, adeziune celulară și apoptoză

În timpul tumorigenezei, evenimente moleculare precum acumularea mutațiilor, MSI, LOH, CIMP, hipometilarea oncogenelor amplificarea genică, etc., alterează profilele de expresie genică. Deși studiile de expresie genică la nivelul întregului genom uman au o contribuție majoră la înțelegerea diverselor fenomene și mecanisme celulare din timpul carcinogenezei, iar rolul predictiv și de răspuns la terapie al profilelor de expresie genică este evaluat în diverse trialuri clinice, translatarea în rutina clinică a acestor teste este limitată datorită dificultăților de reproductibilitate și standardizare. Însă există o reală necesitate de identificare a noi biomarkeri în scopul îmbunătățirii subclasificării tumorilor colorectale, și a predicției evoluției clinice a pacientului tumoral. În literatura de specialitate sunt relativ puține studii de expresie pe un număr mic de gene și care au avut ca scop analiza sistematică a potențialilor markeri ARNm în tumorile colorectale, majoritatea cercetărilor fiind axate pe studii de imunohistochimie (IHC) sau microarray.

În această etapă a tezei de doctorat s-a urmărit evaluarea nivelurilor de expresie relativă a unui set de zece gene: BIRC5, CDH1, KLF4, SPARC, TACSTD1, EZH2, PLK1, TP53, TP53INP1 și WRAP53. Analiza cantitativă relativă a expresiei celor zece gene s-a realizat pe un lot de 40 de țesuturi tumorale și mucoasele pereche aparent normale, prin tehnica RT-qPCR.

În urma analizei profilelor de expresie genică s-a observat o creștere semnificativă statistic a nivelurilor transcripților BIRC5, EZH2, PLK1, TACSTD1 și TP53 în tumori, comparativ cu țesuturile pereche normale, iar nivelurile transcripților KLF4, TP53INP1 și CDH1 au fost scăzute în neoplasmele colorectale. Nivelurile de ARNm ale SPARC și WRAP53 au fost mai crescute în tumori decât în țesuturile normale, însă fără a se atinge valoare statistică.

TP53 este cel mai cunoscut factor transcripțional implicat în controlul ciclului celular, menținerea integrității ADN-ului, apoptoză, supraviețuire celulară și homeostazie. Proteina p53 wt funcționează ca un supresor al creșterii celulare prin capacitatea sa de a transactiva inhibitorii kinazici-dependenți de ciclina, prevenind ieșirea celulelor din faza G1 a ciclului celular și blocând sinteza replicativă a ADN-ului. Dacă materialul genetic este prea sever lezat, p53 declanșează moartea programată celulară.

Mutațiile și LOH în gena TP53 sunt evenimente frecvent întâlnite în numeroase carcinoame umane inclusiv CRC, cancerul mamar, esofagian sau hepatocelular. Cercetările au arătat că neoplasmene cu mutații TP53 sunt caracterizate de creșterea expresiei nivelurilor transcriptului. În studiul de față, supraexpresia ARNm a TP53 a fost observată la 47.5% din probele analizate, iar 15% din cazuri au demonstrat o scădere a nivelurilor supresorului. De asemenea, s-a observat creșterea nivelului de expresie genică în tumorile cu mutații p53 mt, însă fără valoare statistică. Lipsa corelației între cei doi parametri se poate datora mutațiilor stop și a inserțiilor. Astfel de mutații transcriu proteine trunchiate care sunt rapid degradate de către celulă. Mutațiile în gena TP53 sunt evenimente tardive în secvența adenom-carcinom, însă supraexpresia p53 este un eveniment timpuriu ale carcinogenezei colorectale. Totuși, creșterea nivelurilor de ARNm ale supresorului tumoral nu are valoare predictivă asupra statusului mutațional.

Datele din literatură cu privire la rolul prognostic și corelațiile cu variabilele clinico-patologice sunt, în parte contradictorii. Spre exemplu, unii autori au raportat că expresia p53 este asociată cu un prognostic nefavorabil al pacienților cu CRC, în timp ce în alte studii nu s-a găsit nici o astfel de corelație (Kim și colab., 2013). Studii de IHC pe tumorile de rect au demonstrat o corelație inversă între acumularea proteinei p53 cu răspunsul pozitiv la chimio- și radioterapie, dar și o corelație directă cu invazia limfatică.

Supresorul tumoral *TP53INP1* este o țintă transcripțională a proteinei p53 indusă de factori de stres, și are activități anti-proliferative și pro-apoptotice. Gena codifică două izoforme: TP53INP1 α și TP53INP1 β . Ambele izomorfuri au rol important în procesele celulare p53-dependente. Independent de p53, TP53INP1 induce autofagia celulară prin interacția directă cu factori implicați în acest fenomen, asigură homeostazia mitocondriei, reglează metabolismul energetic și reprimă migrarea celulelor tumorale. Dacă lezarea ADN-ului nu este foarte severă, supresorul tumoral p53 determină blocarea ciclului celular în faza G1, și repararea ADN-ului. Dacă ADN-ul este prea sever lezat, TP53INP1 este exprimat în exces, și poate declanșa printr-un feedback p53 pozitiv, apoptoza. Expresia ectopică a TP53INP1 crește activitatea transcripțională a lui p53 asupra unor gene țintă. În absența lui p53, expresia TP53INP1 poate fi declanșată și de către alți factori transcripționali. Celulele tumorale cu mutații ale genei TP53 mutat sunt incapabile să activeze expresia TP53INP1 ca răspuns la stresul celular. Există dovezi conform cărora WRAP53 reglează și nivelurile proteinelor și a transcripturilor p53 mutați. Această observație experimentală deschide posibilitatea unei noi strategii terapeutice care țintesc WRAP53 în tumorile cu mutații în gena TP53. Deși nu s-a atins valoare semnificativă statistic, s-a observat o ușoară creștere a expresiei genei TP53INP1 în tumorile cu mutații în gena TP53.

