



**ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE**

Rezumatul tezei de doctorat

**Antigene tumorale cu potențial în diagnosticul
și prognosticul melanomului malign**

**Nanoparticule pentru eliberarea țintită de
compuși biologic activi**

**COORDONATOR ȘTIINȚIFIC
DR. ȘTEFANA M. PETRESCU**

**DOCTORAND
FILIMON ANCA**

**BUCUREȘTI
2018**

Cuprins (teza de doctorat in extenso)

PARTEA I ANTIGENE TUMORALE CU POTENȚIAL ÎN DIAGNOSTICUL ȘI PROGNOSTICUL MELANOMULUI MALIGN

REZUMAT

CAPITOLUL I– PREMISELE ȘI STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1.1 Melanomul malign – caracteristici generale.....	8
1.2 Clasificarea melanoamelor cutanate.....	9
1.3 Impactul heterogenității intratumorale asupra diagnosticului melanomului .cutanat.....	11
1.4 Prognosticul în melanomul cutanat - parametrii clinici definatorii și markeri moleculari semnificativi.....	13
1.4.1 Statutul ganglionilor limfatici santinelă (GLS).....	14
1.4.2 Mitozele și ulcerarea.....	14
1.4.3 Markerii moleculari.....	14
1.5 Dopacrom tautomeraza - un antigen de melanom cu funcții multiple.....	16
1.5.1 Particularități structurale ale Dopacrom tautomerazei.....	16
1.5.2 Expresia celulară a Dopacrom tautomerazei.....	19
1.5.3 Mecanisme moleculare ce controlează expresia, procesarea, distribuția subcelulară și stabilitatea Dopacrom tautomerazei.....	20
1.5.3.1 Reglajul transcripțional.....	20
1.5.3.2 Reglajul post-transcripțional.....	23
1.5.4 Procese celulare mediate de Dopacrom tautomerază.....	24
1.5.4.1 Dopacrom tautomeraza în calea de biosinteză a melaninei.....	24
1.5.4.2 Implicarea Dopacrom tautomerazei în rezistența la stres.....	25
1.5.4.3 Rolul Dopacrom tautomerazei în proliferarea și migrarea celulară.....	28
1.5.4.4 Rolul Dopacrom tautomerazei în infecția cu HPV a keratinocitelor.....	29
1.6 Dopacrom tautomeraza în evaluarea leziunilor melanocitice.....	29

CAPITOLUL II – INVESTIGAREA POTENȚIALULUI DOPACROM TAUTOMERAZEI ÎN DIAGNOSTICUL ȘI PROGNOSTICUL MELANOMULUI MALIGN CUTANAT

2. 1 Materiale și Metode.....	31
2.1.1 Materiale, reactivi și echipamente	
2.1.1.1 Clonarea secvenței DCT 27-439 în vectorul pHAT2.....	31
2.1.1.2 Amplificarea, purificarea constructului pHAT2 DCT 27-439 și expresia proteinei recombinante DCT 27-493::6His.....	31
2.1.1.3 Electroforeza ADN în gel de agaroză.....	32
2.1.1.4 Purificarea proteinei recombinante DCT::6His din bacterii.....	32
2.1.1.6 Imunizarea animalelor și recoltarea antiserului anti-DCT.....	32
2.1.1.8 Liza celulelor de melanom uman.....	32
2.1.1.9 Deglicozilarea proteinelor in vitro.....	32
2.1.1.10 Electroforeza în gel de poliacril amidă (SDS-PAGE).....	33
2.1.1.11 Reducerea expresiei genice prin metoda ARN-ului mic de interferență.....	34
2.1.1.12 Evidențierea proteinelor prin colorare cu Coomassie.....	34
2.1.1.13 Imunoamprentarea proteinelor (Western blot/Western blotting- WB).....	34
2.1.1.14 Marcarea metabolică.....	34
2.1.1.15 Imunoprecipitare.....	34
2.1.1.16 Imunocitofluorescența	34
2.1.1.17 Imunohistofluorescența.....	35
2.1.2 Metode.....	35
2.1.2.1 Clonarea secvenței DCT 27-439 în vectorul de expresie pHAT2.....	35
2.1.2.2 Amplificarea și purificarea constructului pHAT2 DCT 27-439.....	36
2.1.2.3 Electroforeza ADN în gel de agaroză.....	38
2.1.2.4 Expresia proteinei recombinante DCT:: 6 His în bacterii.....	39
2.1.2.5 Purificarea proteinei recombinante DCT::6His din bacterii.....	39
2.1.2.6 Determinarea concentrației proteice totale	41
2.1.2.7 Imunizarea animalelor și recoltarea antiserului anti-DCT.....	42
2.1.2.8 Purificarea ARN și RT-PCR semicantitativ în timp real.....	43
2.1.2.9 Liza celulelor de melanom uman.....	44
2.1.2.10 Deglicozilarea proteinelor in vitro.....	44
2.1.2.11 Electroforeza în gel de poliacril amidă (SDS-PAGE).....	45
2.1.2.12 Metoda ARN-ului mic de interferență.....	48
2.1.2.13 Evidențierea proteinelor prin colorarea cu Coomassie.....	48
2.1.2.14 Imunoamprentarea proteinelor (Western blot/Western blotting- .WB).....	48
2.1.2.15 Marcarea metabolică.....	50
2.1.2.16 Imunoprecipitarea.....	50
2.1.2.17 Imunocitofluorescența.....	51
2.1.2.18 Imunohistofluorescența.....	53
2.2 Rezultate și Discuții.....	55
2.2.1 Obținerea și caracterizarea unui anticorp policlonal anti-hDCT.....	55
2.2.1.1 Clonarea și expresia antigenului DCT:: 6His în sistem bacterian.....	56
2.2.1.2 Purificarea antigenului DCT:: 6 His.....	57

2.2.1.3 Monitorizarea titrului anticorpilor policlonali anti-DCT::6His.....	58
2.2.1.4 Caracterizarea anticorpilor anti-hDCT.....	59
2.2.2 Analiza comparativă a expresiei DCT și a Tyr în linii de melanom uman și specimene histopatologice reprezentând leziuni melanocitice umane.....	62
2.2.2.1 DCT este un antigen complet procesat în linii de melanom uman în care Tyr fie nu este exprimată fie este incomplet procesată.....	62
2.2.2.2 Disjuncția expresiilor DCT și Tyr în procesul de transformare neoplazică a melanocitelor crează profiluri antigenice multiple.....	64
2.2.2.3 Arhitectura moleculară a specimenelor DCT+/Tyr+-fenotipul DCT.....	67
2.2.2.4 Semnificația clinică a fenotipului DCT.....	69
2.2.2.5 Populațiile celulare DCT pozitive intradermale din melanoamele subțiri (SSMs) dobândesc expresia și distribuția subcelulară a biomarkerilor sugestivi pentru prognosticul nefavorabil.....	74
2.3 Concluzii generale și Perspective.....	79
2.4 Bibliografie.....	80

PARTEA II NANOPARTICULE PENTRU ELIBERAREA ȚINTITĂ DE COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI

REZUMAT

CAPITOLUL I - PREMISELE ȘI STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1.1 Nanotehnologii și nanostructuri.....	95
1.2 Dendrimerii-o clasă de nanostructuri complexe cu utilizări multiple.....	96
1.2.1 Structura și proprietățile fizico-chimice ale dendrimerilor.....	96
1.2.2 Clasificarea dendrimerilor.....	98
1.2.3 Toxicitatea și biocompatibilitatea dendrimerilor.....	99
1.2.4 Aplicațiile medicale ale dendrimerilor.....	102
1.2.5 Aplicațiile dendrimerilor în terapia melanomului malign.....	106

CAPITOLUL II- BIOCAMPATIBILITATEA, INTERNALIZAREA ȘI TRAFICUL INTRACELULAR AL NANOPARTICULELOR GLICODENDRIMERICE DE POLI (PROPILENIMINĂ) ÎN CELULE DE MELANOM UMAN

2.1 Materiale și Metode.....	114
------------------------------	-----

2.1.1	Materiale.....	114
2.1.1.1	Glicodendrimerii G5-PPI-OS și G5-PPI-DS.....	114
2.1.1.2	Reactivi chimici pentru studiile de internalizare și trafic intracelular.....	114
2.1.1.3	Anticorpi.....	115
2.1.1.4	Linii celulare.....	115
2.1.2	Metode.....	115
2.1.2.1	Cultivarea <i>in vitro</i> a liniilor celulare.....	115
2.1.2.2	Determinarea citotoxicității dendrimerilor și a inhibitorilor de endocitoză	116
2.1.2.3	Studiul internalizării dendrimerilor în prezența inhibitorilor de endocitoză.....	117
2.1.2.4	Determinarea fluorescenței intracelulare prin tratarea celulelor cu albastru tripan.....	118
2.1.2.5	Citometria în flux.....	118
2.1.2.6	Imunocitofluorescența în studii de internalizare ale dendrimerilor G5-PPI-OS și G5-PPI-DS.....	119
2.1.2.7	Analiza endocitozei și a traficului postendocitic al glicodendrimerilor în prezența modulatorilor citoscheletului și a inhibitorilor de trafic intracelular.....	120
2.1.2.8	Analiza integrității membranelor plasmatică prin determinarea preluării intracelulare a 7-AAD.....	121
2.1.2.9	Validarea potențialului inhibitor al Clorpromazinei și Metil- β -Ciclodextrinei.....	121
2.2	Rezultate și discuții.....	122
2.2.1	Efectul conjugării cu maltoză asupra citotoxicității dendrimerilor G5-PPI.....	122
2.2.2	Impactul dendrimerilor G5-PPI-OS și G5-PPI-DS asupra integrității membranei plasmatică a celulelor de melanom.....	124
2.2.3	Analiza internalizării dendrimerilor G5-PPI-OS și G5-PPI-DS de către celulele de melanom uman prin determinarea fluorescenței intracelulare.....	126
2.2.3.1	Determinarea concentrației optime de albastru tripan necesară pentru măsurarea fluorescenței intracelulare.....	126
2.2.3.2	Analiza fluorescenței intracelulare intrinseci în prezența albastru tripan.....	127
2.2.3.3	Analiza parametrilor ce definesc internalizarea dendrimerilor G5-PPI-OS și G5-PPI-DS.....	129

2.2.3.4 Internalizarea dendrimerilor G5-PPI-OS și G5-PPI-DS în linii celulare de melanom uman.....	134
2.2.3.5 Dinamica distribuției intracelulare a dendrimerilor în celule de melanom uman.....	137
2.2.4 Studiul căilor de internalizare ale glicodendrimerilor G5-PPI în linii de melanom uman primar și metastatic.....	138
2.2.4.1 Analiza citotoxicității și a potențialului inhibitor al Clorpromazinei și Metil- β -ciclodextrinei.....	139
2.2.4.2 Impactul inhibitorilor de endocitoză Clorpromazină și Metil- β -ciclodextrinei asupra membranei plasmatică a celulelor de melanom uman	141
2.2.4.3 Internalizarea G5-PPI-OS și G5-PPI-DS în celule de melanom uman tratate cu inhibitori ai căilor de endocitoză mediate de clatrină și colesterol.....	143
2.2.5 Internalizarea și traficul structurilor pozitive pentru G5-PPI-DS sunt modulate de elemente ale citoscheletului în celulele de melanom uman.....	145
2.2.6 Distribuția subcelulară a structurilor pozitive pentru G5-PPI-DS in celule de melanom uman.....	146
2.2.7 Caracterizarea structurilor pozitive pentru G5-PPI-DS în celule de melanom metastatic uman liniaSK28.....	147
2.2.8 Stabilitatea glicodendrimerilor G5-PPI în celulele de melanom uman.....	154
2.3 Concluzii generale și perspective.....	156
2.4Bibliografie.....	158

Mulțumiri

PARTEA I ANTIGENE TUMORALE CU POTENȚIAL ÎN DIAGNOSTICUL ȘI PROGNOSTICUL MELANOMULUI MALIGN

INTRODUCERE

Melanomul este un tip de cancer cu o evoluție extrem de agresivă și o incidență în continuă creștere, ce apare în urma proliferării necontrolate a melanocitelor aflate în stratul bazal al epidermei (Melanom cutanat-MC) sau în alte zone anatomice cum ar fi mucoasele gastrointestinale, respiratorii și genitourinare (Melanomul mucoaselor), cohleea din urechea internă, iris (melanom ocular) și mezencefal. Cel mai des întâlnit tip de melanom este MC, factorii de risc asociați fiind: arsurile solare, expunerea la lumina UV din saloanele cosmetice și prezența nevilor dizplazici (cu citologie și arhitectură atipică).

MC reprezintă doar 1% din cazurile de cancer de piele dar cauzează 80% din decese datorită capacității rapide de metastazare și a heterogenității citologice intra și intertumorală. Aceste caracteristici determină instalarea rezistenței la chimio-/radio-terapie, dificultăți în stabilirea unui diagnostic corect și răspunsuri variabile la terapiile țintite. MC poate mima leziuni benigne nonmelanocitice des întâlnite (lentigine și keratoze seboreice), în unele cazuri este dificil de diferențiat de nevi displazici sau nevi Spitz iar în altele este imposibil de a diagnostica metastaze de melanom cu tumoră primară necunoscută (1). Mai mult, o treime din melanoamele nodulare, un subtip extrem de agresiv, nu sunt pigmentate fiind imposibil de evaluat după criteriile clasice folosite în diagnosticul melanomului: aspectul asimetric, margini neregulate, culoare variabilă și diametru crescut. În plus față de variabilitatea aspectului macroscopic, melanomul este extrem de heterogen și la nivel molecular, aspect ce duce deseori la pierderea expresiei proteinelor specifice denumite antigene de melanom (tirozinaza-Tyr, gp100/pmel17, Melan-A/MART-1, gp75/TRP1 și DCT/TRP-2) în mod variabil și neuniform. Deși majoritatea cazurilor de melanom pot fi diagnosticate pe baza colorării specimenelor histopatologice cu hematoxilină-eozină, sau atunci când situația o impune, prin marcarea cu anticorpi specifici a antigenelor folosite în mod curent pentru diagnostic în laboratoarele de anatomie patologică (Tyr, HMB-45, Melan-A) există cazuri de melanoame cu pierderea completă a antigenelor de diferențiere în timpul progresiei tumorale (2). Astfel, suplimentarea numărului de antigene specifice folosite pentru diagnosticarea melanomului poate fi benefică în evaluarea anumitor cazuri dificil de diagnosticat.

Dificultăților legate de diagnostic li se adaugă și rata scăzută de supraviețuire la 5 ani (16%) în cazul pacienților cu melanom diagnosticat tardiv, când deja există metastaze la nivelul ganglionilor limfatici și la nivelul organelor distale (plămâni, creier, ficat) comparativ cu o rată de supraviețuire de 90% în cazul melanomului localizat (3). Astfel stadializarea corectă și stabilirea unui prognostic acurat imediat după diagnostic este o etapă crucială pentru stabilirea celei mai eficiente conduite terapeutice.

În cazul melanoamelor subțiri (cu grosimea mai mică sau egală cu 1 mm) excizia chirurgicală este de cele mai multe ori

eficientă pentru vindecare și lipsa recurențelor, totuși rata de supraviețuire la 5 ani a acestor pacienți este de peste 90% dar nu 100%. Din acest motiv este necesară stratificarea pacienților cu melanoame subțiri în grupuri cu risc crescut sau risc scăzut. Deși până de curând pentru aceștia pacienți nu era recomandată biopsia ganglionilor limfatici santinelă, acum se fac recomandări în acest sens pentru cei care prezintă factori clinici de prognostic nefavorabil cum ar fi fază de creștere verticală, regresie, ulceratie și număr crescut de mitoze. Totuși, stadiul incipient al bolii poate să determine existența doar a micrometastazelor la nivelul ganglionilor limfatici evaluați, iar acestea pot trece nedetectate și pot cauza recurența melanomului în urma exciziei chirurgicale la pacienții declarați clinic sănătoși. Din aceste motive numeroase studii încearcă determinarea unor factori moleculari a căror expresie poate fi asociată cu prognosticul nefavorabil în melanom. Astfel au fost identificate proteine implicate în adeziunea celulară și remodelarea matrixului extracelular cum ar fi N-caderina, osteopontina și SPARC (osteonectina) ca fiind semnificativ asociate cu dezvoltarea metastazelor în melanom (4). Creșterea *MCAM/MUC18* (specifică melanocitelor), *LI-CAM* (specifică neuronilor) și *CEACAM-1* (asociată cu țesuturile glandulare) a fost asociată cu scăderea supraviețuirii indicând o interacție anormală între celulele tumorale și stroma înconjurătoare. Expresia crescută a *matrix-metallo proteinazei (MMP)* -*MMP-2* și a tPA (tissue plasminogen activator/serin protează) este asociată cu un prognostic nefavorabil (5). Proteinele implicate în proliferarea celulelor -*Ki67* și p16/NK4A-un inhibitor al kinazelor dependente de ciclină, ce intervine în reglarea ciclului celular prin încetinirea tranziției G1-S, sunt potențiali markeri utili în evaluarea prognosticului fiind asociate cu scăderea supraviețuirii. Pentru melanoamele subțiri dar și pentru cele ce depășesc 1mm, expresia Ki-67 se corelează direct cu prognosticul și are valoare superioară față de indexul mitotic (6).

Investigarea factorilor moleculari importanți pentru progresia melanomului a dus la dezvoltarea unui test care analizează expresia a 28 de gene cu scopul stabilirii prognosticului pacienților. Acest test este folosit în prezent în mod restrâns în evaluarea clinică a pacienților iar în urma aplicării sale se poate stabili dacă un melanom aparține clasei 1 cu un risc de 3% de metastazare în 5 ani sau clasei 2 cu un risc de metastazare de 69%. DecisionDX împreună cu evaluarea GLS identifică 70-80% din pacienții cu GLS negativi și un risc crescut de metastazare. Totuși testul este costisitor pentru sistemul de sănătate și are limitări în ceea ce privește cantitatea de țesut necesară pentru evaluarea expresiei genelor țintă. Deși în prezent, în laboratoarele de anatomo-patologie nu sunt utilizați markeri moleculari pentru evaluarea prognosticului pacienților cu melanom la momentul diagnosticului, existența lor poate fi extrem de benefică pentru managementul clinic eficient al pacienților și pentru reducerea ratei recurenței. Astfel, este necesară explorarea și revizuirea continuă a numeroaselor căi ce operează în MC precum și identificarea de noi molecule semnificative în diagnosticul și prognosticul MC.

