

15. Ramos J.D., *Gleevec Patient Assistance Program USA. Patient Guide*. Seattle: Cancer Resources & Advocacy, 2004: 1 – 5.
16. Richard R.E., Linenberger M., *Chronic myeloid leukemia*. In: American Society of Hematology Self-Assessment Program. Blackwell Publishing, 2005: 178 – 189.
17. Spinei L., Lozan O., Badan V., *Biostatistica*. Chişinău: Tipografia Centrală, 2009: 186 p.
18. Vardiman J.W., Harris N.L., Brunning R.D., *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms*. *Blood*, 2002; 100: 2292 – 2302.
19. Xenocostas A., *Chronic myelogenous leukemia (CML). Hematology Practice Guideline*. London Health Sciences Centre. London Regional Cancer Program, 2007: 1 – 10.
20. Масляк З.В., *Хронічний мієлоїдний лейкоз*. In: Гайдукова С.М. “Гематологія та трансфузіологія”. Київ: ВПЦ «Три крапки», 2001: 239 – 251.
21. Туркина А.Г., *Хронический миелолейкоз*. In: Воробьёв А.И. Руководство по гематологии. Москва: Ньюдиамед, 2003: 251 – 264.

PARTICULARITĂȚILE UNOR PROFILURI METILICE ALE PROMOTORULUI GENEI *p15*

LA PACIENȚII CU CANCER TIROIDIAN

Victor Popescu ¹, Andrei Țâbârnă ², Cristina Butovscaia ¹

Laboratorul de Genetică al USMF „Nicolae Testemițanu” ¹

Catedra Hematologie și Oncologie a USMF „Nicolae Testemițanu” ²

Summary

Peculiarities of some methylic profiles of p15 gene promoter in patients with thyroid cancer

In this study we have obtained some methylic profiles in DNA extracted from normal tissue and thyroid malignant tumors (various morphologic subtypes). We have identified differences in the methylic profile of *p15* gene promoter of the thyroid tumors compared with the profile of normal thyroid cells (peritumoral tissue). In conclusion we sustain that MM methylic profile of *p15* gene promoter can be used as a high-risk molecular marker for the examined person who can be affected with thyroid cancer referring the day of sample collection.

Rezumat

În cadrul studiului au fost obținute unele profiluri metilice atât la nivelul ADN-ului extras din țesutul normal al glandei tiroide cât și din tumori maligne ale glandei tiroide (diverse subtipuri morfologice). Au fost identificate diferențe ale profilului metilic la nivelul promotorului genei *p15* al celulelor din tumori în comparație cu profilul celulelor normale (țesutul peritumoral). S-a conchis că profilul metilic MM la nivelul promotorului genei *p15* poate servi ca marker molecular al riscului sporit către cancer tiroidian, raportat la ziua prelevării probei biologice.

Introducere

În diverse tumori umane a fost detectată metilarea aberantă a genei *p16* [Wong I., 2000; Hoque M et al., 2005]. Gena *p15* care este poziționată în situsul cromozomial 9p21, în apropierea genei *p16*, la fel, se caracterizează adeseori printr-un grad avansat al metilării în neoplazmele umane [Gronbaek K et al., 1998]. A fost stabilită corelația între hipermetilarea promotorului genelor *p15/p16* și stoparea transcripției în celulele neoplazice [Gonzalzo M et al., 1998].

Alterările profilurilor epigenetice și genetice în cancer adeseori includ hipometilarea la nivelul întregului genom, hipermetilarea locală a genelor supresoare de tumori sau a genelor

responsabile de reparația ADN, precum și a genelor inhibitoare ale metastazării, mutații punctiforme (substituția 5-metilcitozinei cu timina) din cadrul insulițelor CpG ale genei *p53* [Wong I., 2001].

În cele mai multe cazuri de cancer la om este stabilită producerea unor dereglări în cadrul cascadei ciclina D / retinoblastom (Rb), implicate în reglarea ciclului celular [Ewen M et al., 1993]. Genele *p16* și *p15* sunt gene supresoare în multe tumori solide sau neoplazii hematologice [Wong I., 2001]. Aceste gene codifică proteine-inhibitoare ale kinazelor ciclîn-dependente care, la rândul lor, servesc drept reglatori ai fosforilării proteinei *pRb*.