TP53INP1 este exprimată ubicuitar în întreg organismul, în funcție de organ. Spre exemplu, în timus, inimă și testicule expresia sa este crescută, în plămâni, rinichi, colon, pancreas și stomac expresia este scăzută, iar în creier nivelul de expresie este aproape zero.

În tumori precum CRC, mamar, pancreatic, de prostată, etc., expresia proteinei TP53INP1 este scăzută. Studiile cu privire la expresia și rolul TP53INP1 în tumorile colorectale sunt foarte puține. În lotul nostru de studiu s-a observat o scădere semnificativă a expresiei de ARNm a TP53INP1 în tumori, comparativ cu mucoasa normală ($p=0.004$).

WRAP53 este transcriptul natural antisens a lui TP53, face parte din familia proteinelor WD40, și este implicat în reglarea apoptozei, a ciclului celular, degradarea proteomică și metabolismul ARN-ului. Gena WRAP53 codifică trei transcripti WRAP53 α , WRAP53 β și WRAP53 γ . În condiții normale, legarea transcriptului WRAP53 α la p53 determină acumularea intracelulară atât a ARNm, cât și a proteinei p53, în timp ce în celulele supuse unei agresiuni genotoxice, blocarea expresiei WRAP53 determină reducerea nivelurilor de p53. Proteina WRAP53 β controlează traficul intracelular al proteinelor de reparare a ADN-ului, al telomerazelor și al factorilor de splicing, susținând proliferarea celulară prin legarea la telomerază și adăugarea de repetiții telomerice la capetele cromozomilor, formarea corpiilor Cajal și repararea rupturilor ambelor lanțuri ale ADN-ului. Funcția celei de a 3-a izoforme este puțin cunoscută.

Studiile cu ARN de interferență au arătat că inactivarea expresiei genei WRAP53 determină blocarea ciclului celular în faza G2/M, urmată de apoptoza masivă pe calea mitocondrială în celulele tumorale, dar nu și în celulele normale, ceea ce sugerează că expresia WRAP53 este importantă pentru supraviețuirea celulelor canceroase (Garvin și colab., 2015). În grupul de studiu, expresia WRAP53 a fost mai crescută în neoplasmelor CRC cu gena TP53 mt, dar fără semnificație statistică.

Rolul izomorfelor WRAP53 în dezvoltarea și progresia neoplasmelor este puțin cunoscut. Nivele crescute ale expresiei WRAP53 au fost observate în tumori umane precum carcinoame cu celule scuamoase de esofag, rectal, sau carcinoame cu celule scuamoase de cap și gât. În acest studiu expresia ARNm a WRAP53 a fost scăzută în tumorile colorectale, comparativ cu țesuturile normale pereche, însă nu s-a atins semnificație cu valoare statistică, 67.5% dintre cazuri fiind irelevante.

Pierderea funcțională a proteinelor p53 și WRAP53 contribuie la patogeneza cancerelor umane, îmbătrânirea prematură și neurodegenerare. Studiile pe tumorile de rect fără radio-terapie, au demonstrat o bună corelație între expresia crescută a proteinei WRAP53, recurența locală a bolii și prognostic nefavorabil. În cazul tumorilor metastazate și radio-tratate, expresia acestei proteine s-a asociat cu un prognostic favorabil.

Factorul antiproliferativ ***KLF4*** este implicat în diverse procese biologice fundamentale precum controlul ciclului celular, proliferare, reglarea transcripțională a expresiei genice, repararea ADN-ului, diferențiere, apoptoză și reprogramarea celulelor somatice în celule stem pluripotente.

În funcție de context, funcția ***KLF4*** este duală, fiind capabil să coordoneze transcrierea genelor care codifică inhibitori ai ciclului celular, represia genelor care codifică activatori ai ciclului și blocarea proliferării celulare prin blocarea ciclului în faza de tranziție G1/S. Sub acțiunea stresului genotoxic, ***KLF4*** reprimă transcripțional p53 împiedicând tranziția G2/M, sau poate induce apoptoza prin inhibarea proteinei Bax. Deși fără a avea valoare semnificativă, în lot de 40 de pacienți cu CRC am observat o tendință de creștere a expresiei ***KLF4*** în tumorile cu mutații în gena TP53. Studiile pe carcinoame cu celule scuamoase au demonstrat că proteinele codate de gena TP53 cu mutații H179Y și R282Q se pot lega la promotorul genei ***KLF4***, determinând activarea sa endogenă. Analizele imunohistochimice au confirmat coexpresia ***KLF4*** și a mutațiilor p53 în aceste tumori.