Dopacrom tautomeraza (DCT) sau Tyrosinase Related Protein-2 (TRP2) este cunoscută în principal ca enzimă a căii melanogenetice și antigen de melanom din familia proteinelor înrudite cu Tirozinaza (Tyrosinase Related proteins-TRP). DCT/TRP2 acționează în etapele secundare din calea de biosinteză a melaninei și catalizează conversia prin tautomerizarea DOPAcrome, în DHICA (5,6-dihidroxiindol-2-carboxilic acid) (7). În etape ulterioare DHICA este oxidat la acidul indol-5,6-quinon-carboxilic sub acțiunea TRP-1 (DHICA-oxidază) și mai apoi la biopolimerul melanină. În lipsa DCT, DOPAcrom se transformă neenzimatic prin decarboxilare și o rearanjare structurală în 5,6 dihidroindol (DHI), un produs toxic pentru celule, a cărui oxidare duce la formarea speciilor reactive de oxigen. Deși expresia DCT este caracteristică melanocitelor și celulelor de melanom pigmentat sau amelanotic, această proteină este exprimată și în alte tipuri de celule normale sau maligne cum ar fi: *retinoblastomul*, cea mai des întâlnită tumoră primară intraoculară la copii ce se dezvoltă din celule imature ale retinei (8); *linii celulare și tumori de glioblastom*, cea mai agresivă formă de tumoră cerebrală (9); *celulele neurale progenitoare* murine recoltate din neocortexul în dezvoltare al embrionilor murini (10), linia celulară de *keratinocite umane imortalizate spontan* HaCaT (11), *fibroblastele murine* NIH3T3 (12), celulele de *carcinom colorectal uman metastatic* (LS174T) (13). Prezența DCT în alte tipuri de celule decât melanocitele normale și cele transformate malign precum și expresia sa

timpurie înaintea Tyr în dezvoltarea melanoblaștilor embrionari indică posibilitatea ca această proteină să aibă funcții suplimentare față de cea enzimatică.

Funcții adiționale ale DCT, exercitate prin mecanisme moleculare insuficient cunoscute sunt legate de medierea unor căi de rezistență la stres ale celulelor normale dar și tumorale, precum și de implicarea în migrarea și proliferarea celulară. În plus, mecanismele de reglare a expresiei DCT sunt independente de ale celorlalte antigene melanozomale. Până la începerea prezentului studiu nu a fost identificată nici o informație despre semnificația DCT în patologia leziunilor melanocitice umane. În acest context, obiectivele urmarite au fost: *stabilirea potențialului de biomarker al DCT în evaluarea leziunilor melanocitice cutanate precum și extinderea cunoștințelor legate de mecanismele de inițiere și progresie malignă în MC în care acest antigen ar putea fi implicat.*

Rezultate și Discuții

1. Obținerea și caracterizarea anticorpului policlonal anti-hDCT

Nivelurile de mRNA și proteină pentru antigenele de melanom sunt adeseori scăzute ca urmare a activării unor mecanisme care susțin progresia tumorală astfel încât expresia DCT scade în cursul progresiei metastatice fiind de 84% în tumorile primare și de 58% în metastazele de melanom. Astfel, imunodetecția antigenelor de melanom în specimene histologice prin IHC/IHF poate fi îmbunătățită folosind anticorpi policlonali mai sensibili care recunosc mai mulți epitopi ai aceluiași antigen. Secvența corespunzătoare domeniului luminal al DCT (aa 27-439) a fost analizată pentru predicția situsurilor antigenice (**Dr. Adina Milac**) care a indicat cu mare probabilitate prezența a 19 potențiali epitopi. Primele 130 resturi de aminoacizi de la capătul N-terminal care nu conțin situsuri de glicozilare au demonstrat numărul de peptide cu cel mai mare scor antigenic. Potențiali epitopi adiționali sunt indicați și în alte zone în care există situsuri de glicozilare potențial ocupate. În acest context am considerat că folosirea secvenței aa27-aa439 drept antigen de imunizare pentru obținerea unui anticorp policlonal în iepuri ar fi benefică în recunoașterea cu mai mare sensibilitate a DCT mai ales în țesuturile melanocitice.

1.1 Caracterizarea anticorpilor anti-hDCT

Caracterizarea anticorpilor policlonali anti-hDCT a avut ca scop analiza specificității și sensibilității acestor anticorpi precum și a tehnicilor de laborator în care pot fi utilizați. ***Specificitatea anticorpilor anti-hDCT în western blot*** - Anticorpul anti-hDCT identifică cele două glicoforme ale DCT sub forma unui dublet la 62 și 83 kDa în linii melanocitice dar nu și în liniile nemelanocitice (HEK, HeLa) sau liniile melanocitice lipsite de expresia endogenă a

DCT (A375) (**Fig. 1A**). Expresia DCT este scăzută tranzitoriu prin folosirea ARN-ului mic de interferență (+) în liniile MJS și SK28 în care expresia endogenă a DCT este validată (A) și comparată cu a probelor control (-) MJS și SK28. Se observă o scădere semnificativă a semnalului specific pentru cele două glicoforme ale DCT (**Fig. 1B**). Calnexina a fost utilizată drept control de încărcare a cantității egale de proteină totală.

Specificitatea anticorpilor anti-hDCT în imunoprecipitare-Anticorpul anti-hDCT imunoprecipită specific din lizate de celule MJS marcate cu ³⁵S cele două glicoforme ale DCT, cea de precursor de 62 kDa și cea matură de 83kDa, sintetizate în cele 30 minute și respectiv 180 minute de la marcarea. Lizate de celule HEK care nu exprimă DCT endogen au fost utilizate drept control negativ (**Fig. 2**).

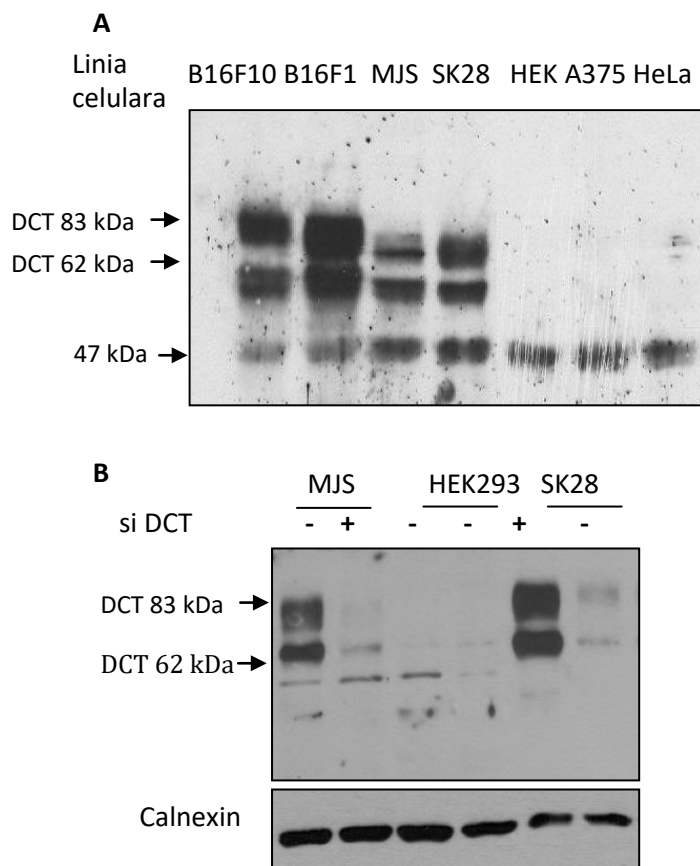


Figura 1. Analiza specificității anticorpilor anti-hDCT prin WB blot în linii celulare melanocitice și nemelanocitice (A) și prin silențierea expresiei genei DCT (B).

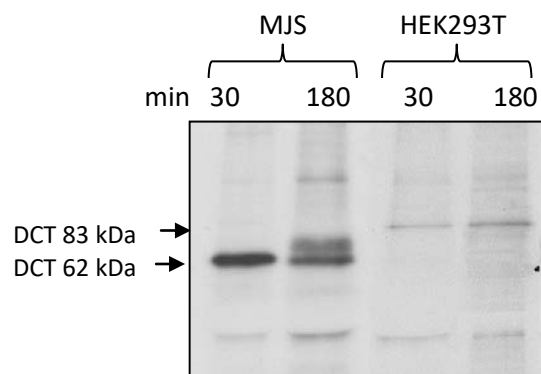


Figura 2. Analiza specificității anticorpilor anti-hDCT prin marcarea metabolică și imunoprecipitare.

Specificitatea anticorpilor anti-hDCT în imunohistofluorescență și imunohistochimie -
 Expresia DCT și a Tyr este detectată simultan cu anticorpi anti-hDCT(**roșu**) și respectiv anti-Tyr /T311 (**verde**) în celule comune (**Fig. 3a, galben**) sau distincte (**roșu-Fig.3 b sau verde Fig. 3 c**). DCT este detectată specific în celule nevice din leziuni benigne (**Fig. 3 a,b**) și în celule tumorale (**Fig. 3 c,d,e,f**) dispuse în cuiburi în secțiuni de melanom malign intraepidermal (**Fig. 3 e**) sau în celule tumorale din melanom nodular (**Fig. 3 d,f**). DCT nu este detectată în specimene de carcinom colorectal, gastric sau cu celule scuamoase (**Fig. 3 g,h,i**). Datele de IHC (**Fig.3 e, f**) au fost obținute de Dr. Sabina Zurac, Secția de Anatomopatologie, Spitalul Colentina.

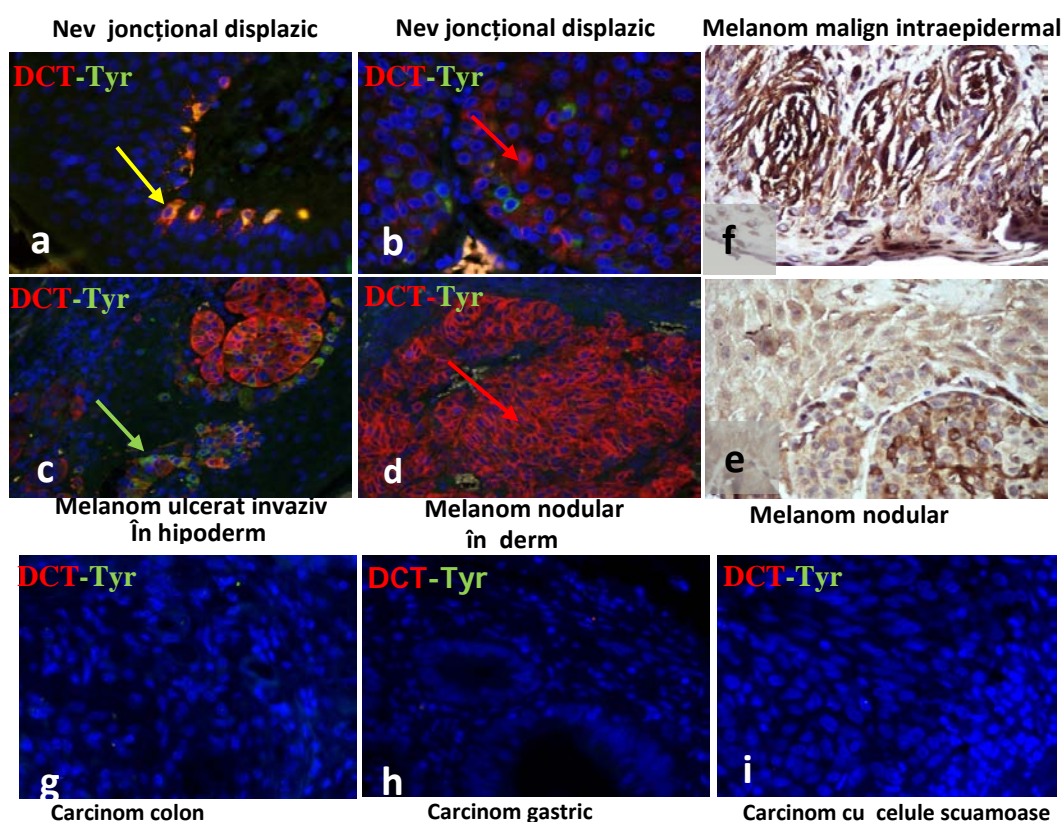


Figura 3. Analiza specimenelor histopatologice reprezentând leziuni melanocitice benigne sau maligne și leziuni nonmelanocitice cu anticorpi anti-hDCT în imunohistofluorescență (a,b,c,d,g,h,i) și în imunohistochimie (e,f).

2. Analiza comparativă a expresiei DCT și a Tyr în linii de melanom uman și specimene histopatologice reprezentând leziuni melanocitice umane

2.1 DCT este un antigen complet procesat în linii de melanom uman în care Tyr fie nu este exprimată fie este incomplet procesată

DCT și Tyr sunt proteine cu structuri omoloage, ambele implicate în sinteza melaninelor. Proteinele melanogenetice sunt exprimate și de melanocitele transformate (celulele de melanom) dar nivelul de expresie și procesarea acestora sunt diferit alterate în tumori, acest fapt având un impact negativ asupra detectării populațiilor celulare tumorale. Rapoarte ale altor grupuri au indicat că expresia DCT crește în vreme ce a Tyr scade în melanoamele murine în stadii avansate de malignitate și în cele nepigmentate (14).

Analiza DCT și a Tyr s-a efectuat comparativ, la nivel de ARNm și proteină, în celule pigmentate de melanom uman metastatic, linia MNT-1, celule amelanotice de melanom uman primar, linia MJS și metastatic, linia SK28 (**Fig. 4**). La nivel de mRNA celulele SK28 exprimă ambii markeri în vreme ce liniile MNT-1 și MJS au un nivel mai scăzut de DCT. Tyr este intens exprimată de celulele pigmentate MNT-1 dar este absentă în linia MJS, care este pozitivă pentru DCT (**Fig. 4A**). Linia A375 ce reprezintă celule de melanom uman metastatic amelanotic, fiind deja cunoscută pentru lipsa ambelor antigene DCT și Tyr la nivel de mRNA, a fost utilizată drept control negativ pentru lineajul melanocitic. Linia SaOs2 este o linie de osteosarcom uman și a servit drept control celular pentru lineaj nemelanocitic. Ambele linii celulare, A375 și SaOs2 au confirmat specificitatea primerilor utilizați pentru DCT și Tyr. La nivel de proteină DCT este detectată în trei linii de melanom sub forma dubletului caracteristic de 82kDa și 62kDa reprezentând glicoforme complexă și respectiv de precursor ale DCT (**Fig. 4B**). După tratamentul cu EndoH banda de DCT de 82kDa, ce conține glicani complecși, se deplasează ușor într-o poziție inferioară în vreme ce banda de 62kDa, ce conține glicani oligomanozidici, complet sensibili la digestia cu EndoH migrează în poziția polipeptidului, evidențiat prin digestia cu PNGase F ce înlătură complet toate formele de N-glicani. Banda de Tyr este intens vizibilă în celulele MNT-1 și nedetectabilă (asa cum este așteptat) în MJS (**Fig. 4C**).

În MNT-1 Tyr apare ca o fracție majoră, parțial sensibilă la EndoH, reprezentând Tyr matură cu glicani hibridi și o fracție mai mică de precursor de Tyr, complet sensibilă la EndoH.

Celulele SK28 exprimă numai Tyr imatură, cu glicani oligomanozidici care după digestia cu EndoH co-migrează cu polipeptidul de Tyr (**Fig. 4C**).

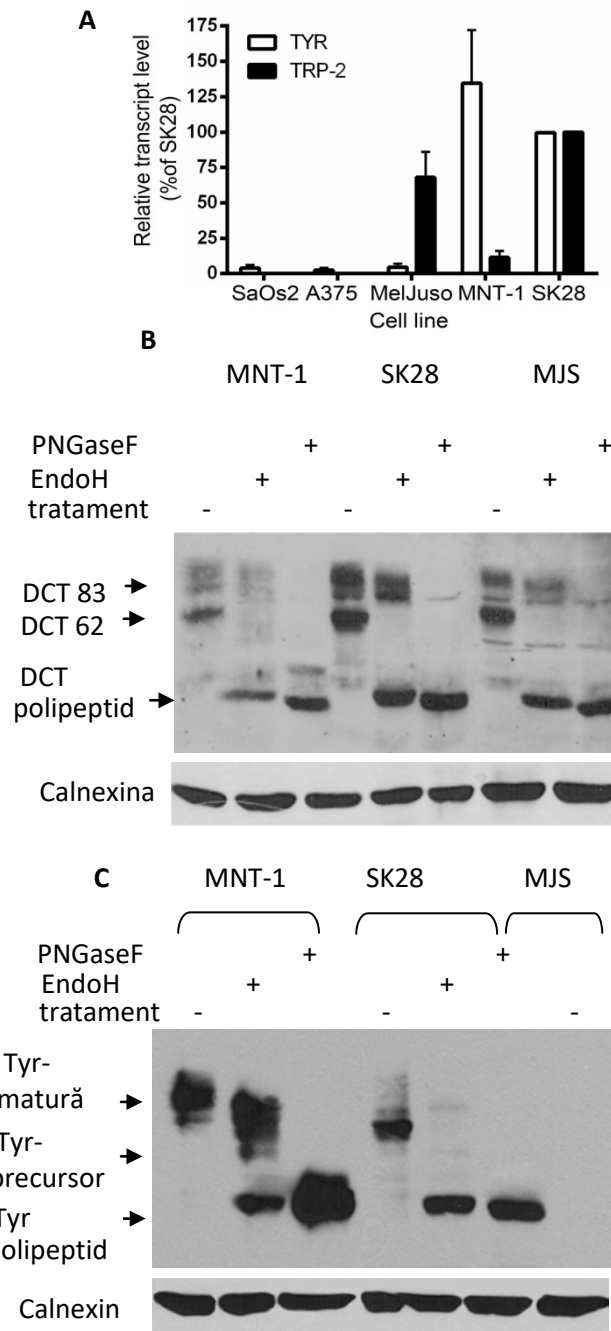


Figura 4 DCT și Tyr sunt antigene cu niveluri distincte de expresie și procesare în liniile celulare de melanom uman (A) Nivelul de mRNA pentru Tyr și DCT determinate prin analiza RT-PCR semicantitativă. Sunt prezentate mediile și SEM a 3 experimente independente. (B, C) Expresia Tyr și a DCT analizate prin WB. Supernatantele lizatelor celulare au fost deglicozilate (+) sau nu (-) cu EndoH or PNG-ază F. Figură adaptată cu permisiunea Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkinst după Filimon et. al Value of Dopachrome tautomerase detection in the assesment of melanocytic tumours, Melanoma Research 2014, Vol 24, No 3. http://journals.lww.com/melanomaresearch/fulltext/2014/06000/Value_of_dopachrome_tautomerase_detection_in_the.5.aspx

2.2 Disjuncția expresiilor DCT și Tyr în procesul de transformare neoplazică a melanocitelor crează profiluri antigenice multiple

Având la bază rezultatele din liniile celulare de melanom ce arată nivelul diferit al expresiei DCT și Tyr cât și procesarea lor distinctă am considerat că acest fapt este foarte probabil să apară și la nivelul populațiilor celulare tumorale. Pentru a confirma această teorie și a analiza cum acest eveniment molecular se corelează cu transformarea neoplazică și progresia malignă am determinat expresia DCT și a Tyr în 166 de preparate histopatologice ale leziunilor melanocitice benigne și maligne: 9 nevi joncționali (JN), 23 nevi compuși (CN), 21 nevi displazici (DN), 60 de melanoame cu extindere în suprafață (SSM), 29 de melanoame nodulare (NM), 11 melanoame acromice (ACM) și 13 melanoame acral-lentiginose (ALM). Prin utilizarea tehnicii de IHF am detectat prezența simultană a DCT și Tyr în populații celulare identice ale componentei tumorale din diverse specimene, translatând practic abordarea celor 2 antigene de la nivelul celular la cel tisular. Probele marcate și analizate au fost grupate în patru tipuri: pozitive, fie pentru Tyr, fie pentru DCT (DCT-/Tyr+; DCT+/Tyr-), duble pozitive sau duble negative pentru ambii markeri DCT și Tyr (DCT-/Tyr-; DCT+/Tyr+). Distribuția procentuală în cadrul fiecărui grup este prezentată schematic în **Fig. 5A**. Expresia exclusivă a Tyr se menține în toate tipurile de leziuni, în procente variabile, ceea ce confirmă faptul că Tyr este biomarkerul standard în evaluarea melanomului, în vreme ce probele care exprimă doar DCT sunt specimene de ALM (31%) și ACM (9%). Prezența specimenelor duble negative (DCT-/Tyr-) este nulă în grupul leziunilor benigne (JNs, CNs) și premaligne (DNs) și crește în cele maligne (SSMs, NMs, ACMs).