Totuși, deocamdată nu au fost găsite diferențe semnificative între profilurile metilice ale tumorilor din diferite stadii [Costello J. et al. 2000], sugerându-se că alterările epigenetice au loc în stadiile precoce ale dezvoltării cancerului sau în momentul inițierii tumorilor. Dereglarea unor căi critice precum *Rb /p16* și *p53 /p14 /MDM2*, sau altele, pot adeseori fi cauza creșterii neoplazice [Wong, 2001].

Perturbarea precoce a controlului ciclului celular prin metilarea *p16 /p15*, alterarea factorilor de transcripție, pierderea aderenței intercelulare în urma hipermetilării genei *E-caderina*, depășirea punctelor de control al ciclului celular în urma hipermetilării genei *p53*, pot contribui la proliferarea necontrolată și imortalizarea celulară [Baylin S. et al. 2000; Tîbîrnă Gh. 2003].

Scopul studiului

Compararea particularităților profilurilor metilice ale promotorului genei *p15* în țesutul normal al glandei tiroide și în tumori maligne tiroidiene în vederea stabilirii unor markeri molecular-epigenetici noi de diagnostic presimptomatic al cancerului tiroidian.

Materialul biologic, metodele și echipamentele utilizate

În acest studiu a fost investigat un lot de 35 persoane afectate de cancer tiroidian (tumori maligne din diverse subtipuri morfologice: carcinom medular, folicular, papilar) care au fost de acord cu includerea lor în prezenta cercetare științifică, fiind, anterior, diagnosticate primar și internate în Secția Tumori cap și gât a Institutului Oncologic din Republica Moldova.

Metoda de bază utilizată în cercetarea dată a fost studiul molecular al metilării ADN la nivelul promotorului genei *p15*, supresoare în tumori, prin conversia citozinei nemetilate în uracil (tratarea ADN-ului cu bisulfid de sodiu și amplificarea porțiunilor genice cu ajutorul perechilor de praimer nonmetil-specifici și metil-specifici prin tehnica *MSP (methylation specific polymerase chain reaction)* [Herman J., 1996; Protocol *QIAGEN 04/2006*].

Metodele și accesoriile utilizate au fost specifice fiecărei etape de lucru, după cum urmează:

1) **Prelevarea chirurgicală** a fragmentelor din glanda tiroidă (fragment din țesutul normal al glandei tiroide și, separat, din tumoră) la pacienții diagnosticați în prealabil cu cancer al glandei tiroide. Metoda: biopsie; Accesoriile: bisturiu, eprubete-criotub, container cu azot lichid.

2) **Extracția ADN** genomic uman din fragmente ale glandei tiroide, separat tumori și țesutul normal. Metoda: digestia enzimatică cu proteinază K; Accesoriile: fragmente din tumori și din țesutul normal peritumoral al glandei tiroide, proteinază K și soluții tampon pentru liza celulelor și proteinelor, pipete cu volum variabil, eprubete din plastic *Eppendorf* 1,5 ml, centrifugă 13.000 rot/min, termostat la 56°C, congelator, frigider.

3) **Modificarea ADN-ului** prin conversia citozinei în uracil. Metoda: protocol *Qiagen EpiTect Bisulfite Kit 04/2006*; Accesoriile: ADN genomic uman extras și purificat din țesuturile de analizat, set de reactivi *Qiagen EpiTect Bisulfite Kit 04/2006*, etanol absolut, pipete cu volum variabil, eprubete din plastic echivalent *Eppendorf* 0,2 ml, centrifugă 13.000 rot/min, vortex, congelator, frigider.

4) **Amplificarea** prin tehnica *MSP* a ADN-ului conținând uracil. Metoda: protocol PCR, *Fermentas*, Accesoriile: ADN purificat după conversia lui cu bisulfid de sodiu, *PCR Master Mix*

Fermentas, Primeri - Us, Uas, Ms, Mas, pipete cu volum variabil, eprubete din plastic echivalent *Eppendorf* 0,2 ml, centrifugă la 13.000 rot/min, baie cu gheață, aparat automat pentru amplificarea ADN - *Termocyclor-Crocodile III Appligene*, congelator, frigider.