În neoplasmale de stomac, esofag, vezică urinară, colorectal, pulmonar, ***KLF4*** se comportă ca un supresor tumoral, în timp ce în tumorile de piele sau de sân are activitate de oncogenă. În grupul de pacienți CRC de studiu, expresia ***KLF4*** a fost scăzută la 50% dintre aceștia, ceea ce susține rolul de supresor tumoral în această formă de boală tumorală.

Datele cu privire la rolul prognostic al ***KLF4*** în CRC sunt puține și parțial contradictorii. Unele studii au arătat că expresia ***KLF4*** este un factor de predicție independent al supraviețuirii și a recurenței în CRC.

PLK1 este membru al familiei de serin/treonin kinaze mitotice, și este implicat în maturarea centrozomului, intrarea în faza M a ciclului celular, formarea fusului mitotic, sinteza ADN-ului și menținerea integrității ADN-ului. Kinaza interacționează cu diferiți supresori tumorali, printre care p53. Cele două proteine sunt implicate într-un mecanism de autoreglare negativă. Astfel, ***PLK1*** fosforilează proteina p53 prin interacția cu domeniul DBD al proteinei p53, iar legarea lui p53 la nivelul elementelor p53-responsive din promotorul genei ***PLK1***, ca urmare a stimulilor genotoxici, determină represia sa și blocarea celulelor în faza G2/M. Creșterea nivelurilor de expresie a ***PLK1*** inhibă funcția apoptotică a supresorului tumoral p53, în timp ce depleția factorului proliferativ ***PLK1*** are ca rezultat creșterea nivelurilor celulare ale p53. Proteinele p53 mutate sunt incapabile de a se lega la promotorul genei ***PLK1***, și contribuie la creșterea nivelurilor celulare de ***PLK1***. În acest studiu, s-a observat o creștere semnificativă a ***PLK1*** în tumorile cu mutații în gena TP53 comparativ cu neoplasmalele cu TP53 wt (p= 0.023).

PLK1 este supraexprimat în multe forme de cancer umane precum: carcinomul esofagian, mamar, endometrial, gastric, prostată, CRC. În lucrarea de față, PLK1 a fost supraexprimat în 57.5% dintre tumorile CRC, comparativ cu țesuturile normale.

Cercetările au demonstrat o corelație semnificativă a nivelurilor de expresie a PLK1 cu vârsta avansată a pacienților, stadiul tumoral, invazia limfatică, recurență, prognostic nefavorabil, agresivitate ridicată și rezistență la radioterapie în cazul cancerului de rect (Han și colab., 2012).

Survivina, codificată de gena **BIRC5**, este un inhibitor al apoptozei, și un reglator al mitozei. Expresia BIRC5 este controlată transcripțional inclusiv de către p53, care se leagă la promotorul acestei gene. După lezarea ADN-ului, survivina este eliberată din mitocondrie în citoplasmă, se stabilizează în faza M a ciclului celular, și inhibă apoptoza. Totodată, nivelul de p53 este stabilizat și reprimă transcrierea BIRC5, menținând echilibrul între concentrația survivinei eliberate și activarea caspazelor.

În condiții normale, survivina este exprimată doar în țesutul fetal, dar nu și în majoritatea țesuturilor adulte diferențiate. În tumori, inclusiv CRC, cancerul hepatic, gastric sau mamar, BIRC5 este supraexprimat și poate determina celula să depășească punctele de control, facilitând progresia celulelor tumorale. În lotul nostru, 57.5% dintre tumori au supraexprimat ARNm BIRC5. Totodată, s-a constatat creșterea expresiei inhibitorului apoptotic în tumorile cu mutații în gena TP53, comparativ cu tumorile cu TP53 wt ($p= 0.0519$), ceea ce sugerează că proteinele p53 mutate nu se mai pot lega la promotorul genei.

Datele din literatură demonstrează că supraexpresia genei BIRC5 în CRC reprezintă un factor independent de prognostic, și este asociat cu rata scăzută de supraviețuire și un răspuns nefavorabil al pacienților la chimio- și radioterapie, în special în cazul tumorilor de rect.

EZH2 reprezintă subunitatea enzimatică a complexului PRC2, care reprezintă un important reglator epigenetic ce metilează histona H3 la nivelul restului de lizină 27, și silențiază unele gene specifice. În plus, EZH2 poate forma complexe care activează transcripția genică printr-un mecanism independent de activitatea sa metiltransferazică, blochează apoptoza, stimulează proliferarea, inclusiv a celulelor stem, promovează invazia și metastazarea și activează angiogeneza tumorală. Expresia EZH2 poate fi reglată transcripțional, post-transcripțional sau post-translațional. Unul dintre supresorii transcripționali ai lui EZH2 este p53. Cercetările au arătat că în celulele tumorale cu p53 wt, dar și cele cu p53 mt, dar care nu exprimă EZH2 abrogarea punctele de control al ciclului celular G1 și G2/M sunt abrogate, și celulele sunt orientate spre apoptoză. Acesta mecanism nu fost observat și în celulele normale. În prezentul studiu, am observat o corelație pozitivă între nivelurile de expresie a genelor EZH2 și TP53, și o creștere a expresiei EZH2 în tumorile cu mutații în gena TP53.

În numeroase tumori umane, cum ar fi: neoplasmul de sân, melanom, endometru, prostată, CRC, etc., EZH2 este supraexprimat și se comportă ca o oncogenă, fiind asociat cu creșterea caracterului proliferativ, invaziv și agresiv al celulelor tumorale. Însă, în neoplasmele maligne hematologice EZH2 poate suferi mutații și se comportă ca o genă supresoare a tumorii. Rezultatele studiului celor 40 de tumori colorectale a arătat că EZH2 este supraexprimat în 57.5% dintre cazuri.