DCT și Tyr sunt enzime melanozomale indispensabile pentru producerea melaninei în melanocitele din piele, care sunt întotdeauna pozitive pentru ambele antigene. În transformarea neoplazică a melanocitelor și progresia malignă a melanomului apare descreșterea sau chiar lipsa expresiei celor două antigene (15), DCT și Tyr fiind co-exprimate sau exprimate separat în speciemenle analizate. Prezența expresiei DCT în majoritatea tumorilor este în consens cu alte studii care raportează că DCT este exprimată în 67% din nevii testați, în 83% din melanoamele primare și 100% din melanoamele metastatice (16). Există o corelație clară între procesul de transformare neoplazică a melanocitelor din progresia malignă și procesul molecular de disociere a expresiei DCT de cea a Tyr în populații celulare distincte (**Fig. 5A**). Co-expresia DCT/Tyr este caracteristică doar pentru nevii joncționali (JN) ce reprezintă cea mai benignă tumoră melanocitică, apare într-un

procent mai mic în alte tipuri de nevi benigne cum ar fi nevi compuși (CNs-18%) sau tumori premaligne cum ar fi nevi displazici (DNs-21%) și este absentă în leziuni maligne (SSMs, NMs, ACMs).

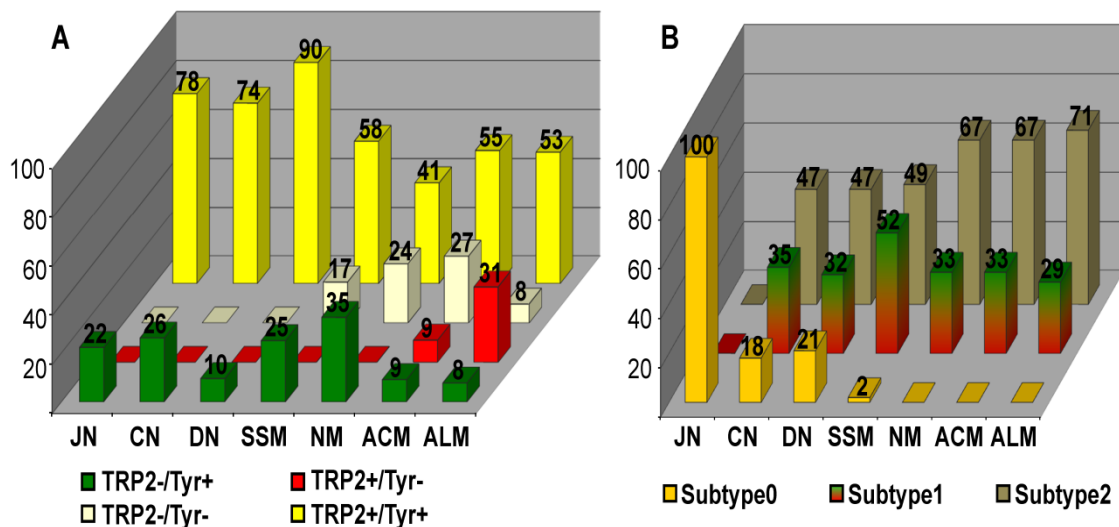


Figura5 Reprezentarea schematică a expresiilor DCT și Tyr analizate prin IHF în specimene histologice reprezentând leziuni melanocitice benigne și maligne

Clasificarea leziunilor melanocitice în funcție de expresia DCT și Tyr. Tipurile de specimene, indicate pe axa X, sunt analizate pentru expresia DCT și Tyr și contribuția fiecărui tip exprimat ca procent din numărul total este indicat pe fiecare coloană (A). Distribuția subtipurilor 0, 1 și 2 în cadrul speciemenelor DCT+/Tyr+. Speciemenele histologice care exprimă arhitectura subtipurilor 0, 1 și 2 sunt indicate pe axa X. Contribuția fiecărui subtip calculat ca procent din numărul total al speciemenelor DCT+/Tyr+ este indicat pe coloanele corespunzătoare (B). JNs- Nevi Junctionali; CNs - Nevi Compuși; DNs - Nevi Displazici; SSMs - Melanoame subțiri; NMs - Melanoame Nodulare; ACMs - Melanoame Acromice; ALMs - Melanoame Acral Lentiginoase. Figură reproducă cu permisiunea Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkinst după Filimon et. al Value of Dopachrome tautomerase detection in the assesment of melanocytic tumours, Melanoma Research 2014, Vol 24, No 3.http://journals.lww.com/melanomaresearch/fulltext/2014/06000/Value_of_dopachrome_tautomerase_detection_in_the.5.aspx

Opus, speciemenele duble negative nu sunt dectate în nici un caz de nevi și procentul lor crește în melanoamele maligne. Aceasta este în consens cu teoria că descreșterea severă a expresiilor antigenelor de melanom inițiază sau crește malignitatea contribuind la evadarea tumorii de sub controlul sistemului imun.

2.3 Arhitectura moleculară a speciemenelor DCT+/Tyr+ - Fenotipul DCT

În fiecare tip de leziune mai mult de 50% din speciemenele testate exprimă ambele antigene DCT și Tyr (DCT+/Tyr+). Urmărind distribuția celor două antigene în celulele din

componentele tisulare se identifică trei situații denumite convențional subtipurile 0, 1 și 2 (**Fig. 5B, Fig. 6**). **Subtipul 0** definit de celulele nevice sau tumorale care co-exprimă DCT și Tyr, este caracteristic JNs. Subtipul JN0 este identificat în toate specișenele JN, reprezentând astfel 100% din JNs duble pozitive, și apare într-un procent mai mic în CNs (18%), DNs (21%), fiind practic absent în SSMs, NMs, ACMs și ALMs. O imagine reprezentativă a subtipului 0 este prezentată în **Fig. 6a-c**, arătând un specimen JN0 în care toate celulele nevice din regiuni distincte ale probei conțin atât Tyr (**Fig. 6a,c**) cât și DCT (**Fig. 6b,c**). **Subtipul 1 sau Fenotipul DCT** este caracterizat de apariția a numeroase celule individuale sau aglomerate (clusterate) pozitive pentru DCT sau Tyr. Segregarea populațiilor mixte DCT+/Tyr- și DCT-/Tyr+ devine marcantă în celulele tumorale din derm și culminează cu disocierea completă a expresiilor DCT și Tyr în celulele care ocupă largi porțiuni intradermale (arii ID). **Fenotipul DCT** este absent în JNs și se exprimă în procentaje aproximativ asemanatoare în CNs, DNs, NMs, ACMs, ALMs și SSMs (**Fig. 5B**). O imagine reprezentativă a acestui subtip este prezentată în **Fig. 6d-i**. Celule individuale sau grupate exprimând Tyr sunt localizate în aria subepidermală (SE) (**Fig. 6,d**) și sunt sau nu pozitive pentru DCT (**Fig. 6e**). În profunzimea țesutului Tyr devine complet negativă (**Fig. 6g**) și celulele tumorale rețin doar expresia DCT (**Fig. 6h**). Imaginile combinate și detaliile mărite prezentate ca inseturi arată clar că procesul de disociere a expresiilor DCT și Tyr începe în straturile superioare ale componentelor tumorale (**Fig. 6f**) în care celulele galbene, ce păstrează expresia dublă a DCT și Tyr, apar lângă celule care exprimă doar DCT (roșii) sau doar Tyr (verzi). Perpetuarea celulelor DCT+/Tyr- continuă în dermul mijlociu și profund unde expresia Tyr este complet negativă (**Fig. 6i**). O arhitectură similară ce definește subtipul 1 este detectată în CNs sau în SSMs așa cum este prezentat în **Fig. 7 și Fig. 8**. Subtipul 1 este detectat în procente asemănătoare în NMs, CNs și DNs (**Fig.5**), arhitectura fiind totuși diferită între cele trei tipuri de specișene. În CN1, DN1 sau SSM1 segregarea expresiilor DCT și Tyr este gradată în vreme ce în NM1 acest proces este abrupt. În aria SE din specișenul NM1 se observă grupuri de celule ce exprimă preponderent DCT (roșii) sau Tyr (verzi) (**Fig. 6j**). Componenta ID (**Fig. 6 k**) sau cea din dermul profund (**Fig.6l**) a specișenului NM1 conține arii largi cu celule DCT+/Tyr- similare cu ceea ce este detectat în dermul inferior în CN1 sau SSM1. O situație particulară a subtipului 1 este întâlnită în câteva specișene acral lentiginose (ALM) și acromice (ACM) (**Fig. 6 m-o**) în care expresia Tyr este complet negativă în întregul specișen în vreme ce DCT este intens exprimată în nodulii

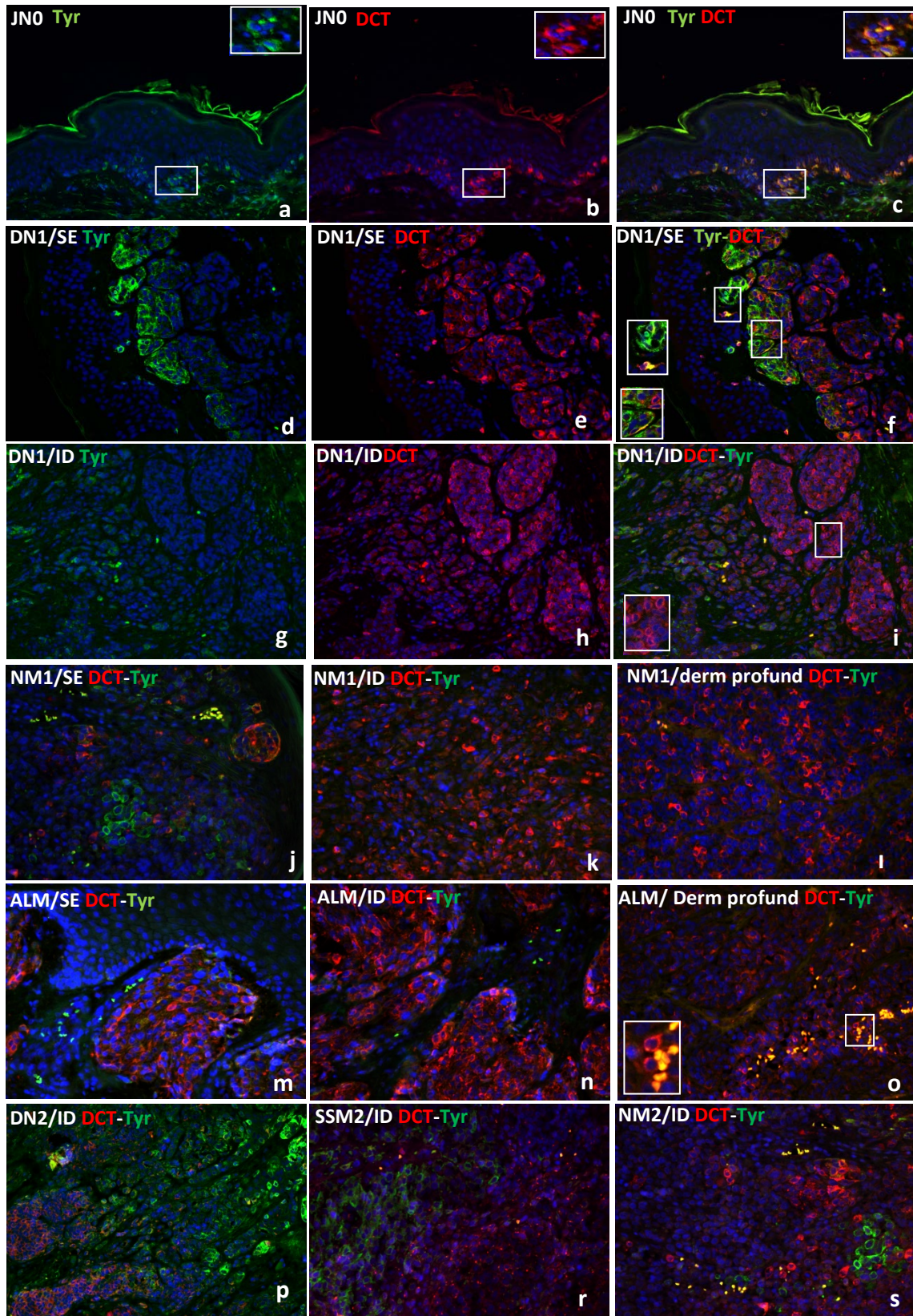


Figura 6 Arhitectura moleculară a subtipurilor 0,1 și 2 în speciunile DCT+/Tyr +. Probele au fost marcate pentru DCT (anti-hDCT), Tyr (T311) și nuclei (DAPI/albastru) și analizate prin IHF. Specimene reprezentative pentru fiecare subtip (0, 1 și 2) și componentele tumorale (SE, subepidermal; ID, intradermal; derm profund) sunt prezentate. Mărirea originală X40. Figură reproducă cu permisiunea Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkinst după Filimon et. al Value of Dopachrome tautomerase detection in the assesment of melanocytic tumours, Melanoma Research 2014, Vol 24, No 3.http://journals.lww.com/melanomaresearch/fulltext/2014/06000/Value_of_dopachrome_tautomerase_detection_in_the.5.aspx

tumorali deja formați atât în aria SE (**Fig. 6m**) cât și în componenta ID (**Fig. 6n**) sau în dermul profund în celule poziționate de-a lungul vasculaturii tumorale (**Fig. 6o**).

Subtipul 2 este definit de prezența celulelor care exprimă DCT și Tyr fie împreună fie dissociate în straturile tisulare diferite ale specimenelor investigate. În speciunile clasificate ca subtipuri 2 nu există lipsa completă a expresiei DCT sau a Tyr în dermul profund (**Fig. 6p, r, s**).

2.4 Semnificația clinică a fenotipului DCT – În încercarea de a atribui fenotipului

DCT o semnificație clinică am asociat datele obținute din analiza IHF a expresiei DCT/Tyr cu datele din rapoartele anatomopatologice ale specimenelor respective. Am identificat 2 *leziuni benigne de nevi compuși* și 2 *leziuni maligne de melanoame subțiri* a căror analiză susține teoria conform căreia fenotipul DCT ar putea fi asociat cu anumiți parametri clinici și de prognostic nefavorabil, date prezentate în **Fig. 7** și **Fig.8**.

Fenotipul DCT în leziuni melanocitice benigne asociat cu procesul de neurotizare -

În **Fig. 7** sunt prezentate două specimene, unul reprezentativ pentru fenotipul DCT și altul cu molecularitate diferită notate convențional, CN1-A (**Fig. 7,a-f**) și respectiv CN-B (**Fig. 7,g-l**). Specimenul CN1-A aparține fenotipului DCT, caracterizat prin disocierea începută în stratul SE (**Fig. 7,a,c**) și continuată prin perpetuarea celulelor nevice DCT+/Tyr- în dermul mediu (**Fig. 7,d-f**). Specimenul CN-B aparține subtipului 2, cu celule co-exprimând DCT și Tyr grupate în cuiburi subepidermale (**Fig. 7,g-i**). Intradermic, colorația atât pentru DCT cât și pentru Tyr este slabă dar detectabilă (**Fig. 7,j-l**). Rapoartele anatomopatologice pentru speciunile descrise în **Fig. 7** indică faptul că specimenul aparținând fenotipului DCT (CN1-A) prezintă neurotizare crescută în adâncime spre deosebire de nevul CN-B ce prezintă neurotizare moderată în adâncime.

