

## **RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC**

Etapa 3/2014

### **Rezumat**

Conform Planului de realizarea al proiectului, pentru etapa 1/2014, proiectul a avut urmatoarele obiective:

- Selectia sondelor pentru prototipurile de structuri de tip array pentru cancerul de san;
- Fabricarea de prototipuri pentru cancerul de san. Monitorizarea parametrilor tehnici și fizico-chimici;
- Dezvoltarea modelului de referinta pentru caracterizarea cancerului de colon;
- Diseminarea rezultatelor: publicarea rezultatelor in reviste nationale si internationale si prezentarea de comunicari stiintifice;
- Workshop intermediar de analiza critica a proiectului;
- Pregatirea si prezentarea raportului de faza.

Obiectivele mentionate au fost realizate; astfel:

- pe baza datelor de literatura si a experientei proprii, a fost realizata o caracterizare extinsa a genelor brca1 si brca 2 implicate in generarea si evolutia cancerului mamar (prezent si la barbati), precum si altor forme de cancer; ovar, prostată, pancreas, melanom, colon, cancer de endometru. Folosind datele furnizate de organisme de profil (National Center for Biotechnology Information/genbank, www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) si respectiv, Agentia Internationala pentru Cercetari in Cancer Lyon, Franta (ce face parte din structura Organizatiei Mondiale a Sanatatii) referitoare la structura genelor brca au fost stabilite structurile sondelor pentru cancerul de san. S-a urmarit ca acestea sa aiba: (i) o lungime cuprinsa intre 25 - 30 nucleotide, care sa asigure o specificitate cat mai ridicata; (ii) sa corespunda unor exoni situati in zonele terminale ale genelor (corespunzatoare secventei C-terminale ale proteinelor codate) care au o implicatie majora in realizarea functiilor genice/proteice; secventele sa contina un procent cat mai redus de duplexuri G:C, pentru a se evita formarea de structuri autocomplementare de tip "ac de par";
- au fost fabricate structuri de tip array corespunzatoare codonilor 12 si 13 din exonul 2 al genelor Kras, prin depuneri de secvente oligonucleotidice pe placute de sticla sau de siliciu, ce au fost caracterizate functional. Pentru asigurarea unei legari eficiente la suport, la capatul 5' au fost atasate elemente de spatializare de tip aminoC6 si poliT. Au fost atasate atat secvente directe, cat si revers. Additional, au fost folosite, ca sonde, secvente complementare marcate cu agenti de colorare (cromofor) de tip Cy3 si Cy5. Principalele concluzii desprinse din studiul realizat asupra microcipurilor fabricate au fost: (i) se obtin rezultate mai bune pentru microcipuri pe suport de siliciu; (ii) etapa de blocare este esentiala in scaderea nivelului de fluorescenta a background-ului, data de substratul functionalizat si de atasarea nespecifica a moleculelor tinta, marcate fluorescent; cea mai eficienta este blocarea cu Na<sub>2</sub>BH<sub>4</sub>; (iii) Semnalele sunt diferite pentru secventele normale, respectiv, cele care contin 1-2 mutatii (mismatch); semnalul este mai puternic in cazul utilizarii ca agent de colorare Cy5, putandu-se evidentia diferente functie de numarul de mutatii. **Rezultatele obtinute indica posibilitatea de utilizare a microcip-urilor ADN ca metoda alternativa pentru detectia unor modificari structurale (mutatii) din gene implicate in aparitia si evolutia cancerului, putandu-se astfel identifica atat cai de preventie, cat si de prognostic si particularizare a tratamentului.**
- pentru dezvoltarea caracterizarii molecular/genetice ale unor probe de cancer colorectal, a fost dezvoltata metoda de secventire a genei p53, una dintre principale gene implicate in controlul unor procese celulare importante, printre care se numara apoptoza, gena care se coreleaza semnificativ cu

celelalte gene investigate in cadrul proiectului; brca, ras. Prezenta de secvente normale ale p53 conduce astfel directionarea spre apoptoza si implicit, eliminarea de celule transformate. in schimb, existenta unor mutatii ale p53 conduce fie la sinteza unor proteine inactive sau chiar cu functie schimbata, oncogenica, prezenta de secvente p53 reprezentand un factor de risc agravant si de avansare a bolii. Principalele concluzii ale studiului au fost: (i) datele prezentate confirma prezenta de anomalii (mutatii, substitutii, SNP) in structura genica p53 pentru probe provenite de la pacienti cu cancer colorectal. (ii) majoritatea substitutiilor observate sunt de tip missens, conducand, cu o singura exceptie (datorita degenerarii), la inlocuirea aminoacizilor din proteina codata, ceea ce poate afecta functiile proteinei. Restul de modificari sunt de tip SNP, prezente in regiunile intronice, ale caror consecinte sunt mai greu de estimat, (iii) in concordanta cu datele din literatura, mutatiile sunt prezente in exonii 4 - 8, (iv) ***s-a reusit secventierea completa a genelor p53, reusindu-se astfel atingerea obiectivului proiectului: caracterizarea extinsa a unor probe de cancer colorectal.***

- au fost prezentate 18 comunicari stiintifice in cadrul unor manifestarii stiintifice dintre care 4 - la manifestari peste hotare si 9 - la manifestari nationale cu participare internationala. Au fost publicate 9 articole, dintre care, 3 - in reviste cotate ISI;
- pentru a se realiza o verificare interna a modului de realizare a proiectului, precum si pentru identificarea unor aspecte ce se cer imbunatatite sau modificate, cei trei parteneri din proiect (IOB, IMT si IMC) au organizat un workshop; in cadrul acestuia, fiecare dintre parteneri si-a prezentat rezultatele obtinute si au facut propuneri pentru etapa urmatoare (2015) a proiectului; s-a apreciat ca s-au indeplinit sarcinile contractuale pentru etapa 2014 a proiectului si ca, in cursul anului s-a raspuns la timp tuturor solicitarilor venite din partea Autoritatii Contractante – UEFISCDI, inclusiv prin actualizarea sitului web al proiectului;
- conform acordului exprimat de toti partenerii si cu contributia efectiva a acestora, tinandu-se cont de indeplinirea prevederilor contractuale, atat pe plan stiintific, cat si financiar a fost elaborat prezentul raport de faza, care este inaintat spre evaluare si aprobare Autoritatii Contractante.