Deși majoritatea publicațiilor au raportat creșterea expresiei în CRC, corelarea cu rata de supraviețuire este pozitivă după unii autori, iar după alții negativă sau absentă.

E-caderina, codificată de gena **CDH1**, face parte din familia caderinelor implicate în medierea adeziunii intercelulare dependentă de Ca^{+2} , și este implicată în procese ca migrarea, proliferarea, apoptoza sau diferențierea celulară. Scăderea concentrației de CDH1, determină activarea efectorilor diverselor căi de semnalizare (Wnt, Rb/E2F1, EGFR), iar celulele evită astfel, mecanismele de control ale acestor procese.

Studii pe fibroblaste normale au arătat că pierderea expresiei CDH1 determină activarea căilor p53 și Rb. Pentru ca o celulă să evite semnalele de control a creșterii celulare este necesar ca cele două căi să fie inactivate. În tumorile cu defecte ale acestor semnalizări, cum este și cazul CRC, inactivarea CDH1 poate determina prelungirea timpului de intrare în faza S a ciclului celular a celulei, și implicit creșterea caracterului proliferativ. Proteinele p53 mutate, fără activitate transcripțională, suprimă expresia CDH1 concomitent cu stimularea expresiei SLUG sau ZEB-1, doi cunoscuți inhibitori ai moleculei de adeziune.

O gamă variată de țesuturi adulte normale exprimă CDH1, care este regenerată constant. Numeroase tumori solide epiteliale, inclusiv CRC, sunt caracterizate de scăderea nivelului de expresiei a proteinei și a transcripților CDH1. În acest studiu expresia CDH1 a fost scăzută la 40% dintre pacienții CRC, iar 42.5% dintre cazuri au fost irelevante.

Deși datele din literatură sunt inconsistente, unele studii au arătat că modificările de expresie ale CDH1 în carcinoamele colorectale sunt corelate cu dimensiunea tumorii, invazia nodulilor limfatici, diferențierea histopatologică, creșterea potențialului metastazant și un prognostic nefavorabil (Mehrzaad și colab., 2014).

TACSTD1 codifică glicoproteina epCAM localizată în membranele bazolaterale, și este implicată în adeziunea celulă-celulă, migrare, proliferare și diferențiere. Totodată, TACSTD1 este un biomarker al celulelor stem și utilizat în rutina clinică, unde determinarea delețiilor germinative heterozigote reprezintă un indicator al sindromului Lynch.

S-a raportat că expresia moleculelor p53 și epCAM se realizează într-un mod dependent de doză: creșterea nivelurilor de p53 este acompaniată de scăderea epCAM, în timp ce inactivarea lui p53 este corelată cu creșterea expresiei moleculei de adeziune. Mutațiile în gena

TP53 determină demetilări ale promotorului genei TACSTD1, și amplificarea genică. Nivelele de expresie genică ale TACSTD1 s-au corelat semnificativ cu mutațiile genei TP53 în lotul de 40 de pacienți cu CRC ($p=0.038$).

TACSTD1 este exprimată în celulele epiteliale normale, iar în majoritatea tumorilor umane, inclusiv CRC, ovariene, mamare cu nodule pozitivi, pancreatice, de prostată, etc., este supraexprimată. Însă, în funcție de micromediul tumoral și tipul de țesut, TACSTD1 poate acționa fie ca supresor tumoral, fie ca o oncogenă. Supraexpresia epCAM determină stimularea ciclului celular, și creșterea caracterului proliferativ ca urmare a inducerii transcripționale a expresiei c-myc, și a ciclinelor A și E. De asemenea, clivarea proteolitică a domeniului intracelular al epCAM generează un semnal mitogenic. În grupul de 40 de pacienți cu CRC analizați în teza de doctorat, 42.5% au supraexprimat TACSTD1.

Dezvoltarea adenoamelor colorectale este acompaniată de creșterea nivelurilor epCAM. Adenocarcinoame supraexprimă proteină și transcript TACSTD1, și sunt asociate cu o rată crescută de supraviețuire. În schimb, pierderea expresiei moleculei de adeziune este asociată cu un prognostic nefavorabil (Went și colab., 2006).

SPARC (osteonectina) este o moleculă anti-adezivă care se leagă la matrixul extracelular (ECM), fără a face parte din structura sa, funcționând ca o interfață între celulă și ECM. Osteonectina este implicată, de asemenea în procesele de apoptoză, proliferare, migrare, diferențiere celulară, angiogeneza și invazie. Funcția antiproliferativă a osteonectinei se datorează capacității sale de a modula expresia proteinelor reglatoare ale ciclului celular și a factorilor de creștere.

Studiile pe melanom au arătat că depleția SPARC determină activarea supresorului p53 și induce blocarea ciclului celular dependent de p21. În schimb, supraexpresia sa activează AKT și MDM2 limitând nivelurile p53, și supresează apoptoza p53-dependență. Studiile pe astrocite au demonstrat că mutațiile inactivatoare ale genei TP53 și creșterea expresiei SPARC potențează supraviețuirea celulelor tumorale, și evadarea supravegherii imune. Analiza expresiei SPARC în tumorile cu mutații în gena TP53 a demonstrat un trend semnificativ de creștere a nivelurilor de ARNm, comparativ cu țesuturile cu TP53 wt în lotul de lucru. Cel mai probabil, pacienții CRC care au supraexprimat SPARC și cu mutații în gena TP53 vor avea un prognostic și o evoluție nefavorabilă.