Fenotipul DCT în leziuni melanocitice maligne asociate cu procesul de ulcerare

În **Fig. 8** sunt prezentate două specimene SSM referite aici ca SSM1-A (**Fig. 8a,f**) și SSM-B (**Fig. 8g-l**). Specimenul SSM1-A prezintă tiparul fenotipului DCT, cu expresia dissociată în celule de melanom a DCT și Tyr ce începe în arii IE (**Fig. 8a,c**) și perpetuarea celulelor tumorale DCT+/Tyr- în derm (**Fig. 8d-f**). Specimenul SSM-B aparține subtipului DCT-/Tyr+ cu arii largi intra epidermale ocupate de cuiburi de celule DCT-/Tyr+ (**Fig. 8g-i**) care pătrund și în dermul papilar (**Fig. 8j,l**). Speciunile aparținând fenotipului DCT (SSM1-A) se disting de celelalte (SSM-B) prin ulcerare și numărul crescut de mitoze. *Important de notat este că în ambele specimene, SSM1-A și SSM-B, indexurile Clark sunt identice(II) iar grosimile Breslow*

ale tumorilor sunt de 0,45 respectiv 0,5, ceea ce le discriminează fiind ulcerată, numărul de mitoze și arhitectura moleculară a expresiei DCT/Tyr.

Rapoarte anterioare despre linii celulare de melanom murin au arătat că expresia DCT este independent reglată de a celorlalte TRP (17). Datele din acest studiu despre DCT și Tyr au confirmat că expresia și procesarea celor două antigene este distinctă și în celule de melanom uman. De aceea faptul că populații celulare tumorale în secțiunile histopatologice analizate exprimă separat DCT și Tyr nu a fost un rezultat neașteptat.

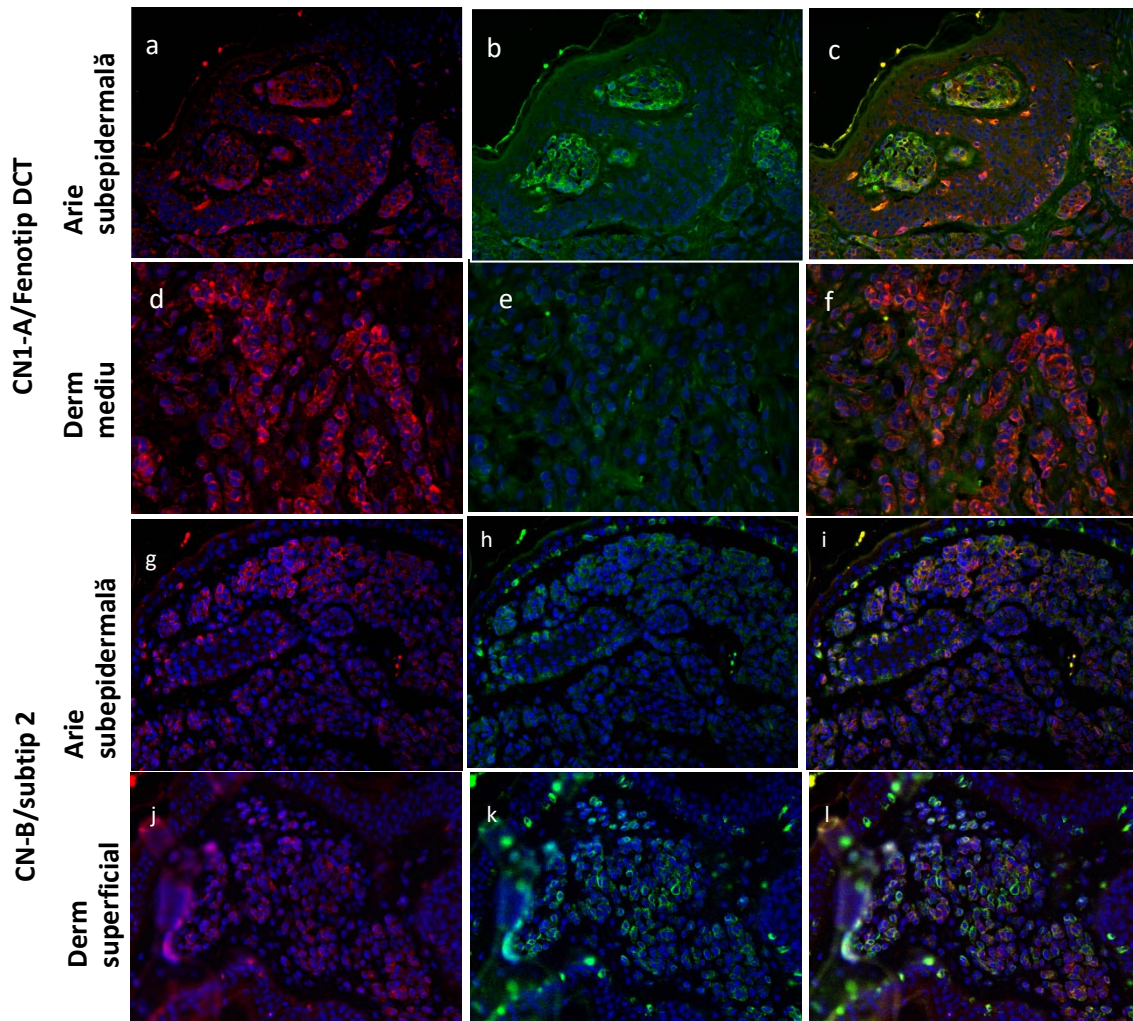


Figura 7. Analiza la nivel molecular a două specimene de leziuni melanocitice benigne. Probele sunt marcate pentru DCT (anti-hDCT), Tyr (T311) și nuclei (DAPI/blue) și analizate prin IHC. Fenotipul DCT este caracteristic specimenului cu neurotizare crescută (CN1-A). Magnificarea originală este X40.

Figură adaptată cu permisiunea Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkinst după Filimon et. al Value of Dopachrome tautomerase detection in the assesment of melanocytic tumours, Melanoma Research 2014, Vol 24, No 3.http://journals.lww.com/melanomaresearch/fulltext/2014/06000/Value_of_dopachrome_tautomerase_detection_in_the.5.aspx

Mult mai neașteptat a fost ca în speci­me­nele dublu pozitive să iden­ti­fi­căm o ar­hi­tec­tură spe­ci­fică, cu ce­lule Tyr+ care ra­mân me­reu în straturile su­pe­rioare ale com­pen­tei tu­morale în vreme ce po­pu­la­țiile ce­lulare DCT+ sunt me­reu în derm. Acest re­zultat este în con­sen­sus cu cea ce rapor­tează Hashimoto Y. și colab. (18) ce arată că în nevi ex­presia Tyr (pro­teină) este re­strânsă la ni­velul straturii ba­zal/dermului su­pe­rior în vreme ce ARN-ul me­sa­ger pen­tru

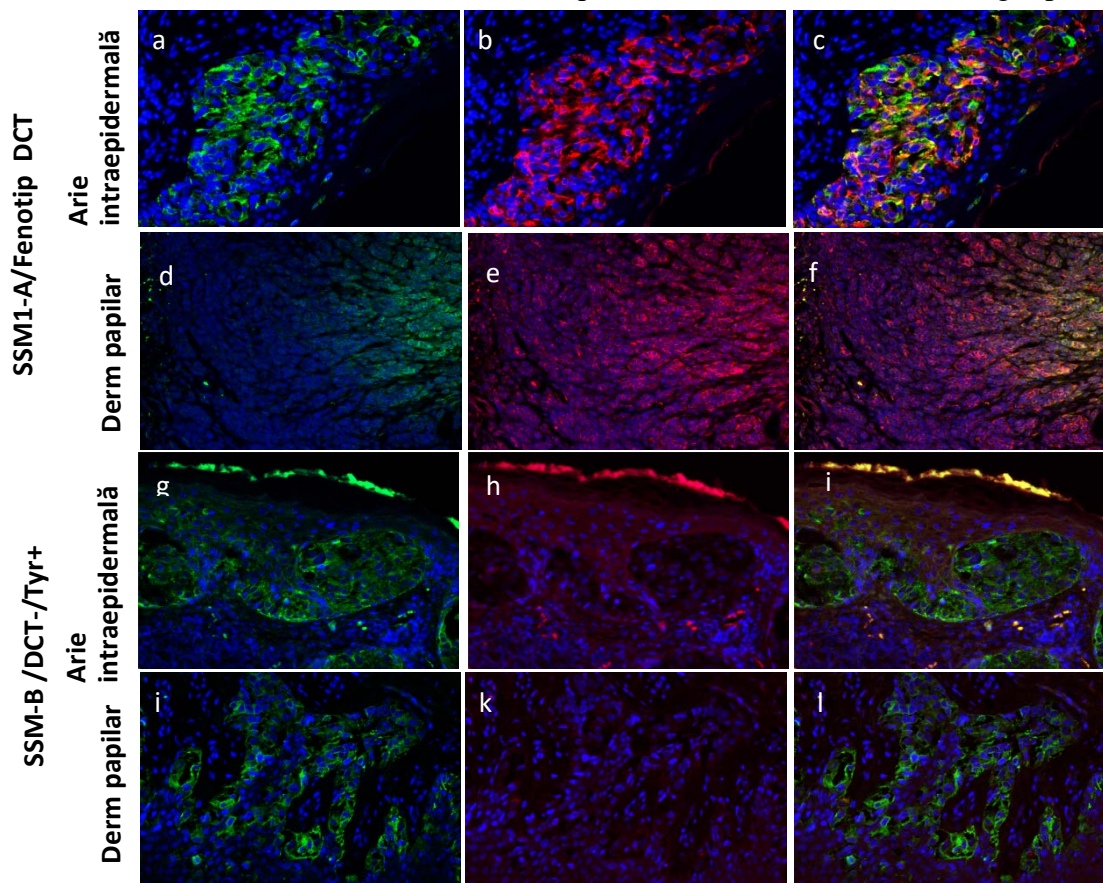


Figura 8 Analiza la nivel molecular a două speci­me­ne de leziuni melanocitice malig­ne. Probele sunt marcate pen­tru DCT (anti-hDCT/roșu), Tyr (T311/verde) și nu­clei (DAPI/albastru) și ana­lizate prin IHC. Fenotipul DCT este ca­rac­teristic speci­me­nului cu ul­ce­ra­ție (SSM1-A) (**Tabelul 4**). Magnifi­ca­rea ori­gi­nală este 20X în SSM-B și 40X în SSM1-A. Fi­gu­ră re­pro­du­șă cu per­mi­si­unea Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wil­kin­st după Filimon et. al Value of Dopachrome tau­to­me­rase de­tec­tion in the as­ses­ment of melanocytic tu­mours, Melanoma Research 2014, Vol 24, No 3.http://journals.lww.com/melanomaresearch/fulltext/2014/06000/Value_of_dopachrome_tau_tomerase_detection_in_the.5.aspx

DCT este de­tec­tată în toate straturile, ba­zal, de sus, de mijloc și profund al dermului. În con­sen­sus cu ace­ste date este și stu­diul lui De Vries T.J și colab. (19) care sub­li­nia­ză că ex­presia Tyr este sca­zută sem­ni­fi­ca­tiv în pro­gresia me­la­nomului.

După cum se observă DCT dar nu și Tyr este exprimată în 31% ALMs toate având caracteristicile de malignitate avansată și prognostic nefavorabil. Mai mult categoria ALM este una cu cel mai mare procent de specimene dublu negative. Pierderea totală a expresiei Tyr și reținerea DCT ar putea reprezenta o particularitate a unor pacienți cu ALMs. Această molecularitate s-ar corela cu anumite caracteristici ale tipului ALM care îl disting de alte tipuri de melanoame în termeni de prognoză nefavorabilă, agresivitate crescută și un stadiu mult mai avansat în realitate decât cel indicat de parametrii clinici. (20,21). În afara categoriei ALM, și melanoamele acromice (AC) includ specimene ce exprimă exclusiv DCT. În majoritatea AC Tyr este dectată dar probabil se exprimă ca precursor instabil, similar Tyr din linia amelanotică SK28 (**Fig. 4C**) (22) sau alte linii amelanotice (23) și acest rezultat poate fi o explicație pentru numărul relativ mare de specimene AC pozitive pentru Tyr. Totuși în liniile celulele amelanotice DCT, spre deosebire de Tyr, este un antigen complet procesat, stabil și foarte bine detectabil în speciunile AC negative pentru Tyr. Din aceste motive DCT ar reprezenta un marker mult mai adecvat decât Tyr în acest tip de leziuni. Acest rezultat este susținut și de datele lui Orlow S.J. și colab. (24,25) care a raportat că în tumorile amelanotice Tyr este adeseori deficientă în vreme ce expresia DCT persistă. Choi C. și colab (26) și Smedley R.C și colab (27) recomandă DCT ca marker de diagnostic în melanoamele canine acromice. Și speciunile AC investigate aici și pozitive doar pentru DCT au un profil de malignitate avansat sugerând că expresia DCT, deja cunoscută ca proteină antiapoptotică, participantă în rezistența celulară la stres, ar putea fi implicată și în evoluția neasteptat de agresivă a unor melanoame acromice (28).

Referitor la semnificația clinică a fenotipului DCT, observăm că în cazul speciunilor analizate în **Fig.7**, largi arii de celule intradermale DCT+/Tyr- sunt detectate în nevi compuși caracterizați de intensă neurotizare. Schimbările neuroide în proliferarea melanocitică sunt descrise în general ca observabile la baza nevilui demal. Structurile tumorale constau în celule de tip C (elongate cu nucleu în formă de fus, asemănător cu fibroblastele sau celulele Schwann) aranjate în tipare ce amintesc de fibrele nervoase sau de organele neurale cum ar fi corpusculii Wagner-Meissner (29). Activitatea deja documentată anti-apoptotică a DCT (30), care se exprimă intens în ariile puternic neurotizate ar fi în consens și posibil contributivă la binecunoscuta stabilitate crescută și proliferare scăzută a acestor celule nevice (31,32).

În speciunul de melanom malign subțire prezentat în **Fig. 8** ca având fenotipul DCT, singurul parametru clinic care îl distinge de celălalt speciun tot de melanom subțire dar nefiind un fenotip DCT, este ulcerația. Deși ulcerația și grosimea tumorii sunt doi parametrii care se corelează (33) (34) în acest caz un pacient are ulcerație iar celălalt nu, deși ambii au

indexuri Clark identice și grosimi Breslow ale tumorilor de 0,5 respectiv 0,45 mm. Cei doi pacienți nu au revenit la control după extirparea tumorii și nu există informații despre statusul lor postoperator. O comunicare recentă a indicat că deși majoritatea melanoamelor subțiri nu pun probleme de risc există o categorie redusă cu ulcerare care dezvoltă în mod neașteptat tumori agresive (35). Faptul că segmentul de pacienți cu melanoame subțiri ulcerate care dezvoltă tumori agresive, ar putea avea ca și parametru caracteristic fenotipul DCT este susținut de datele prezentate în ultima parte a studiului.

2.5 Populațiile celulare DCT-pozitive intradermale din melanoamele subțiri (SSMs) dobândesc expresia și distribuția subcelulară a biomarkerilor sugestivi pentru prognosticul nefavorabil

Etapă următoare a avut ca scop caracterizarea populațiilor celulare maligne DCT+ prezente în componenta intradermală. Au fost alese speciunile SSM1-A (**Fig.8**) și ALM-DCT+/Tyr- (**Fig. 6**), reprezentând o tumoră în stadiu avansat). În conformitate cu parametrii clinici, speciunul ALM este de așteptat să conțină markeri de progresie malignă sugestivi pentru prognosticul nefavorabil, fiind utilizat drept „control pozitiv” pentru expresia acestora ca și pentru distribuția lor subcelulară. Mai mult, acest speciun ALM este negativ pentru expresia celorlalte antigene de melanom, TRP-1 (**Fig. 9a, a1**) și MART-1 (**Fig. 9b, b1**) și are un nivel foarte scăzut al expresiei gp100 (**Fig. 9c,c1**).

Hif-1 α este principalul reglator al proceselor celulare ca răspuns la condițiile hipoxice, fiind un factor de transcripție ce reglează expresia a 60 gene implicate în tumorigeneză, apoptoză și progresia malignă în diferite tipuri de cancere. În speciunul SSM1 melanocitele izolate din stratul dintre D-E și care exprimă DCT, așa cum era de așteptat, nu sunt pozitive pentru Hif-1 α (**Fig. 10a, a1**). Celulele DCT+ ce invadează dermul în SSM1 (**Fig. 10b, b1**) co-exprimă Hif-1 α , citoplasmatic similar cu cele din hipodermul speciunului ALM (**Fig. 10c, c1**). Aceasta indică selecția celulelor capabile să supraviețuiască în condiții severe de stres ambiental în care Hif-1 α se stabilizează în citoplasmă ca urmare a stopării degradării sale, așa cum este raportat în cancerul de sân (36) sau carcinomul colorectal (37).