5) **Analiza** produșilor de amplificare și interpretarea datelor.

Mersul lucrărilor

Pentru a putea analiza profilul metilic la nivelul ADN, care este principalul obiectiv al prezentului studiu, am planificat următoarele etape de lucru:

1. Prelevarea fragmentelor din glanda tiroidă (fragment din țesutul normal al glandei tiroide și, separat, din tumoră);
2. Extracția ADN-ului genomic uman din fragmente ale glandei tiroide;
3. Modificarea ADN-ului prin conversia citozinei în uracil;
4. Amplificarea prin MSP a ADN-ului modificat, conținând uracil;
5. Analiza produșilor de amplificare și interpretarea datelor.

Amplificarea ADN-ului modificat (aparținând aceluiași 35 persoane afectate de cancer tiroidian), conținând uracil, a fost realizată cu ajutorul protocolului ce urmează.

a) Pregătirea amestecului pentru reacția de amplificare în lanț (PCR)

Într-o eprubetă *Eppendorf* de 200 μ l cu pereți subțiri (se menține pe gheață) se adaugă componentele necesare în ordinea dată pentru a petrece reacția controlului-pozitiv de amplificare a ADN:

- Tampon PCR Master Mix, 2 \times (Echivalent *Fermentas*) – 25 μ l ;
- ^{N1} praimer p15U(s) - 300 ng, 6 μ l, 5'- TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT- 3'
- ^{N1} praimer p15U(as) - 300 ng, 4 μ l, 5'- CCATACAATAACCAAACAACCAA- 3'
- Apă deionizată sterilă - volum variabil;
- *Volumul amestecului de mai sus: 40 μ l*
- ^{N3} ADN modificat prin conversie \approx 50 ng, 10 μ l ADN în soluție 5 ng/ μ l
- *Volumul total al amestecului: 50 μ l*

^{N1} **Notă:** În eprubete separate (varianta “N 2”) se introduc aceleași componente ale reacției de amplificare, cu excepția praimerilor (se aplică praimerii metil-specifici - “N 2”) [Herman J., 1996]:

- ^{N2} praimer p15M(s)- 300 ng, 4 μ l, 5'- GCGTTCGTATTTTGC GGTT -3'
- ^{N2} praimer p15M(as)- 300 ng, 4 μ l, 5'- CGTACAATAACCGAACGACCGA -3'

^{N3} **Notă:** În reacțiile pentru controlul pozitiv al amplificării cu praimerii nonmetil-specifici și, separat, cu praimerii metil-specifici, se introduce ADN neconvertit (\approx 50 ng). În prealabil, într-un tub, separat, au fost introduși 11 μ l ADN matriță (5 ng/ μ l). Tubul a fost introdus în termociclor unde a fost denaturat 6 min la 95 °C. Apoi, din matrița denaturată am luat 10 μ l și am adăugat în amestecul de reacție. Tubul a fost apoi vortexat și centrifugat 30 sec. În final, tubul a fost introdus în termociclor pentru a se asigura regimul de temperatură și timp după cum urmează (dacă aparatul termociclor nu este prevăzut cu capac termoactiv, se cere acoperirea amestecului de reacție cu ulei mineral).

b) Tratarea termică pentru realizarea PCR

Reacția PCR începe cu tratarea termică programată a amestecului de reacție 3 min, 95 °C, după care demarează programul de 35 cicluri în regimul următor: 30 s - denaturare la 95 °C; 30 s - alinierea praimerilor la 60 °C și 30 s - elongare (se asigură cu 1 s mai mult pentru fiecare ciclu subsecvent) la 72 °C; după decurgerea celor 35 cicluri, se asigură etapa finală de elongare - 4 min la 72 °C.

c) Protocolul pentru electroforeză

Pentru separarea electroforetică a ampliconilor generați cu ajutorul metodei MSP noi am utilizat geluri din agaroză echivalent *Amresco, tip I* (2,0%) dizolvată în tampon TBE (1×). Colorarea gelului a fost îndeplinită în soluție bromură de etidiu (0,5 μg/ml) la temperatura de 45-50 °C, dizolvată în tamponul TBE în care se găsește agaroză solubilizată, asigurând agitarea recipientului în care se prepară gelul.