În țesuturile adulte normale expresia SPARC este minimă, și este activată în condiții patologice cum ar fi vindecarea unor leziuni. În tumori s-a observat că nivelurile de expresie ale SPARC sunt mai mici, comparativ stroma care le înconjoară. Totodată, expresia acestei molecule depinde de tipul de cancer, și de micromediul tumoral. În cancerul mamar, melanom și

glioblastoame SPARC este supraexprimat, în timp ce în cancerul ovarian sau pancreatic expresia sa este minimă.

Pacienții CRC cu nivel scăzut al SPARC au un prognostic nefavorabil și o scăzută rată de supraviețuire fără boală. Nivelurile crescute de expresie ale acestei molecule sunt asociate cu un prognostic favorabil, cu răspuns pozitiv la radio- și chimioterapie (5-FU și irinotecan), și poate induce senescența mediată de p53 în tumorile colorectale tratate cu irinotecan (Chan și colab., 2010).

Analiza corelațiilor dintre nivelurile de expresie ale celor zece gene și variabilele clinico-patologice și moleculare a demonstrat următoarele corelații semnificative statistic:

- nivelurile de ARNm ale BIRC5 ($p= 0.046$), EZH2 ($p= 0.037$), și PLK1 ($p= 0.022$) s-au corelat cu invazia nodulilor limfatici,

- expresia genelor CDH1, KLF4, TP53INP1 și WRAP53 a variat odată cu progresia și gradul de extensie locală a tumorii primare. De asemenea, expresia genei TP53 a crescut de la stadiul A la stadiul D ($p= 0.019$), însă nu s-a corelat cu gradul infiltrativ,

- în tumorile cu metastaze distale, variații semnificative ale nivelurilor de expresie genică s-au constatat în cazul genelor CDH1, KLF4, TP53 și TP53INP1,

- nivelul de ARNm al genei PLK1 a fost crescut la pacienții cu vârste de peste 65 de ani, ($p= 0.019$), iar expresia genei KLF1 a fost mai mare la bărbați, comparativ cu femeile ($p= 0.033$). Buna corelație a expresiei de ARNm a PLK1 cu vârsta sugerează existența unei căi moleculare care contribuie la alterarea mecanismelor de reglare a mitozei la persoanele vârstnice,

- valorile de expresie ale genelor CDH1 și TACSTD1 au scăzut semnificativ în tumorile de colon proximal ($p= 0.005$, și respectiv $p= 0.014$), față de neoplazmele rectale și distale,

- în tumorile slab de diferențiere s-a observat creșterea nivelurilor de expresie ale genei SPARC, comparativ cu tumorile moderat diferențiate,

- s-a constatat o semnificativă asociere între statusul mutațional al genei TP53 și nivelurile de expresie genică ale genelor BIRC5, CDH1, TACSTD1 și PLK1,

- neoplazmele CRC cu MSI-H s-a observat o scădere importantă a expresiei genei CDH1 ($p= 0.049$), față de tumorile MSS. O tendință similară s-a observat și în cazul neoplasmelor cu CIMP+ ($p= 0.085$),

- s-au observat nivele crescute ale transcriptului EZH2 în tumorile cu promotorul genei NEUROG1 hipermetilat ($p= 0.014$), ceea ce demonstrează funcționalitatea căii de inactivare epigenetică mediată de EZH2 în CRC,

- studiul de corelații a expresiei genei în neoplazmele cu mutații la nivelul acestui supresor a evidențiat. Deși fără valoare semnificativă statistic, s-a observat creșterea nivelului de transcript TP53 în tumorile cu variații polimorfice PIN3 și rs104522.

Analiza matricilor de corelații în țesuturile normale și tumorale de colon și rect a condus la următoarele observații:

- în mucoasele normale, expresia transcriptului BIRC5 a fost statistic asociată cu toate genele analizate, cu excepția transcriptului SPARC. Corelația pozitivă dintre aceste gene s-a păstrat și în țesuturile tumorale, cu excepția genelor KLF4 și PLK1,
- expresia genică a TP53 în țesuturile normale a fost pozitiv asociată cu expresia genelor BIRC5, KLF4, EZH2 și PLK1. În tumori s-a pierdut semnificația statistică cu KLF4, însă expresia TP53 s-a asociat semnificativ CDH1 și TACSTD1,
- s-a constatat o asociere pozitivă între expresia genelor CDH1, KLF4, TACSTD1 și PLK1, dar și între TACSTD1 și EZH1 în ambele tipuri de țesuturi,
- în țesuturile normale și tumorale, expresia genei SPARC a fost negativ asociată cu nivelurile de ARNm ale celorlalte gene. O excepție a fost observată în cazul genelor TP53 și WRAP53 în mucoasele normale, și TP53INP1 în tumori.