Caveolin-1 (Cav-1) este o proteină implicată în multiple procese celulare inclusiv cele prezente în tumorigeneză. În SSM1, celulele DCT+ din stratul IE co-exprimă Cav-1 în granule citoplasmatic/nucleare sau în segmente care decorează PM (**Fig. 10d, d1**). În componenta ID Cav-1 este exprimată dar în celulele negative pentru DCT (**Fig. 10e, e1**), în vreme ce în speciunul ALM, toate celulele sunt negative pentru Cav-1 (**Fig. 10f, f1**). În celulele de melanom supraexpresia de Cav-1 este corelată cu atenuarea capacităților

migratorii și a potențialului metastatic al celulelor tumorale (38). Clonele DCT intradermale, negative pentru Cav-1 similare clonelor din specimenul ALM pot dobândi capacitați

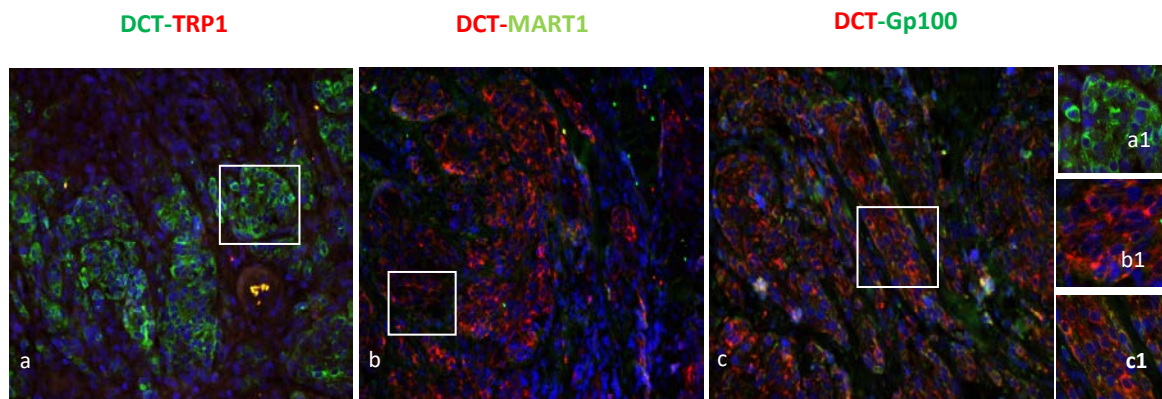


Figura 9. Analiza expresiei DCT comparativ cu a altor antigene melanozomale, TRP-1, MART-1 si gp-100, într-o leziune ALM de malignitate avansată

Figură reprodusă cu permisiunea Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkinst după Filimon et. al Value of Dopachrome tautomerase detection in the assesment of melanocytic tumours, Melanoma Research 2014, Vol 24, No 3. http://journals.lww.com/melanomaresearch/fulltext/2014/06000/Value_of_dopachrome_tauomerase_detection_in_the.5.aspx

migratorii spre deosebire de celulele din ariile intraepidermale care co-exprimă Cav-1. *Ciclina D1* (Cycl D1) și *Ciclina E* (Cycl E), împreună cu kinazele reglatoare-dependente și inhibitorii care acționează pentru a determina tranziția celulelor prin fazele G1 și S, sunt consistent supraexprimate în melanoamele metastatice comparativ cu nevii. În specimenul SSM1 în componenta IE, numeroase celule DCT+ sunt intens pozitive și pentru Cycl D1 nucleară (**Fig. 10g, g1**), în vreme ce în aria ID celulele DCT+ sunt slab marcate pentru Cycl D1 nucleară, și celulele care sunt intens pozitive pentru Cycl D1 nucleară nu exprimă DCT (**Fig. 10h, h1**). În specimenul ALM (**Fig. 10i, i1**), Cycl D1 nucleară este exprimată ocazional în celule DCT+, în vreme ce mult mai multe celule pozitive pentru DCT exprimă și Cycl D1 citoplasmatică. Nu a fost detectată colorație pentru Cycl E în celulele tumorale incluzând și celulele DCT+ localizate în ariile IE ale specimenului SSM1 (**Fig. 10j, j1**). Totuși, acest marker este intens exprimat în citoplasma celulelor DCT+ în grupuri celulare intradermale ID din SSM1 (**Fig. 10k, k1**), întocmai ca în populațiile celulare DCT+ identificate în specimenul ALM (**Fig. 10l, l1**), ceea ce ar putea conferi caracteristici metastatice avansate celulelor intradermale DCT+ în SSM1. Clonele intradermale DCT+ nu mai exprimă Cycl D1 nucleară, ceea ce e în concordanță cu datele raportate de Ramirez J.A și colab. (39) care arată că expresia de Cycl D1 scade în componentele tumorale inferioare. Aceasta sugerează că celulele DCT+ din componenta dermală inferioară ar avea o capacitate mai scăzută de proliferare. Atât în specimenul ALM cât și în componenta intradermală a specimenului SSM analizat, clonele

DCT+ exprimă Cycl D1 și Cycl E în citoplasmă. Expresia Cycl D1 este amplificată în special melanoamele acrale (40) și sechestrarea ei anormală în citoplasma celulelor mamaliene tumorale (41) previne apoptoza similar mecanismelor întâlnite în celulele neuronale (42). Izoformele Cycl E cu greutate moleculară mică (LMW-E) ce apar ca fiind produse în mod particular în celulele tumorale dar nu și în cele normale (43) sunt asociate cu stimularea angiogenezei și al potențialului metastatic al celulelor umane de melanom *in vivo* (44) și acumularea lor citoplasmatică contribuie la tumorigenicitatea celulară (45).

Bcl-2 este în principal cunoscută ca o proteină având capacitatea de a prelungi supraviețuirea celulelor hematopoietice și neuronale prin blocarea apoptozei. În specimenul SSM1, grupuri de celule din stratul dintre D–E sau în componenta IE sunt pozitive fie pentru DCT fie pentru Bcl-2 (**Fig. 10m, m1**).

În dermul specimenului SSM1 a fost detectat un grup de celule tumorale DCT+ exprimând Bcl-2 în nucleu (**Fig. 10n, n1**) similar cu celulele DCT+ din specimenul ALM (**Fig. 10o, o1**). În final, clonele intradermale DCT+ dobândesc expresie Bcl-2. O creștere a expresiei Bcl-2 în fenotipul DCT+/Bcl-2+ ar putea schimba caracteristicile tumorii potențând progresia către fenotipuri puternic metastatice așa cum s-a raportat în alte studii pe melanom sau în tumori derivate de la celule endoteliale ce supraexprimă Bcl-2 (46, 47).

Bazat pe datele prezentului studiu și pe ceea ce este deja cunoscut despre DCT, teoria noastră, prezentată schematic în **Fig. 11**, este ca disjunctia dintre expresiile DCT și Tyr este un eveniment molecular timpuriu în transformarea neoplazică a melanocitelor. DCT și Tyr sunt co-exprimate în melanocitele din pielea normală (**Fig. 11, galben/portocaliu**). În timpul transformării neoplazice, expresiile DCT și Tyr devin dissociate în populații celulare distincte (**Fig. 11, DCT-roșu; Tyr-verde**). În JN, DCT/Tyr sunt încă co-exprimate în toate celulele nevice (subtipul 0). O arhitectură tumorală particulară în care celulele DCT– /Tyr+ sunt mereu prezente în dermul superficial, în vreme ce celulele DCT+/Tyr – invadează dermul profund este definită ca subtipul 1 sau ‘**fenotipul DCT**’ așa cum apare în nevii compuși (CN) și displazici (DN) și în fenotipurile maligne (SSM, NM, ALM, ACM). Procesul de disjunctie **abruptă** a expresiei DCT/Tyr pare a fi reprezentativ pentru melanoamele nodulare și speciamele cu fază de creștere verticală adâncă (ALMs sau ACMs cu Breslow 12, 17, 22 mm). În CN acest fenotip este asociat cu neurotizare. În SSM, spre deosebire de JN și straturile subepidermale (SE), populațiile celulare DCT pozitive intradermale dobândesc expresia și distribuția subcelulară a biomarkerilor asociați cu migrarea (Cav-1-), supraviețuirea în condiții de stres (Hif-1 α citoplasmic), mecanisme antiapoptotice activate

(Bcl-2+, Cve1 D1 citoplasmică) și potențial crescut angiogenic și metastatic (Cycl E+
SSM1-A /Fenotip DCT SSM1-A /Fenotip DCT ALM /DCT+/Tyr-
cytoplasmic Strat D-E, arii arii intradermale ALM /DCT+/Tyr-
sub-/ intra-epidermale arii intradermale arii intradermale

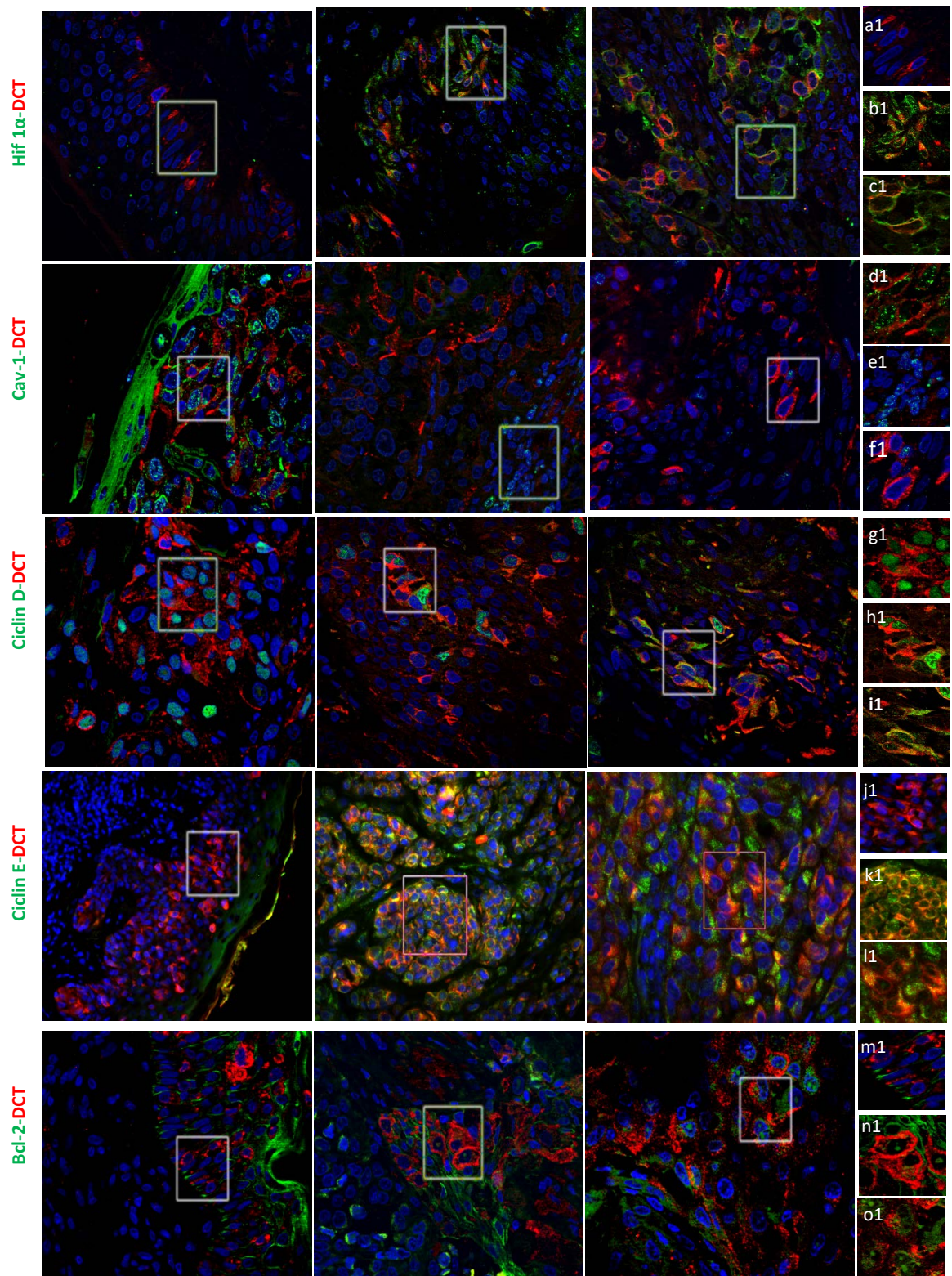


Figura 10. Caracterizarea fenotipului DCT în raport cu biomarkeri de prognostic nefavorabil și progresie malignă. Figură adaptată cu permisiunea Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkinst după Filimon et. al Value of Dopachrome tautomerase detection in the assesment of melanocytic tumours, Melanoma Research 2014, Vol 24, No3.http://journals.lww.com/melanomaresearch/fulltext/2014/06000/Value_of_dopachrome_tautomerase_detection_in_the.5.aspx

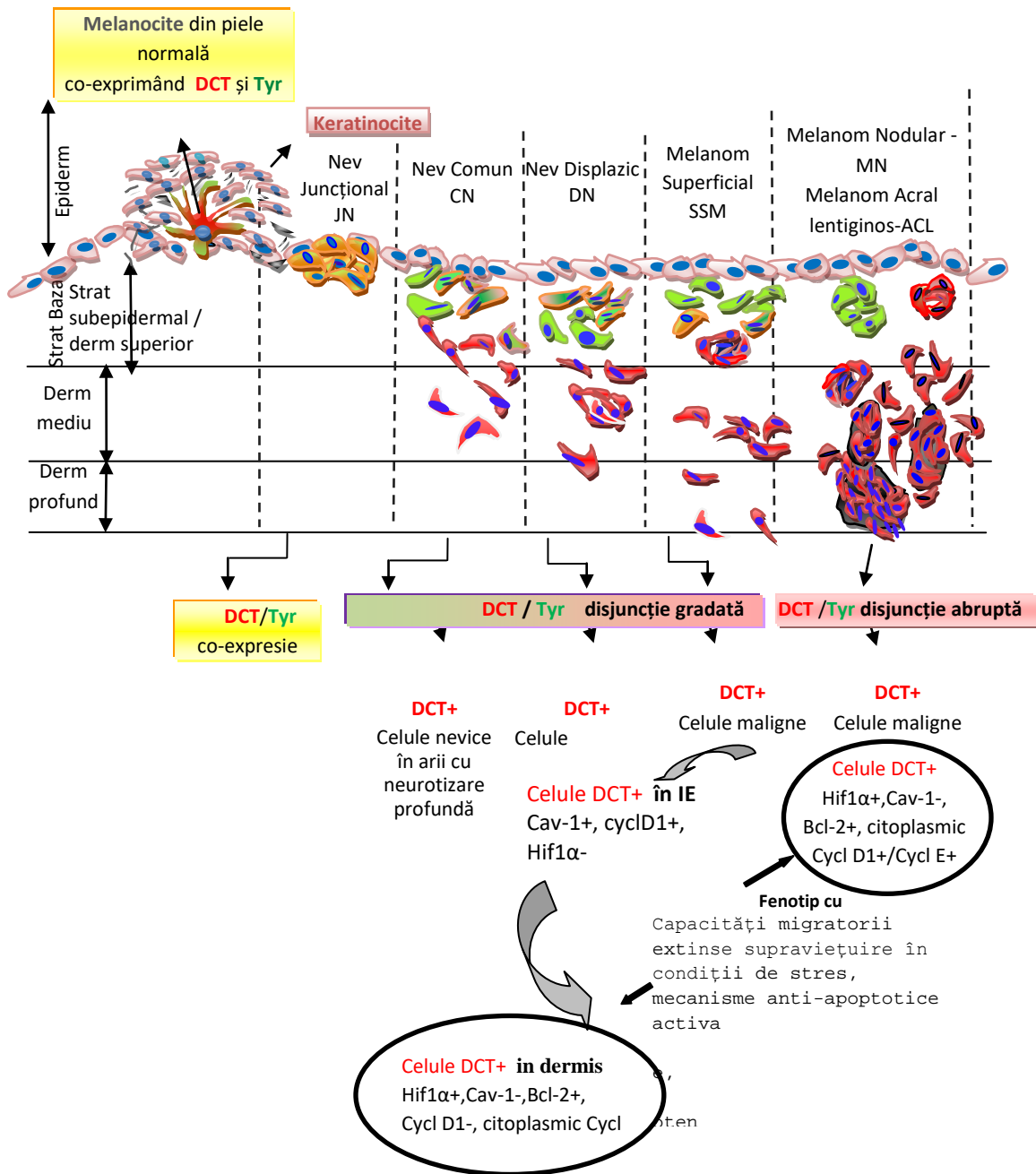


Figura 11. Reprezentarea schematică a procesului de disociere a DCT și Tyr și anatomia moleculară a fenotipului celular DCT în leziunile melanocitice

Figură adaptată cu permisiunea Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkinst după Filimon et. al Value of Dopachrome tautomerase detection in the assesment of melanocytic tumours, Melanoma Research 2014, Vol 24, No 3.
http://journals.lww.com/melanomaresearch/fulltext/2014/06000/Value_of_dopachrome_tautomerase_detection_in_the.5.aspx

2.6 Concluzii generale și Perspective

- DCT, spre deosebire de Tyr este exprimată și complet procesată de-a lungul căii secretorii atât în celulele de melanom pigmentat cât și în cele de melanom amelanotic.
- Majoritatea tumorilor investigate sunt pozitive pentru ambele antigene DCT și Tyr demonstrând că DCT este un antigen stabil, bine exprimat.
- Expresiile disjuncte ale DCT și Tyr în populații celulare distincte susțin utilitatea adăugării DCT în lista de biomarkeri pentru creșterea sensibilității detecției celulelor tumorale în care Tyr și alți biomarkeri sunt slab exprimați sau absenți.
- Disocierea expresiilor DCT și Tyr în leziuni melanocitice este corelată cu transformarea neoplazică a melanocitelor și cu progresia malignă și ar putea fi privită ca un eveniment molecular caracteristic inițierii și evoluției MC.
- A fost identificată o arhitectură moleculară specifică, pe care noi am denumit-o *fenotip DCT* și care este corelată cu parametrii patologici specifici în leziuni benigne și maligne ca neurotizarea și respectiv ulcerarea. În unele melanoame subțiri populațiile celulare DCT+ intradermale exprimă biomarkeri de progresie metastatică și prognostic nefavorabil, aducând în atenție un posibil fenotip caracterizat de agresivitate și rezistență terapeutică crescută.
- Fenotipul DCT poate fi privit ca un fenotip „care cedează greu” (‘die-hard’) care în tumorile benigne, nu reprezintă o problemă amenințătoare, vitală. Totuși, celulele DCT prezente în dermul profund al leziunilor maligne timpurii dobândesc expresia și distribuția subcelulară a markerilor moleculari raportați de alte studii ca fiind asociați în tipuri diferite de neoplasme incluzând melanomul cu: capacitate migratorie extinsă (caveolin-1-), supraviețuire în condiții de stres (Hif-1 α + citoplasmic), mecanisme antiapoptotice activate (ciclina D+ și Bcl-1+ cytoplasmic), potențial angiogenic și metastatic (ciclina E+ citoplasmic). Fenotipul intradermal DCT reprezintă un parametru care ar trebui evaluat într-o analiză multifactorială de prognostic a leziunilor melanocitice.
- Anticorpul anti-hDCT obținut în cadrul IBAR este adecvat pentru identificarea DCT în specimene histopatologice și pentru alte studii moleculare privind analiza DCT în linii celulare de melanom.