1. În prealabil, am preparat 350 ml soluție TBE (1×): Tris 89 mM, acid boric 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0-8,5.

2. Pentru a determina mobilitatea ampliconilor în gelul de agaroză am realizat electroforeza cu introducerea în gel, în godeuri separate, a ampliconilor generați cu ajutorul praimerilor non-metil-specifici „U” (reacția PCR a avut loc în eprubete separate) și, respectiv, și a ampliconilor generați cu ajutorul praimerilor metil-specifici „M”. Electroforeza a decurs 15 min (25 °C), 10 V/cm.

3. În tuburi Eppendorf de 0,2 ml am preparat amestecul pentru încărcare în gel, în modul următor: 2 μl soluție *Loading dye* (5×) (albastru de bromfenol, zaharoză, xilencianol), 8 μl soluție conținând ampliconi generați cu primeri M-specifici, în prima variantă, iar în alte eprubete - 8 μl soluție conținând ampliconi generați cu primeri U-specifici. Această proporție a fost constituită și pentru controlul U pozitiv și M pozitiv.

În paralel, am preparat și ADN-ul – marker de greutate moleculară: 2 μl soluție 5× *Loading dye*, 8 μl apă ultrapură. Pentru obținerea controlului negativ, ciclurile de temperaturi a fost supus amestecul Master mix, fără ADN genomic. Acest amestec în proporție de 8 μl și *Loading dye* - 2 μl au fost adăugați într-un tub de 0,2 ml pentru a constitui controlul negativ.

4. Am preparat 350 ml soluție TBE (1×): Tris 89 mM, Acid boric 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0-8,5.

5. Am introdus gelul în cuva aparatului de electroforeză și am turnat în această cuvă soluție TBE (1×) până când nivelul acestei soluții deasupra gelului a constituit 3-4 mm.

6. Am încărcat godeurile gelului cu amestecurile (10 μl) preparate după cum am descris mai sus.

7. Am fixat capacul cuvei și am conectat aparatul de electroforeză la 350V, durata – 15 min

d) Analiza produșilor de amplificare

După încheierea electroforezei, gelul a fost amplasat pe suprafața transiluminatorului cu ajutorul căruia am iradiat gelul cu lumină UV, lungimea de undă 312 nm. În lumină UV moleculele de ADN colorate cu bromură de etidiu ce emit fluorescență au fost înregistrate prin fotografiere cu ajutorul unui aparat foto digital (Exemple, Fig. 1A, B).

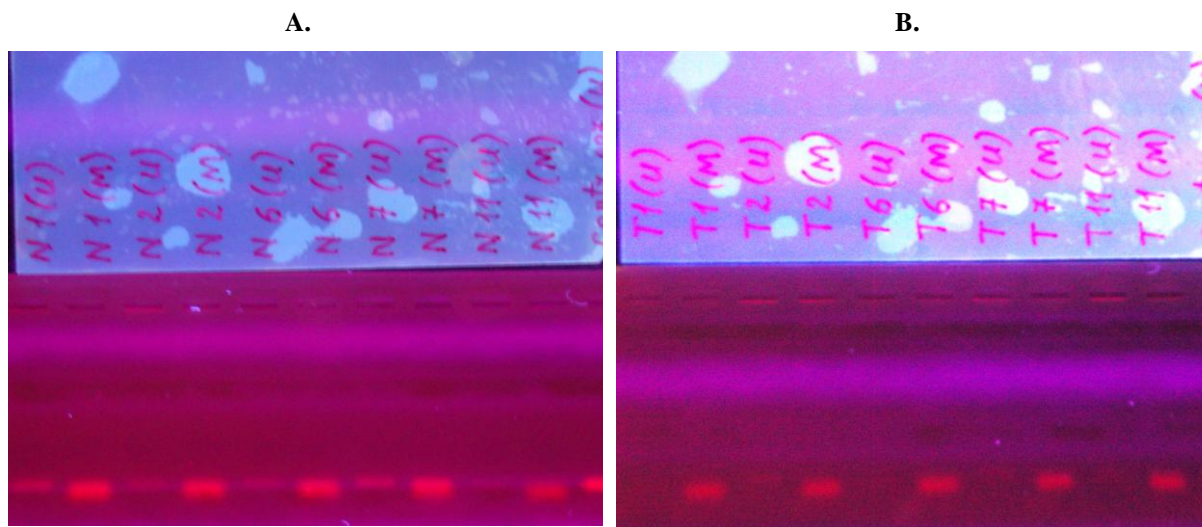


Figura 1. Unele profiluri metilice la nivelul ADN-ului din țesutul normal al glandei tiroide (A) și din tumori maligne (B) (Foto, original)

Fotografiile-electroforegrame astfel obținute au fost stocate în calculator și au servit pentru interpretarea rezultatelor amplificării.