CONCLUZIILE CERCETĂRII

1. Secvențierea directă a genelor TP53, KRAS și BRAF pe un lotul 63 de pacienți cu CRC sporadic a evidențiat o frecvență a mutațiilor de 46.0%, 47.6%, și respectiv 14.3% în CRC.
2. La nivelul genelor TP53 și KRAS cele mai numeroase tipuri de mutații au fost tranzițiile, în timp transversilele au fost detectate în număr mai mare în gena BRAF.
3. În gena KRAS, 80% dintre alterările mutaționale au fost localizate în codonii hotspot 12 și 13 ai exonului 2, mutațiile G12[D,G] și G13[D, G] fiind cele mai frecvente.
4. Mutația hotspot V600[E,V] a reprezentat 77.8% din totalul mutațiilor genei BRAF. S-au mai identificat și două mutații la nivelul codonul D594. Nici o mutație nu a fost detectată în exonul 11 al acestei gene.
5. În gena TP53, 82.2% dintre mutații au afectat domeniul central de legare la ADN. Codonii hotspot R175, G245, R273 și R282 au cumulat 48.3% dintre mutațiile genei TP53, codonul R273 fiind cel mai frecvent alterat.
6. **Duplicația c.709-710insACTACA din exonul 7 al genei TP53 reprezintă un rezultat original, neraportat de alte colective de cercetare.**
7. O majoritate semnificativă a mutațiilor genei TP53 au fost localizate în tumorile de colon distal și în neoplasmalele cu metastaze distale.

8. Nu s-a observat o asociere semnificativă a KRAS mt cu factorii clinico-patologici analizați. Alterările mutaționale ale genei BRAF au fost semnificativ mai numeroase în tumorile localizate în colonul proximal.
9. Mai mult de jumătate dintre modificările genetice ale KRAS au fost confirmate atât prin secvențiere directă și prin HRMA, iar toate mutațiile genei BRAF detectate prin HRMA au fost confirmate prin secvențiere Sanger, cât și prin tehnica de discriminare alelică. Cazurile cu mutații detectate prin HRMA au fost atribuite manual după analiza electroferogramelor. Tehnicile HRMA și discriminarea alelică sunt sensibile și accesibile, ceea ce le face să fie translatabile în rutina clinică.
10. Din totalul de 63 de pacienți cu CRC analizați, 3.2% au prezentat mutații sincrone în toate cele trei gene, iar 23.8% au prezentat mutații duble. Asocierea mutațiilor TP53/KRAS, TP53/BRAF și KRAS/BRAF a fost identificată în 14.3%, 6.3% și respectiv 3.2% dintre probe.
11. Au fost identificate 11 variații genetice ale TP53, 36.4% dintre polimorfismele detectate fiind localizate în exoni. Frecvențele alelelor minore ale polimorfismelor identificate au fost similare cu cele raportate în baza de date dbSNP a NCBI pentru populația europeană, cu excepția SNP-ului rs 1042522 a cărui frecvență a fost mai mică în lotul nostru de studiu.
12. Analiza Haploview a identificat un bloc format din polimorfismele rs1625895, rs1042522, rs1642785 și rs17878362. Haplotipurile GGA1 și ACCA2 au fost cele mai frecvente, împreună reprezentând 86.4% din totalul haplotipurilor.
13. S-a observat scăderea semnificativă a frecvenței alelelor minore ale celor patru polimorfisme aflate în LD la femei, și creșterea procentului de alele majore la pacienții de peste 50 de ani. Haplotipul GGA1 a fost mai frecvent întâlnit la bărbați și la pacienții în vârstă, în timp ce haplotipul ACCA2 a afectat preponderent femeile și pacienții mai tineri.
14. În urma analizei LOH la locusul genei TP53, 50% dintre cazurile informative au demonstrat AI, iar 46.2% dintre pacienți cu mutații în gena TP53 au prezentat AI la nivelul acestui locus.
15. Frecvența tumorilor colorectale cu MSI-H a fost de 11.1%. Corelații semnificative au fost observate între MSI-H și localizarea în colonul proximal a tumorii, gradul de diferențiere histologic G3 și prezența mutației V600[E,V].
16. 15.0% dintre cele 40 de tumori colorectale analizate au fost CIMP+, iar markerii NEUROG1, RUNX3 și IGF2 au fost frecvent silențiați. S-a observat o asociere