Bibliografie selectată

1. Marghoob A.A. et al., The most common challenges in melanoma diagnosis and how to avoid them, *Australasian Journal of Dermatology* 2009, 50, 1-15.
2. Agaimy A. et al., Metastatic Malignant Melanoma With Complete Loss of Differentiation Markers (Undifferentiated Dedifferentiated Melanoma) Analzsis of 14 Patients Emphasizing Phenotypic Plasticity and the Value of Molecular Testing as Surrogate Diagnostic Marker, *American Journal of Surgical Pathology*, 2016, 40(2), 181-191.
3. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures. Atlanta, GA: American Cancer Society (2014). Available from: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf>
4. Alonso S. R. et al., A High-Throughput Study in melanoma Identifies Epithelial-Mesenchymal Transition as a Major Determinant of Metastasis, *Cancer Res*, 2007, 67(7), 3450-60
5. Gould Rothberg B. E. et al., Tissue Biomarkers for Prognosis in Cutaneous Melanoma: A Systematic Review and Meta-analysis, *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101, 452-474.
6. Ladstein R. G. et al., Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitosin in thick cutaneous melanoma, *BMC Cancer*, 2010,10, 140.
7. Leonard L.J. et al., Function of dopachrome oxidoreductase and metal ions in dopachrome conversion in the eumelanin pathway, *Biochemistry* 1988, 27, 6156–6159.
8. Udono T. et al., Expression of Tyrosinase-related Protein 2/ DOPAchrome Tautomerase in the Retinoblastoma, *Exp. Eye Res*,2001, 72, 225-234.
9. Chi D.D.J et al., Molecular Detection of Tumor-Associated Antigens Shared by Human Cutaneous Melanomas and Gliomas, *American Journal of Pathology*, 1997, 150(6), 2143-52.
10. Jiao Z. et al., Dopachrome tautomerase (Dct) regulates neural progenitor cell proliferation, *Developmental biology*, 2006, 296, 296-408.
11. Askoy P. and Meneses P.I, The role of DCT in HPV16 infection of HaCaTs, *PLoS One*, 2017, 12 (1): e0170158
12. Tachibana M et al., Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics, *Nat Genet*, 1996, 14(1), 50-4, 1996.

13. Ying-Tao Z. et al., Proteomic analysis of differentially expressed proteins between metastatic and non-metastatic human colorectal carcinoma cell lines, *Eur J. Gastroenterol Hepatol*, 2005, 17(7), 725-32.
14. Orlow S.J. et al., Comparative decreases in tyrosinase, TRP-1, TRP-2, and Pmel17/silver antigenic proteins from melanotic to amelanotic stages of syngeneic mouse cutaneous melanomas and metastases. *Cancer Res* 1998; 58:1521–1523.
15. Le Poole IC et al., Interferon- γ reduces melanosomal antigen expression and recognition of melanoma cells by cytotoxic T cells. *Am J Pathol* 2002; 160:521–528.
16. Itakura E. et al., RT in situ PCR detection of MART-1 and TRP-2 mRNA in formalin-fixed, paraffin embedded tissues of melanoma and nevi. *Mod Pathol* 2008; 21:326–333.
17. Negroiu G. et al., Tyrosinase-related protein-2 and -1 are trafficked on distinct routes in B16 melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328:914–921.
18. Hashimoto Y. et al., Expression of profiles of melanogenesis-related genes and proteins in acquired melanocytic nevus. *J Cutan Pathol* 2006; 33:207–215.
19. De Vries T.J. et al., Expression of gp100, MART-1, tyrosinase, and S 100 in paraffin-embedded primary melanomas and locoregional lymph node, and visceral metastases: implication for diagnosis and immunotherapy. A study conducted by the EORTC Melanoma Group. *J Pathol* 2001; 193:13–20.
20. Bastian B.C. et al, Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res* 2000; 60:1968–1973.
21. Franke W. et al., Plantar malignant melanoma – a challenge for early recognition. *Melanoma Res* 2000;10:571–576.
22. Watabe H. et al., Regulation of tyrosinase processing and trafficking by organellar pH and by proteasome activity. *J Biol Chem* 2004; 279:7971–7981.
23. Halaban R. et al., Aberrant retention of tyrosinase in the endoplasmic reticulum mediates accelerated degradation of the enzyme and contributes to the dedifferentiated phenotype of amelanotic melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:6210–6215.
24. Orlow S.J. et al., Comparative decreases in tyrosinase, TRP-1, TRP-2, and Pmel17/silver antigenic proteins from melanotic to amelanotic stages of syngeneic mouse cutaneous melanomas and metastases. *Cancer Res* 1998; 58:1521–1523.
25. Orlow S.J. et al., Changes in expression of putative antigens encoded by pigment genes in mouse melanomas at different stages of malignant progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:10152–10156.
26. Choi C. and Kusewitt D.F. Comparison of tyrosinase-related protein-2, S-100,

and Melan A immunoreactivity in canine amelanotic melanomas. *Vet Pathol* 2003; 40:713–718.

27. Smedley R.C. et al., Immunohistochemical diagnosis of canine oral amelanotic melanocytic neoplasms. *Vet Pathol* 2011; 48:32–34.

28. Cheung W.L. et al., Amelanotic melanoma: a detailed morphologic analysis with clinicopathologic correlation of 75 cases. *J Cutan Pathol* 2012; 39:33–39.

29. Elder D.E. et al., Benign pigmented lesions and malignant melanoma. In: Elder DE, Elenitsas R, Johnson BL, Murphy GF, editors. *Lever's histopathology of the skin*. 9th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. pp. 728–730.

30. Sandoel A. et al., HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase, *Nature*, 2010, 465 (7298), 577-583.

31. Florell S. R. et al., Proliferation, apoptosis, and survivin expression in a spectrum of melanocytic nevi, *J Cutan Pathol* 2005; 32:45–49.

32. Morales-Ducret C.R. et al., Bcl-2 expression in melanocytic nevi. Insights into the biology of dermal maturation. *Arch Dermatol* 1995; 131:915–918.

33. Balch C.M. et al., Prognostic factors analysis of 17600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001; 19:3622–3634.

34. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma as a group, ulcerated lesions are thicker and more likely to have a nodular growth pattern. *Cancer* 1980; 45:3012–3017.

35. Whiterman D.C., Prognostic sub-classification of T1 cutaneous melanomas based on ulceration, tumor thickness and Clark level of invasion. Results of a population-based study from the Swedish Melanoma Register. *Br J Dermatol* 2013; 168:685–686.

36. Tan E.Y. et al., Cytoplasmic location of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor is associated with an enhanced hypoxic response and a shorter survival in invasive breast cancer, *Breast Cancer Res* 2007; 9:R89.

37. Kuwai T. et al., Mutation of the von Hippel-Lindau (VHL) gene in human colorectal carcinoma: association with cytoplasmic accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha. *Cancer Sci* 2004; 95:149–153

38. Trimmer C. et al., CAV1 inhibits metastatic potential in melanomas through suppression of the integrin/Src/FAK signaling pathway. *Cancer Res* 2010; 70:7489–7499.

39. Ramirez J.A. et al., Cyclin D1 expression in melanocytic lesions of the skin. *Ann Diagn Pathol* 2005; 9:185–188.

40. Takata M. et al., Molecular pathogenesis of malignant melanoma: a different perspective from the studies of melanocytic nevus and acral melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23:64–71.
41. Alao J.P. et al., The cyclin D1 proto-oncogene is sequestered in the cytoplasm of mammalian cancer cell lines. *Mol Cancer* 2006; 5:7.
42. Sumrejkanchanakij P. et al., Role of cyclin D1 cytoplasmic sequestration in the survival of postmitotic neurons. *Oncogene* 2003; 2:8723–8730.
43. Harwell R.M. et al., Processing of cyclin E differs between normal and tumor breast cells. *Cancer Res* 2000; 60:481–489.
44. Bales E. et al., The low molecular weight cyclin E isoforms augment angiogenesis and metastasis of human melanoma cells in vivo. *Cancer Res* 2005; 65:692–697.
45. Delk N.A. et al., Altered subcellular localization of tumor specific cyclin E isoforms affects cyclin-dependent kinase 2 complex formation and proteasomal regulation. *Cancer Res* 2009; 69:2817–2825.
46. Trisciuoglio D et al., Bcl-2 overexpression in melanoma cells increases tumor progression-associated properties and in vivo tumor growth. *J Cell Physiol* 2005; 205:414–421.
47. Kumar P. et al., Endothelial cells expressing Bcl-2 promotes tumor metastasis by enhancing tumor angiogenesis, blood vessel leakiness and tumor invasion. *Lab Invest* 2008; 88:740–749.

PARTEA II NANOPARTICULE PENTRU ELIBERAREA ȚINTITĂ DE COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI

INTRODUCERE

Nanotehnologia este o știință care se ocupă cu sinteza, caracterizarea și utilizarea materialelor cu dimensiuni de maxim 100 nm în cel puțin o dimensiune. Dendrimerii sunt nanoparticule de 1-15 nm, polimerice, tridimensionale cu o structură înalt ramificată și o formă globulară în care toate legăturile chimice pornesc radial dintr-o zonă centrală reprezentată de o moleculă mică sau un polimer mic liniar. Termenul dendrimer provine din limba greacă și evidențiază forma unică a acestor macromolecule: *dendron*, ce înseamnă copac sau creangă iar *meros* înseamnă parte. Din punct de vedere structural, dendrimerii sunt caracterizați de trei substructuri distincte: o zonă centrală multifuncțională, generații de unități repetitive (notate cu G) atașate la zona centrală și o suprafață externă cu grupări terminale funcționale. Dendrimerii prezintă un grad mare de uniformitate moleculară și proprietăți caracteristice atât chimiei moleculare datorită sintezei treptate în condiții controlate cât și chimiei polimerilor deoarece sunt structuri polimerice alcătuite din monomeri. Comparativ cu polimerii liniari, dendrimerii au o serie de proprietăți fizico-chimice superioare ce îi recomandă pentru eliberarea compușilor farmacologici: structură compactă și globulară comparativ cu structura necompactă a polimerilor liniari, formă sferică opusă conformației spiralate, lipsite de organizare a polimerilor liniari, compresibilitate scăzută și solubilitate crescută în apă și substanțe nepolare (1). Aceste proprietăți conferă dendrimerilor caracteristici unice ce pot ameliora o serie de neajunsuri ale agenților terapeutici cum ar fi solubilitatea scăzută în apă și degradarea rapidă după introducerea în sistemele biologice (2). O altă proprietate interesantă a dendrimerilor este efectul de retenție datorită cavităților interne din structură, ce le permite să încapsuleze agenți farmacologici, ingrediente cosmetice, ioni metalici cu rol în cataliză, etc. Astfel dendrimerii pot lega o varietate de biomolecule prin mai multe mecanisme: de complexare, de conjugare și de încapsulare. Sintetizați inițial de către Vögtle F. în 1978 prin metode de sinteză divergente dendrimerii s-au transformat într-o țintă atractivă pentru industria nanotehnologiilor deoarece pot fi funcționalizați prin conjugarea cu diverse tipuri de molecule ce le modifică proprietățile fizicochimice și biologice inițiale rezultând astfel sisteme multivalente. Aceste sisteme permit atașarea la aceeași moleculă de dendrimer atât a

moleculilor ce servesc țintirea specifică cât și a compușilor farmacologic activi, ceea ce poate reduce semnificativ efectele secundare ale medicației asupra celulelor sănătoase. Dendrimerii prezintă deja un spectru larg de aplicații atât în medicină cât și în alte domenii. În medicină dendrimerii sunt utilizați ca atare, datorită proprietăților antibacteriene și antivirale intrinseci sau ca molecule suport pentru diverși agenți farmacologici și compuși folosiți în diagnostic (3). În terapia cancerului, dendrimerii prezintă numeroase aplicații: imagistica tumorilor, terapia fotodinamică, terapia prin captura neutronilor de către izotopul neradioactiv Boron-10 folosită ca metodă alternativă la terapia convențională cu radiații în cazul gliomului, terapie genică, și eliberarea țintită a agenților farmacologici.

Aplicarea nanotehnologiilor în melanom urmărește atenuarea sau înlăturarea rezistenței la tratament, creșterea eficienței terapeutice, reducerea efectelor secundare datorate terapiei și nu în ultimul rând îmbunătățirea diagnosticului. Formulările terapeutice cu lipozomi, dendrimeri, albumină umană, polimerozomi și particule pe bază de carbon au fost concepute pentru eliberarea compușilor chimioterapeutici în tratamentul melanomului (4), utilizarea în terapia țintită, imunoterapie, terapie fotodinamică, inhibarea sistemului de detoxifiere celulară și țintirea proceselor apoptotice mediate de către mitocondrii. Deși folosirea nanotehnologiei pentru formularea de noi agenți terapeutici a dus la testarea clinică sau chiar vânzarea a numeroase medicamente pentru diverse tipuri de cancer (5), în ceea ce privește melanomul studiile sunt încă la nivel preclinic. Au fost testate in vitro o serie de formulări ale dendrimerilor cu diverși agenți chimioterapeutici ce s-au dovedit superioare față de folosirea singulară a compușilor anti tumorali. Conjugarea agentului chimioterapeutic temolozomid (TMZ) cu dendrimeri PAMAM are ca scop îmbunătățirea eficienței terapeutice prin creșterea timpului de înjumătățire a compusului. Studiile in vitro au arătat că internalizarea nanostructurilor TMZ-PAMAM-PEG-GE11-HA a fost mai eficientă în celulele de melanom metastatic A375 comparativ cu fibroblaste epiteliale umane (6). Sinteza tectodendrimerilor sub formă de sandvișuri alcătuite din dendrimeri PAMAM de generația 5 legați covalent de o mantie de dendrimeri de generația 2,5 în care sunt încorporați agenții farmacologici Metotrexat (MTX) și acid zolendronic (ZO) are ca scop facilitarea folosirii acestor compuși în terapia melanomului. În mod normal MTX este lipsit de eficiență în melanom datorită preluării și eliminării din celule a complexului MTX-FR α (receptorul folat) de către melanozomi iar ZO este un compus din clasa bifosfonaților ce este reținut cu precădere la nivel osos ceea ce îl face inutil în tratamentul melanomului. Încărcarea tectodendrimerilor cu 6 molecule MTX a dus la obținerea unor compuși cu o toxicitate crescută pentru celulele de

melanom metastatic SKMel-28 comparativ cu keratinocitele HaCaT. Astfel conjugarea cu dendrimeri a MTX poate modifica internalizarea acestui compus de la un mecanism bazat pe interacția cu receptorul folat α la un mecanism bazat pe macropinocitoză ce poate bloca exocitoza MTX din celulele de melanom. Încărcarea dendrimerilor cu 31 molecule ZO a dus la exercitarea unui efect toxic asupra celulelor de melanom (85%) dar și asupra keratinocitelor (50%). Conjugarea doxorubicinei (DOX) cu dendrimeri PAMAM de generație 4 și administrarea pulmonară îmbunătățește activitatea antitumorală a compusului și limitează efectele cardiotoxice într-un model de melanom murin cu metastaze pulmonare (7). Administrarea pulmonară a DOX conjugată sau liberă este mai eficientă comparativ cu administrarea intravenoasă iar conjugarea cu dendrimeri micșorează încărcătura metastatică pulmonară dar și distribuția DOX în țesutul cardiac. Exemplele enumerate mai sus ilustrează beneficiile conjugării agenților chimioterapeutici cu dendrimeri: îmbunătățirea eficienței terapeutice prin reducerea timpului de înjumătățire, micșorarea toxicității față de țesuturile normale, introducerea de agenți farmacologici noi în terapia melanomului care dealtfel sunt total lipsiți de eficiență în absența conjugării cu dendrimeri. Scăderea toxicității sistemice (generalizată) prin acumularea preferențială în tumori. este potențată de anumite proprietăți fizico-chimice specifice nanoparticulelor ce determină internalizarea preferențială în anumite tipuri de celule; atașarea de liganzi specifici pentru anumiți receptori supraexprimați în tumori; efectul ERP (enhanced permeability and retention) prin care molecule de o anumită dimensiune (lipozomi, dendrimeri, alte tipuri de nanoparticule și compuși chimici) tind să se acumuleze în țesuturile tumorale mai mult decât în țesuturile normale. ERP se datorează vasculaturii intratumorale alcătuită din celule endoteliale aliniată defectuos cu spații între ele, lipsită de stratul de musculatură netedă, cu un lumen mai mare și o expresie modificată a receptorilor de angiotensină II comparativ cu vasculatura țesuturilor normale. Din acest motiv, particule cu dimensiuni suficient de mari pot patrunde prin circulația sangvină în tumori dar nu și în țesuturile normale. *Scopul experimentelor descrise în continuare este evaluarea pentru prima dată în culturi de celule de melanom uman, primar și metastatic, a unor structuri glicodendrimerice de tipul poli (propilen imină) de generația 5 (G5-PPI) pentru a determina posibilitatea folosirii acestor nanoparticule pentru eliberarea țintită de compuși biologic activi.*

Rezultate și discuții

1. Efectul conjugării cu maltoză asupra citotoxicității dendrimerilor G5-PPI

Nanoparticulele utilizate în acest studiu au fost dendrimerii de tipul poli (propilen imină) de generația 5 iar pe baza lor au fost sintetizați glicodendrimerii cu invelis de maltoză, în laboratorul condus de Dr. Dietmar Appelhans din Leibniz-Institute für Polymerforschung Dresden, Germania. Acești nanocompuși, denumiți mai departe convențional G5-PPI, au fost furnizați Institutului de Biochimie în cadrul unei colaborări internaționale. G5-PPI sunt nanoparticule sintetizate prin metoda divergentă pornind de la un nucleu diaminobutan căruia i se adaugă succesiv un număr de 64 de grupări amino primare. Acest tip de dendrimeri au o încărcătură cationică datorită multiplelor grupări aminice de suprafață și pot destabiliza membrana celulară determinând liza celulelor. În același timp grupările aminice de suprafață pot constitui puncte de legare pentru diverse grupări funcționale (molecule fluorescente, ARN mic de interferență, etc) ducând la diversificarea aplicațiilor biomedicale ale acestor compuși astfel încât este preferabilă menținerea grupărilor amino terminale împreună cu aplicarea unor strategii pentru reducerea toxicității.