În baza datelor din electroforegramele obținute (exemple, primele 8 specimene analizate, Fig. 1A, B), au fost stabilite particularitățile profilurilor metilice la nivelul ADN-ului din țesutul normal al glandei tiroide și din tumorile maligne (diverse subtipuri morfologice) tiroidiene.

Rezultate și discuții

În vederea formulării răspunsului la ipoteza fixată în scopul proiectului, stabilirea particularităților profilurilor metilice ale promotorului genei *p15* din țesutul normal al glandei tiroide cât și din tumori maligne (diverse subtipuri morfologice) ale glandei tiroide am analizat datele din electroforegrame din care rezultă că cele două specimene diferă.

Fragmentele de țesut normal al glandei tiroide prezintă concomitent atât banda U cât și banda M (profilul UM) în toate specimenele analizate 35/35 (100%). Fragmentele din tumori maligne ale glandei tiroide prezintă numai banda M (profilul MM) în toate specimenele analizate 35/35 (100%) semnificând starea metilată a ambelor alele în toate celulele materialului biologic analizat.

Această constatare conduce către două ipoteze: 1) în stare metilată la nivelul promotorului său, gena *p15* este inactivă în celulele tumorilor glandei tiroide; 2) gena *p15* are un aport direct în supresia transformării maligne a celulelor normale ale glandei tiroide.

Concluzii

1. În cadrul studiului au fost obținute unele profiluri metilice preliminare atât la nivelul ADN-ului din țesutul normal al glandei tiroide cât și în ADN-ul specimenelor de carcinom medular tiroidian. Aceste profiluri pot servi în calitate de markeri moleculari pentru monitorizarea cancerului tiroidian (prognosticul, diagnosticul diferențiat-epigenetic și tratamentul individual).
2. Toate fragmentele din țesutul normal al glandei tiroide au prezentat concomitent atât molecule nemetilate de ADN cât și molecule metilate (profilul UM).
3. Spre deosebire de celulele normale ale glandei tiroide, toate specimenele de carcinom medular al glandei tiroide au prezentat ambele alele metilate (profilul MM) la nivelul promotorului genei *p15*.
4. Profilul metilic MM la nivelul promotorului genei *p15* poate servi ca marker molecular al riscului sporit către cancer tiroidian, raportat la ziua prelevării probei biologice.

Bibliografie

1. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, et al. (2000) Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 24: pp. 132–138.
2. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM (1993): Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73: pp. 487-497.
3. Gonzalgo ML, Hayashida T, Bender CM, et al. (1998): The role of DNA methylation in expression of the p19 /p16 locus in human bladder cancer cell lines. *Cancer Res* 58: pp. 1245-1252.
4. Gronbaek K, Nedergaard T, Andersen MK, et al. (1998): Concurrent disruption of cell cycle associated genes in mantle cell lymphoma: a genotypic and phenotypic study of cyclin D1, p16, p15, p53 and pRb. *Leukemia* 12: pp. 1266-1271.
5. Herman J. (1996) Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for metylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 93, pp. 9821-9826.
6. Hoque M.O., Rosenbaum E. et al. (2005) Quantitative assesment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(7): pp. 4011-4018.

7. Tîbîrnă Gh. (2003) Ghid clinic de oncologie, Editura "Universul", Chişinău, 828 p.
8. Wong I. (2000) Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all the morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood*, 95: pp. 1942-1949.
9. Wong I. (2001) Methylation profiling of human cancers in blood: molecular monitoring and prognostication (Review). *International Journal of Oncology* 19: pp. 1319-1324.
10. Protocol QIAGEN (04/2006) - EpiTect Bisulfite Kit (48).