- semnificativă a caracterului CIMP+ cu prezența mutației V600[E,V], localizarea tumorii în colonul proximal și status MSI-H.
17. Promotorul genei MLH1 a fost metilat la 12.5% dintre pacienții cu CRC și s-a corelat statistic cu frecvența mai crescută la femei, localizarea tumorii în colonul proximal, CIMP+ și MSI-H.
 18. Expresia factorilor care stimulează proliferarea celulară (EZH2, PLK1, TP53), a factorilor anti-apoptotici (BIRC5), precum și a celor cu proprietăți anti-adezive (TACSTD1, SPARC) au avut o expresie genică crescută în cele 40 de tumori analizate, comparativ cu mucoasele normale adiacente. Nivelurile de expresie ale genelor KLF4, TP53INP1, CDH1 în țesuturile tumorale colorectale au scăzut comparativ cu perechile aparent normale.
 19. S-a demonstrat asocierea semnificativă a expresiei genelor BIRC5, EZH2 și PLK1 cu invazia nodulilor limfatici.
 20. Nivelurile de ARNm ale CDH1, KLF4 și TP53INP1 au scăzut semnificativ odată cu progresia tumorală, în timp ce nivelurile de ARNm ale EZH2 și TP53 au crescut.
 21. Expresia genei PLK1 s-a asociat cu vârsta înaintată a pacienților cu CRC și cu prezența mutațiilor în gena TP53, iar expresia genei KLF1 a fost mai crescută la paciente, față de bărbați, iar nivelurile de ARNm ale genei SPARC au fost crescute în tumorile G3, comparativ cu G2.
 22. Valori cu semnificație statistică s-au obținut între nivelul de expresie al genelor CDH1, KLF4, TACSTD1, TP53INP1 și WRAP53 și gradul de infiltrare a tumorii. Nivelurile de expresie ale KLF4, SPARC5, TP53 și TP53INP1 au fost corelate semnificativ cu prezența metastazelor distale.
 23. Analiza matricilor de corelare a expresiei genice în țesuturile colorectale tumorale și normale a demonstrat asocierea dintre TP53 și expresia majorității genelor luate în studiu, fapt așteptat întrucât aceste gene sunt direct sau indirect reglate transcripțional de către supresorul tumoral. De asemenea, buna corelare între nivelurile de expresii ale majorității genelor în țesutul tumoral ilustrează modul în care acestea contribuie la menținerea fenotipului tumoral caracterizat prin creșterea proliferării celulare, inhibarea apoptozei și destabilizarea adeziunii celulare. Pierderea semnificației statistice a corelațiilor dintre expresia unor gene și/sau corelarea inversată în țesuturile tumorale față de mucoasele normale pot fi explicate prin alterarea mecanismelor de reglare funcționale în țesuturile normale, dar și datorită conexiunilor dintre diferite căi moleculare fapt ce permite ca expresia unei gene să fie reglată prin mai multe căi, iar nivelurile de expresie să fie date de echilibrul ce se stabilește între factorii implicați în reglarea genică.

24. Datele obținute în urma studiilor de expresie genică sugerează că determinarea nivelurilor de ARNm ale celor zece gene luate în studiu reprezintă potențiali biomarkeri în cancerul colorectal.
25. Rezultatele obținute susțin necesitatea unei abordări mai largi a sistemelor biologice care să ia în considerare caracteristicile genomice și epigenomice ale cancerului uman pentru o înțelegere individualizată a acestei maladii, cu consecințe directe asupra prevenției, a modului de tratament, dar și a îmbunătățirii speranței de viață a pacientului oncologic.

DISEMINARE

- + trei articole publicate în tematica tezei de doctorat în reviste cotate ISI, dintre care două ca prim autor,
- + opt articole publicate în afara tezei de doctorat, dintre care două au fost publicate în reviste cotate ISI, iar un articol ca prim autor,
- + o comunicare la un congres din străinătate în tematica tezei de doctorat, iar abstractul a fost publicat într-o revistă cotată ISI,
- + două participări la congrese internaționale în afara tezei de doctorat, iar unul dintre abstracte a fost publicat într-o revistă cotată ISI,
- + opt participări la congrese, conferințe și simpozioane în țară în tematica tezei de doctorat,
- + paisprezece participări la congrese, conferințe și simpozioane în țară în afara tezei de doctorat.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. **Bae, J.M., Kim, M.J., Kim, J.H., Koh, J.M., Cho, N.Y., Kim, T.Y., Kang, G.H. (2011).** Differential clinicopathological features in microsatellite instability-positive colorectal cancers depending on CIMP status. *Virchows Arch.* 459(1), 55-63
2. **Cai, Z.X., Tang, X.D., Gao, H.L., Tang, C., Nandakumar, V., Jones, L., Ye, H., Lou, F., Zhang, D., Sun, H., Dong, H., Zhang, G., Liu, Z., Dong, Z., Guo, B., Yan, H., Yan, C., Wang, L., Su, Z., Wang, F.Y., Wan, J.J., Fang, F.Q., Chen, H.L., Shang, D., Huang, X.F., Chen, S.Y., Guo, H.S. (2014).** APC, FBXW7, KRAS, PIK3CA, and TP53 Gene Mutations in Human Colorectal Cancer Tumors Frequently Detected by Next-Generation DNA Sequencing. *J Mol Genet Med*, 8, 145
3. **Chan, J.M., Ho, S.H., Tai, I.T. (2010).** Secreted protein acidic and rich in cysteine-induced cellular senescence in colorectal cancers in response to irinotecan is mediated by P53. *Carcinogenesis*. 31(5):812-819