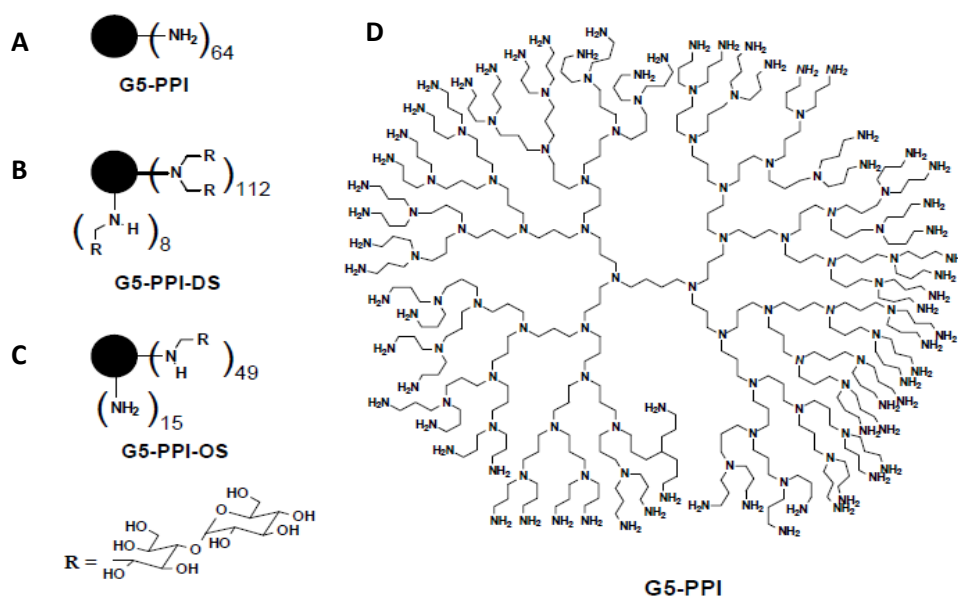


Figura 1. Structura schematică a dendrimerilor poly(propilen imină) G5-PPI (A), a dendrimerilor neutri G5-PPI-DS (B), a dendrimerilor cationici G5-PPI-OS (C) și structura chimică a dendrimerilor G5-PPI (D). Chenarul verde marchează nucleul diaminobutan. Figura adaptată cu permisiunea Bentham Science după Filimon et al., Internalization and intracellular trafficking of poly(propylene imine) glycodendrimers with maltose shell in melanoma cells, *Curr Med Chem* 2012, 19(29): 4955-68.

Pentru analiza imagistică în structura dendrimerilor au fost grefate molecule de FITC sau rodamină B ce permit vizualizarea acestora la microscopul de fluorescență ca elemente verzi (FITC) sau roșii (rodamină B).

Decorarea suprafeței dendrimerilor cu maltoză în cantități variabile poate determina scăderea cationicității și implicit a toxicității acestor nanoparticule cu un impact pozitiv asupra folosirii lor drept platforme pentru eliberarea țintită de compuși biologic activi.

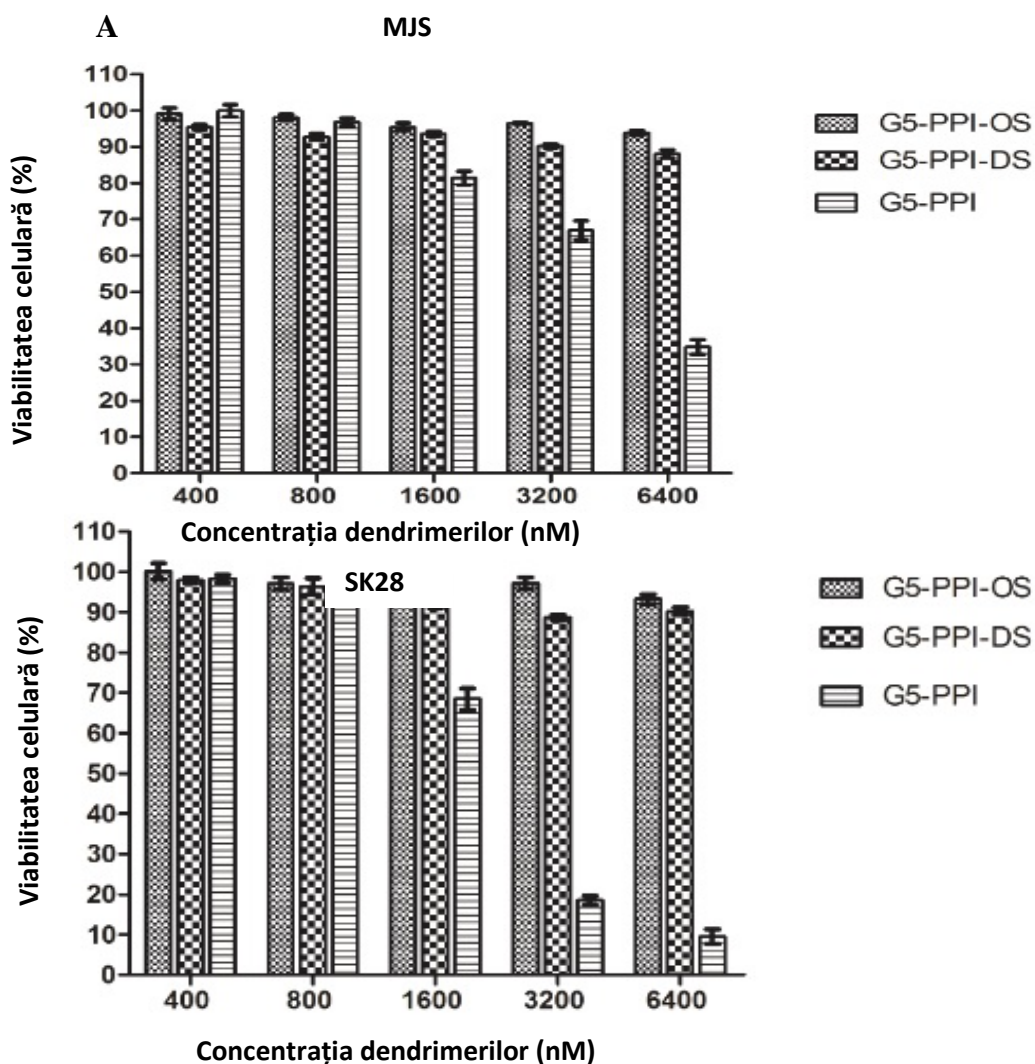


Figura 2 Efectul conjugării cu maltoză asupra citotoxicității dendrimerilor G5-PPI. Linile celulare de melanom MJS și SK28 au fost expuse timp de 1h la concentrații crescute de dendrimeri fără înveliș de maltoză (G5-PPI), glicodendrimeri cationici (G5-PPI-OS) sau neutri (G5-PPI-DS). Viabilitatea celulelor a fost calculată conform protocolului din secțiunea materiale și metode. Datele reprezintă media a trei experimente independente (n=3) realizate în triplicat. Figura adaptată cu permisiunea Bentham Science după Filimon et al., Internalization a intracellular trafficking of poly(propylene imine) glycodendrimers with maltose shell in melanoma cells, *Curr Med Chem* 2012, 19(29): 4955-68.

Astfel, pornind de la dendrimerii G5-PPI (Fig.1 A, D) au fost sintetizați dendrimerii cationici cu înveliș de maltoză deschis (G5-PPI-OS, Fig. 1C) și dendrimerii aproape neutri cu înveliș de maltoză dens (G5-PPI-DS, Fig. 1B) ce au fost evaluați ca sisteme potențiale cu aplicabilitate în terapia sau diagnosticul melanomului. Experimentele au utilizat în principal ca sisteme celulare două linii de melanom uman amelanotic, MJS și SK28 (8), reprezentând două fenotipuri distincte VGP (timpuriu sau primar) și respectiv metastatic din punct de vedere al caracteristicilor ce definesc progresia malignă în melanomul cutanat. Analiza citotoxicității dendrimerilor G5-PPI-OS și G5-PPI-DS comparativ cu dendrimerii G5-PPI parentali a evidențiat faptul că la concentrații cuprinse între 400 și 800 nM nici unul din dendrimeri nu prezintă efecte toxice asupra liniilor de melanom primar, MJS (Fig. 2A) sau metastatic, SK28 (Fig. 2B). Creșterea la peste 800 nM a concentrațiilor de dendrimeri G5-PPI, G5-PPI-OS și G5-PPI-DS, duce la scăderea viabilității celulare în cazul G5-PPI, în timp ce viabilitatea celulelor expuse la concentrații identice de G5-PPI-OS și G5-PPI-DS rămâne la un nivel de peste 90% chiar și la cea mai crescută concentrație de dendrimeri (6400 nM, Fig. 2A,B). Aceste rezultate demonstrează că *citotoxicitatea dendrimerilor G5-PPI descrește considerabil prin modificarea suprafeței lor cu maltoză, efectul fiind vizibil mai ales la tratarea celulelor cu concentrații crescute de dendrimeri (1600-6400 nM).*

2. Internalizarea dendrimerilor G5-PPI-OS și G5-PPI-DS în linii celulare de melanom uman

Analiza internalizării dendrimerilor G5-PPI-OS și G5-PPI-DS în diverse tipuri de celule este un pas necesar pentru determinarea capacității de traversare a membranelor celulare și a potențialului de a fi utilizați ca transportori de molecule farmaceutice active *in vivo*. În acest scop s-au folosit un număr de 5 linii celulare umane din care 4 linii de melanom (A375, MNT-1, SK28, MJS) și o linie de celule renale embrionare (HEK293T) non-melanocitice, în care s-au analizat *procentul de celule ce au internalizat dendrimerii, nivelul de fluorescență intracelulară și randamentul de preluare al nanoparticulelor de către celule.*

Analiza procentului de celule (Fig. 3) ce internalizează dendrimerii indică faptul că G5-PPI-DS este preluat de către un număr mai mic de celule față de G5-PPI-OS, diferențele fiind mai vizibile în cazul liniei A375 (74,1 % comparativ cu 88,5%) și mai puțin evidente în cazul liniei SK28 (79,67% comparativ cu 81,8%).

Analiza procentului de celule pozitive pentru G5-PPI-OS și G5-PPI-DS

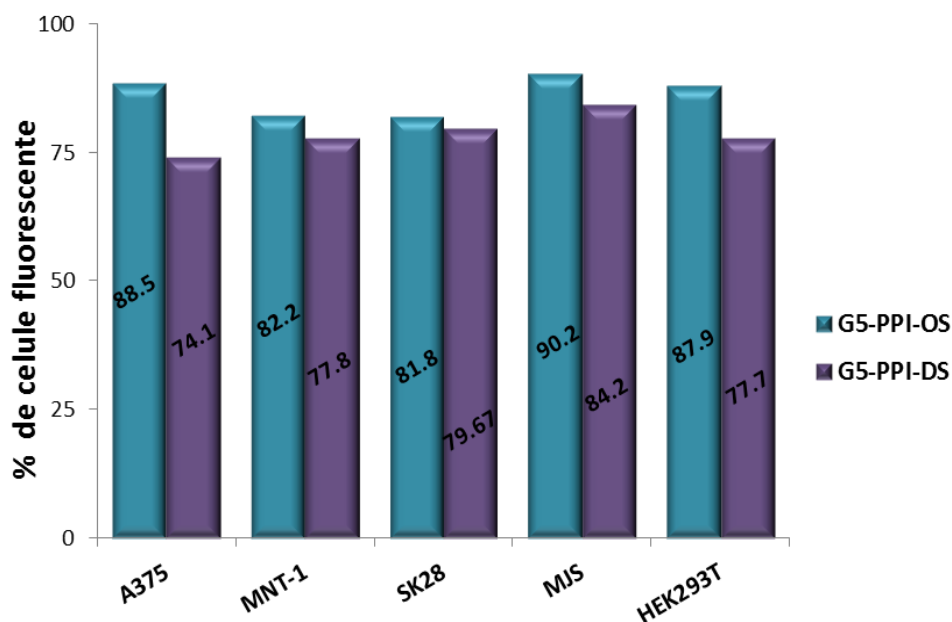


Figura 3. Internalizarea dendrimerilor G5-PPI-OS și G5-PPI-DS în celule de linie melanocitic și non-melanocitic (procentul de celule ce au internalizat nanoparticulele dendrimerice). Celulele de melanom (A375, MNT-1, SK28, MJS) și renale embrionare (HEK293T) au fost incubate cu dendrimerii G5-PPI-OS și G5-PPI-DS (800 nM) conjugați cu FITC timp de 1h după care au fost tratate (+) cu soluție albastru tripan (0,0025%) și analizate prin citometrie în flux. Barele reprezintă media a două experimente independente realizate în duplicat.

Nivelul de fluorescență intracelulară este măsurat prin citometrie în flux în urma tratării celulelor cu o soluție de albastru tripan timp de 10 minute la 37°C. Prezența albastru tripan estompează fluorescența extracelulară generată de dendrimerii adsorbiți la membrana plasmatică și face posibilă măsurarea exclusivă a fluorescenței intracelulare generată de dendrimerii internalizați în celule. *Nivelurile de fluorescență intracelulară* indică faptul că dendrimerii G5-PPI-OS sunt internalizați fără diferențe majore în toate cele 5 tipuri de linii celulare folosite în experiment, liniile MJS, MNT-1 și HEK293T internalizând mai mult dendrimer G5-PPI-OS (8,52; 8,75; 8,35) comparativ cu liniile SK28 (6,78) și A375 (6,27)(Fig.4A). Nivelul de fluorescență determinat de internalizarea dendrimerilor neutri G5-PPI-DS variază în tipurile celulare analizate, liniile SK28 și MJS internalizând mai mult dendrimer neutru (7,71 și respectiv 7,39) comparativ cu liniile MNT-1 (6,48), HEK293T (6,06) și A375 (4,76) ce internalizează cel mai puțin acest tip de dendrimer (Fig.4C). Cu excepția liniei SK28, internalizarea G5-PPI-DS (Fig.4C) determină un nivel mai scăzut de fluorescență intracelulară comparativ cu G5-PPI-OS (Fig. 4A).

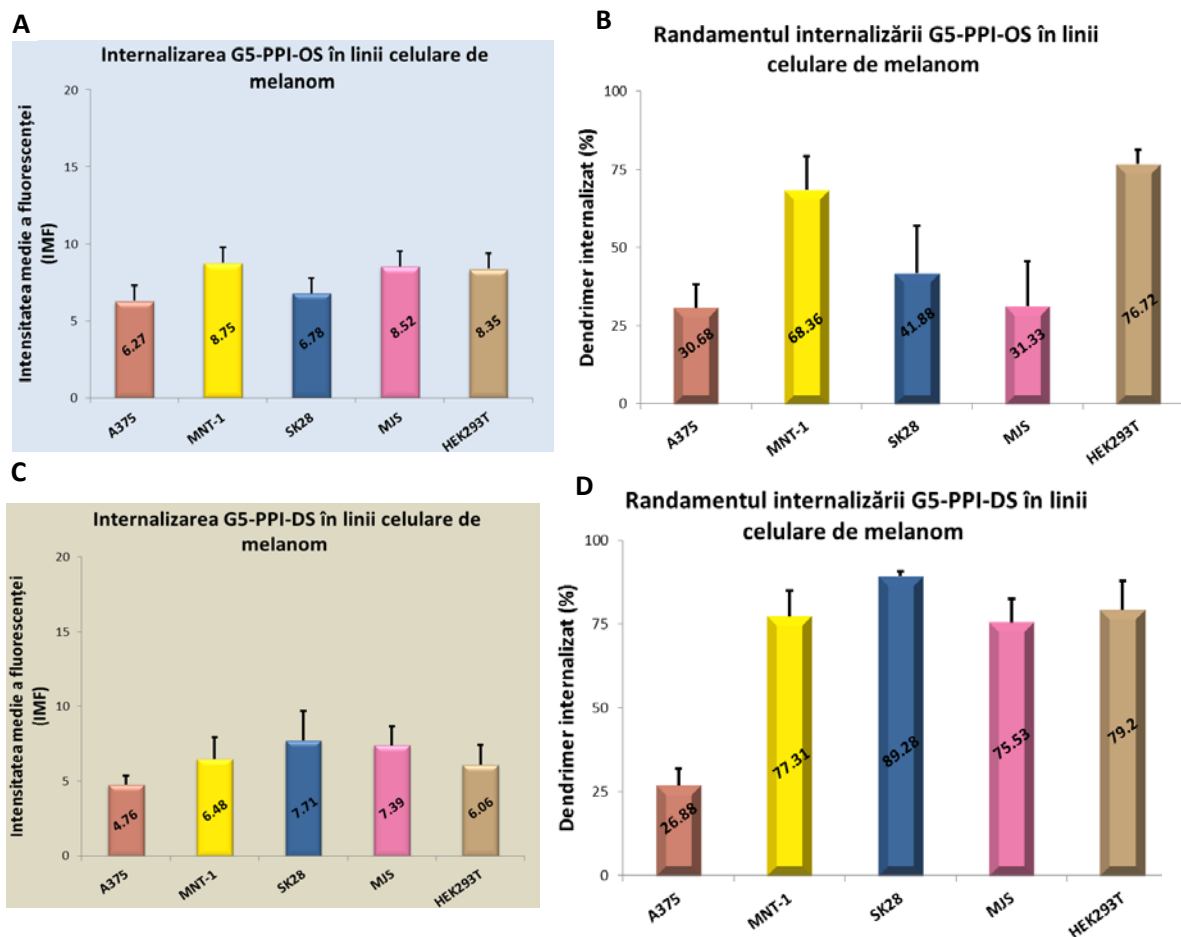


Figura 4. Internalizarea dendrimerilor G5-PPI-OS și G5-PPI-DS în celule de linieaj melanocitic și non-melanocitic (nivelul de fluorescență intracelulară și randamentul de preluare al nanoparticulelor de către celule). Internalizarea dendrimerilor G5-PPI-OS în liniile celulare A375, MNT-1, SK28, MJS și HEK293T. Internalizarea dendrimerilor G5-PPI-OS și G5-PPI-DS în prezența albastru tripan reprezentată grafic ca valori absolute ale IMF (A,C).

Randamentul de internalizare al G5-PPI-OS este mai mare în liniile celulare MNT-1 (68,36%) și HEK293T (76,72%) decât în liniile SK28 (41,88%) și MJS (31,33%), linia A375 internalizând dendrimerii G5-PPI-OS cu cel mai mic randament (30,68%)(Fig. 4B). Drept urmare, randamentul de internalizare al G5-PPI-OS (Fig.4B) în cele 5 linii celulare analizate variază mai mult (coeficientul de variație, CV=43%) decât nivelul de fluorescență al celulelor (CV=14%) asumând că valorile IMF reflectă într-o manieră semicantitativă nivelul de dendrimeri prezent intracelular. Astfel linia MNT internalizează cel mai mult G5-PPI-OS (8,75) cu cel mai bun randament (68,36%), iar linia A375 internalizează cel mai puțin acest tip de dendrimeri (5,71) cu un randament scăzut (30,68%). Liniile SK28 și MJS internalizează aceste nanoparticule cu un randament de sub 50% (41,88 și respectiv 31,33%). În cazul liniei MJS se observă o discrepanță între nivelul de fluorescență al celulelor (8,52) și randamentul scăzut de internalizare (31,33%), aspect ce poate fi interpretat prin prisma faptului că o parte însemnată de dendrimeri este reținută la membrana plasmatică crescând astfel necesarul de

nanoparticule pentru a obține un nivel de fluorescență similar cu cel din linia MNT-1. Comparativ cu dendrimerii cationici G5-PPI-OS, dendrimerii neutri G5-PPI-DS sunt internalizați mai eficient în liniile MNT-1 (77,31%), SK28 (89,28%) și MJS (75,53%) și în mod aproximativ egal în linia HEK293T (79,2% comparativ cu 76,72%) (Fig. 4D). În linia A375 dendrimerii G5-PPI-DS sunt internalizați cu randamentul cel mai scăzut comparativ cu celelalte linii (26,88%) și aproximativ la fel comparativ cu dendrimerii cationici G5-PPI-OS (30,68%).