4. **Chen, J.**, Guo, F., Shi, X., Zhang, L., Zhang, A., Jin, H., He, Y. (2014). BRAF V600E mutation and KRAS codon 13 mutations predict poor survival in Chinese colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 14, 802
5. **Dallol, A.**, Buhmeida, A., Al-Ahwal, M.S., Al-Maghrabi, J., Bajouh, O., Al-Khayyat, S., Alam, R., Abusanad, A., Turki, R., Elaimi, A., Alhadrami, H.A., Abuzenadah, M., Banni, H., Al-Qahtani, M.H., Abuzenadah, A.M. (2016). Clinical significance of frequent somatic mutations detected by high-throughput targeted sequencing in archived colorectal cancer samples. *J Transl Med*. 14(1), 118
6. **Garvin, S.**, Tiefenböck, K., Farnebo, L., Thunell, L.K., Farnebo, M., Roberg, K. (2015). Nuclear expression of WRAP53 β is associated with a positive response to radiotherapy and improved overall survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 51(1), 24-30
7. **Gonsalves, W.I.**, Mahoney, M.R., Sargent, D.J., Nelson, G.D., Alberts, S.R., Sinicrope, F.A., Goldberg, R.M., Limburg, P.J., Thibodeau, S.N., Grothey, A., Hubbard, J.M., Chan, E., Nair, S., Berenberg, J.L., McWilliams, R.R. (2014). Alliance for Clinical Trials in Oncology Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147. *J Natl Cancer Inst*. 106(7), dju106
8. **Han, D.P.**, Zhu, Q.L., Cui, J.T., Wang, P.X., Qu, S., Cao, Q.F., Zong, Y.P., Feng, B., Zheng, M.H., Lu, A.G. (2012). Polo-like kinase 1 is overexpressed in colorectal cancer and participates in the migration and invasion of colorectal cancer cells. *Med Sci Monit*. 18(6), BR237-46
9. **Jia, M.**, Gao, X., Zhang, Y., Hoffmeister, M., Brenner, H. (2016). Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic review. *Clin Epigenetics*. 8, 25
10. **Kim, H.R.**, Kim, H.C., Yun, H.R., Kim, S.H., Park, C.K., Cho, Y.B., Yun, S.H., Lee, W.Y., Chun, H.K. (2013). An alternative pathway in colorectal carcinogenesis based on the mismatch repair system and p53 expression in Korean patients with sporadic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 20(12), 4031-40
11. **Krogan, N.J.**, Lippman, S., Agard, D.A., Ashworth, A., Ideker, T. (2015). The cancer cell map initiative: defining the hallmark networks of cancer. *Mol Cell*. 58(4), 690-8
12. **Mahmood, S.**, Sivonova, M.K., Matakova, T., Dobrota, D., Wsolova, L., Dzian, A., Mistuna, D. (2014). *Cent Eu J Med*. 9(3), 405-4016
13. **Perez, R.E.**, Shen, H., Duan, L., Kim, R.H., Kim, T., Park, N.H., Maki, C.G. (2016). Modeling the Etiology of P53-Mutated Cancer Cells. *J Biol Chem*. pii, jbc.M116.724781
14. **Mehrzaad, J.** Mohammaditabr, M., Ebrahimi, Z. (2014). Methylation status of CDH1 promoter and E-cadherin expression in colorectal cancer. *Int J Biosci*. 4(10), 13-21
15. **Murărașu (a), D.**, Puiu, L., Aldea Pitica, I.M., Mambet, C., Mihalcea, C.E., Marinceaș, A.M., Cinca, S., Brașoveanu, L., Diaconu, C.C. (2017). TP53 somatic mutations and LOH profile in colorectal cancer in Romania. *Rom Biol Lett J*. *in press*
16. **Murărașu (b), D.**, Puiu, L., Mihalcea, C.E., Aldea Pitica, I.M., Mambet, C., Radu, E.L., Matei, L., Dragu, D.L., Simion, L., Marinceaș, A.M., Chivu-Economescu, M., Cinca, S., Brașoveanu, L., Bleotu, C., Diaconu, C.C. (2017). Characterization of TP53 polymorphisms in the Romania colorectal cancer patients. *Rom Biol Lett J*. *in press*
17. **Neumann, J.**, Zeindl-Eberhart, E., Kirchner, T., Jung, A. (2009). Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract*. 205(12), 858-62
18. **Oliveira, C.**, Velho, S., Moutinho, C., Ferreira, A., Preto, A., Domingo, E., Capelinha, A.F., Duval, A., Hamelin, R., Machado, J.C., Schwartz, S., Carneiro, F. Jr., Seruca, R. (2007). KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene*. 26, 158-63
19. **Pietrantonio, F.**, Petrelli, F., Coinu, A., Di Bartolomeo, M., Borgonovo, K., Maggi, C., Cabiddu, M., Iacovelli, R., Bossi, I., Lonati, V., Ghilardi, M., de Braud, F., Barni, S.

- (2015). Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 51(5), 587-94
20. **Russo (a)**, A., Bazan, V., Agnese, V., Rodolico, V., Gebbia, N. (2005). Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and TP53 CRC collaborative studies. *Ann Oncol*. 16 Suppl 4, iv44-49
21. **Russo**, A., Bazan, V., Iacopetta, B., Kerr, D., Soussi, T., Gebbia, N. (2005). The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol*. 2005, 23:7518–7528
22. **Shangkuan**, W.C., Lin, H.C., Chang, Y.T., Jian, C.E., Fan, H.C., Chen, K.H., Liu, Y.F., Hsu, H.M., Chou, H.L., Yao, C.T., Chu, C.T., Su, S.L., Chang, C.W. (2017). Risk analysis of colorectal cancer incidence by gene expression analysis. *PeerJ*. 5, e3003
23. **Therkildsen**, C., Bergmann, T.K., Henrichsen-Schnack, T., Ladelund, S., Nilbert, M. (2014). The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol*. 53(7), 852-64
24. **Weisenberger**, D.J., Campan, M., Long, T.I., Laird, P.W. (2006). Determination of the CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in colorectal cancer using MethyLight Protocol Exchange. *Nat Genet*. 38(7), 787-793
25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>, Phase 3 call set, 2017
26. <http://p53.iarc.fr>, 2017