Deși există numeroase studii care confirmă natura cationică a nanoparticulelor ca factor favorizant pentru internalizare (9,10,11,12), este posibil ca randamentul mai scăzut de internalizare al dendrimerului cationic G5-PPI-OS comparativ cu dendrimerii aproape neutri G5-PPI-DS, în 4 din cele 5 linii celulare analizate, să se datoreze unei retenții crescute la membrana plasmatică generată de interacția între sarcinile pozitive ale grupărilor NH₂ din structura glicodendrimerului și încărcătura negativă a suprafeței extracelulare a membranei plasmatice. Acest aspect poate explica diferențele mult mai mari între fluorescența extracelulară și fluorescența intracelulară în cazul G5-PPI-OS în linia MJS (55,96 față de 16,34) și SK28 (26,46 față de 7,69) comparativ cu diferențele generate de G5-PPI-DS în linia MJS (15,8 față de 9,19) și SK28 (8,86 față de 6,8). Astfel natura cationică a G5-PPI-OS poate crea un efect de adeziune la membrana plasmatică micșorând randamentul de internalizare dar nu și nivelul de fluorescență intracelulară care este mai crescut față de G5-PPI-DS, cu excepția liniei SK28.

În concluzie, chiar dacă în cazul liniilor celulare MJS, MNT-1 și HEK293T, internalizarea G5-PPI-DS determină un nivel de fluorescență mai scăzut comparativ cu G5-PPI-OS randamentul de internalizare este mai mare în cazul MNT-1, mai mult decât dublu în cazul MJS și aproximativ egal în cazul liniei HEK293T. În linia SK28 G5-PPI-DS determină o creștere mai mare a nivelului de fluorescență și este internalizat cu un randament mai mult decât dublu față de G5-PPI-OS. Datele prezentate arată că G5-PPI-DS poate fi un bun candidat pentru studii in vitro deoarece randamentul sporit de internalizare în 4 din cele 5 linii analizate ar permite administrarea acestuia în cantități mai scăzute, minimizând riscul de apariție a unor efecte toxice. Din grupul liniilor de melanom metastatice, spre deosebire de MNT-1 și SK28, linia A375 are o capacitate mai redusă de a internaliza G5-PPI-OS sau G5-PPI-DS. Aceste diferențe sunt în acord cu heterogenitatea intra și inter tumorală observată în cazul melanomului, generată de dobândirea unor caracteristici moleculare specifice de către subpopulații de celulele tumorale pe parcursul progresiei metastatice.

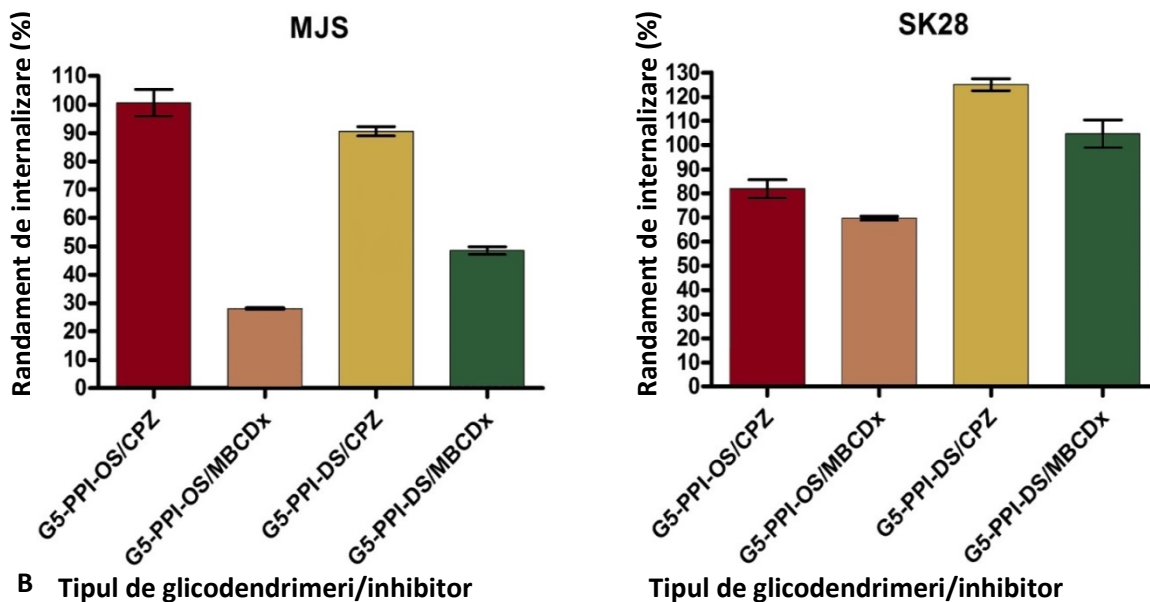
3. Studiul căilor de internalizare ale glicodendrimerilor G5-PPI în linii de melanom primar și metastatic

3.1 Internalizarea G5-PPI-OS și G5-PPI-DS în celule de melanom uman tratate cu inhibitori ai căilor de endocitoză mediate de clatrină și colesterol

Descifrarea căilor de endocitoză prin care celulele preiau dendrimerii dar și ale tipuri de nanoparticule oferă informații importante necesare creării de complexe pentru eliberarea țintită de compuși farmacologici. În funcție de calea de endocitoză pe care o adoptă fiecare tip de nanoparticule, traficul intracelular post endocitic implică diferite compartimente intracelulare și evenimente biochimice. Macropinocitoza și endocitoza dependentă de clatrină presupun acidifierea treptată a veziculelor de transport în timp ce la nivelul caveolelor pH-ul ramane neutru, aspect important în cazul în care se dorește eliberarea controlată a compusului farmaceutic în funcție de pH.

Considerând 100% valorile IMF măsurate în absența inhibitorilor s-a calculat un randament de internalizare al glicodendrimerilor în prezența inhibitorilor exprimat procentual și reprezentat grafic în Fig. 5A. Analiza datelor arată că în celulele MJS tratate cu CPZ internalizarea dendrimerilor cationici G5-PPI-OS nu este afectată, în timp ce în celulele tratate cu M β CD randamentul este de doar 28%. Dendrimerii neutri G5-PPI-DS sunt afectați într-o manieră similară de către inhibitorii de endocitoză, CPZ reducând randamentul de internalizare la 90% față de control iar M β CD la 48%. Spre deosebire de celulele MJS tratamentul cu CPZ afectează internalizarea G5-PPI-OS în celulele SK28, randamentul de internalizare reducându-se la 82% iar M β CD are un efect mai puțin pronunțat în această linie dar reduce randamentul de internalizare la 70%. Internalizarea dendrimerilor neutri G5-PPI-DS în linia celulară SK28 nu este afectată în urma tratamentelor cu inhibitori de endocitoză.

Aceste date pot fi transpuse într-o reprezentare schematică a căilor de internalizare ale celor două tipuri de nanoparticule în celulele MJS și SK28 considerând că un randament de internalizare de 100% în prezența unui inhibitor semnifică o independență totală a endocitozei dendrimerilor față de acea cale de internalizare iar un randament de 0% semnifică o dependență totală de acea cale de internalizare (Fig. 5B). Per ansamblu se poate concluziona că ambele linii celulare folosesc mai mult de o cale de internalizare pentru ambele tipuri de glicodendrimeri dar integritatea domeniilor bogate în colesterol este foarte importantă pentru endocitoza acestora, în special în linia de melanom primar MJS unde tratamentul cu M β CD evidențiază o dependență de 72% pentru G5-PPI-OS și 52% pentru G5-PPI-DS de procesele endocitice mediate de colesterol (Fig. 5B). În linia de melanom metastatic SK28



B Tipul de glicodendrimeri/inhibitor

Tipul de glicodendrimeri/inhibitor

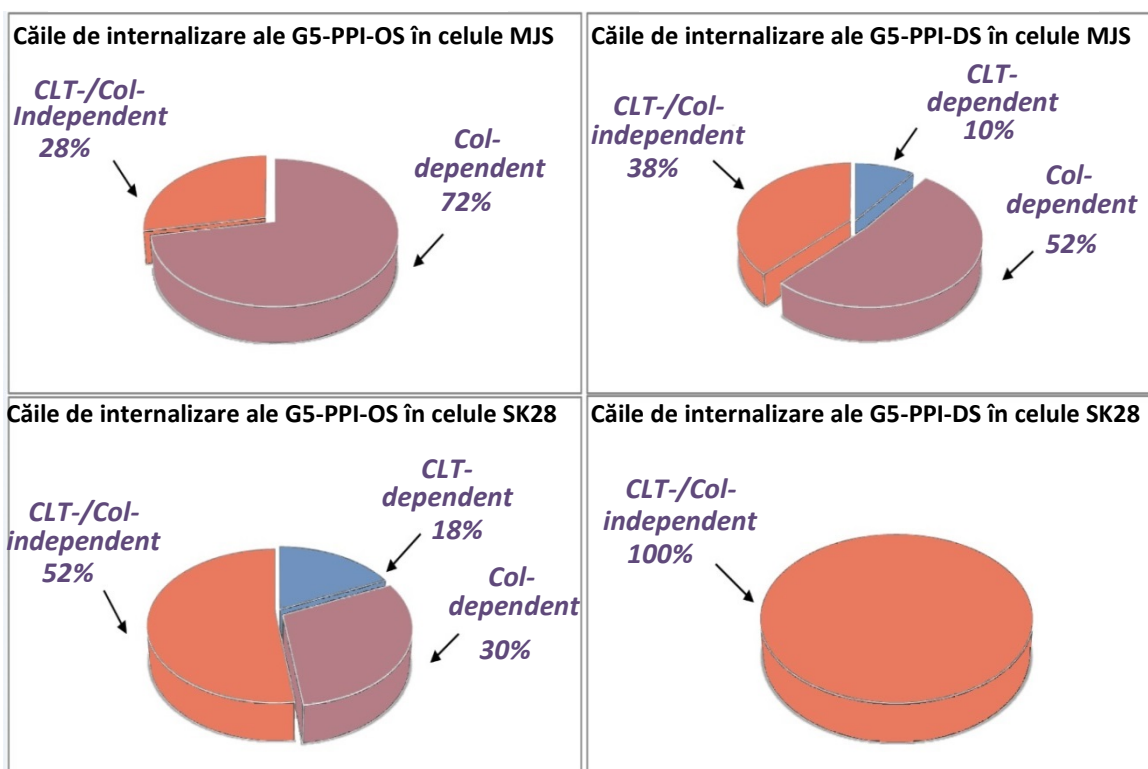


Figura 5 Efectul inhibitorilor de endocitoză asupra internalizării glicodendrimerilor cu înveliș de maltoză de către celulele de melanom. Celulele au fost pretratate cu CPZ sau M β CDx și incubate timp de 1h cu G5-PPI-OS și G5-PPI-DS conjugați cu FITC simultan cu inhibitorii. Celulele incubate cu glicodendrimeri în absența inhibitorilor reprezintă controalele. Toate probele au fost tratate cu albastru tripan pentru a determina exclusiv fluorescența intracelulară și analizate prin citometrie în flux. Valorile glicodendrimerilor internalizați (%) au fost calculate conform modalității descrise în materiale și metode. Datele reprezintă media a trei experimente independente realizate în duplicate (A). Reprezentarea schematică a căilor endocitice utilizate de celule de melanom primare și metastatice pentru internalizarea celor două tipuri de glicodendrimeri (B). Figura adaptată cu permisiunea Bentham Science după Filimon et al., Internalization and intracellular trafficking of poly(propylene imine) glycodendrimers with maltose shell in melanoma cells, Curr Med Chem 2012, 19(29): 4955-68.

internalizarea G5-PPI-OS depinde mai puțin de colesterol (30%) iar internalizarea G5-PPI-DS este colesterol independentă. Reducerea dependenței internalizării dendrimerilor de domeniile bogate în colesterol (cu sau fără caveolină) în linia metastatică SK28 comparativ cu linia de melanom primar MJS este în concordanță cu studii ce arată descreșterea nivelurilor de colesterol și a expresiei caveolinei-1 în progresia metastatică a melanomului (13), aspect observat și de grupul nostru în liniile celulare folosite în acest studiu (date nepublicate). În celulele SK28 internalizarea dendrimerilor cationici G5-PPI-OS depinde în proporție de 48% de colesterol și clatrină și în proporție de 52% se realizează prin căi de endocitoză neconvenționale. Un rezultat interesant este acela că dendrimerii neutri G5-PPI-DS a căror internalizare depinde în proporție de 38% de căile neconvenționale de endocitoză în linia MJS sunt 100% dependenți de aceste căi în linia SK28. *În concluzie, căile de internalizare sunt dependente predominant de colesterol în linia celulară de melanom primar și de mecanisme neconvenționale (non-clatrin/non-colesterol) în celulele de melanom metastatic, endocitoza mediată de clatrină având un rol minor în ambele tipuri de celule pentru ambele tipuri de glicodendrimeri.*

3.2 Internalizarea și traficul structurilor pozitive pentru G5-PPI-DS sunt modulate de elemente ale citoscheletului în celulele de melanom uman

Pentru a stabili dacă elementele componente ale citoscheletului sunt implicate în traficul G5-PPI-DS în liniile de melanom s-au folosit doi compuși chimici ce modulează asamblarea citoscheletului: *citocalazina B (CKL)* al cărei mecanism principal de acțiune constă în inhibarea polimerizării filamentelor de actină datorită legării la capetele retezate cu creștere rapidă ale filamentelor de actină F și *nocodazol (NCZ)* ce interferează cu polimerizarea microtubulilor. În probele control, G5-PPI-DS apare ca structuri fine punctate ce se acumulează în proximitatea nucleului (Fig. 6a și d). În celulele tratate cu CKL G5-PPI-DS se acumulează în structuri reținute la periferia celulelor MJS și SK28 (Fig. 6b și e). În celulele tratate cu NCZ G5-PPI-DS apare ca structuri veziculare bine definite redistribuite din zona perinucleară în întreg corpul celular (Fig. 6c și f). *Se poate concluziona că integritatea filamentelor de actină este importantă pentru internalizarea G5-PPI-DS iar microtubulii joacă un rol în traficul intracelular postendocitic.* Deoarece G5-PPI-DS este endocitat prin mecanisme independente de clatrină și colesterol în procent de 100% în celulele SK28 și 38% în celulele MJS, iar procesele endocitice independente de clatrină sunt într-o stransă corelație cu reorganizarea citoscheletului de actină (14), este posibil ca mecanisme cum ar fi

macropinocitoza să fie implicate cel puțin parțial în internalizarea acestui tip de glicodendrimeri, aspect necesar a fi elucidat prin experimente ulterioare.

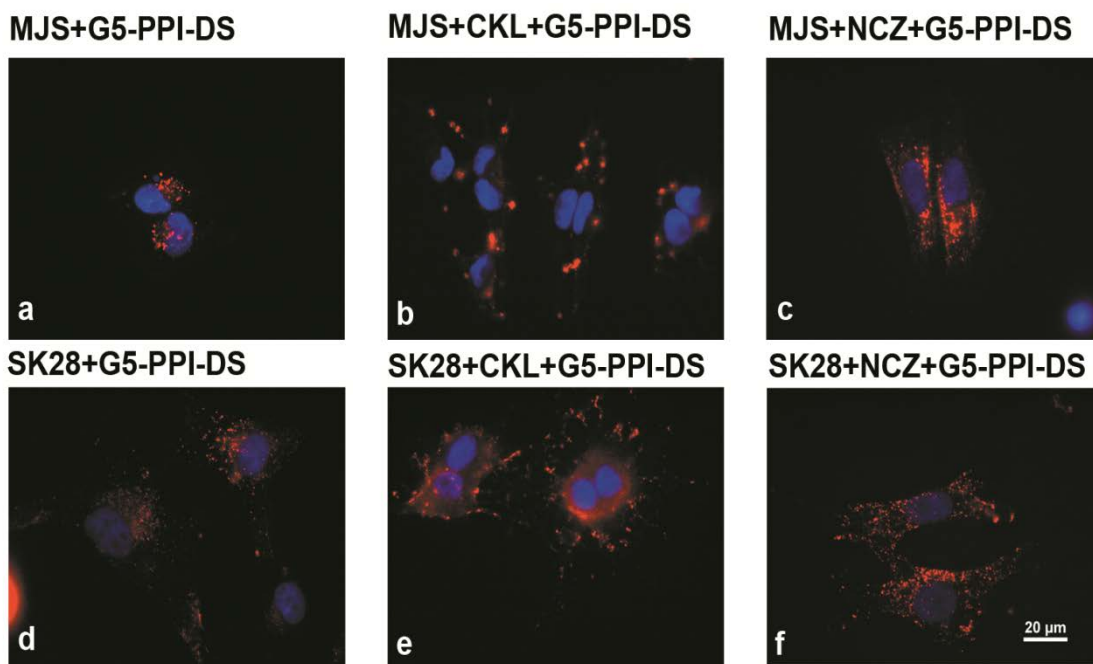


Figura 6. Efectul alterării citoscheletului asupra aspectului și modului de distribuție intracelulară a glicodendrimerilor cu înveliș de maltoză în celulele de melanom. Celulele MJS și SK28 au fost tratate anterior cu CKL și NCZ și incubate cu dendrimerii G5-PPI-DS conjugați cu Rodamina B. Aspectul și modul de distribuție intracelulară a structurilor pozitive pentru dendrimerii fluorescenți în celule tratate cu inhibitori sau netratate au fost analizate prin microscopie de fluorescență. Figura adaptată cu permisiunea Bentham Science după Filimon et al., Internalization and intracellular trafficking of poly(propylene imine) glycodendrimers with maltose shell in melanoma cells, *Curr Med Chem* 2012, 19(29): 4955-68.

3.3 Distribuția subcelulară a structurilor pozitive pentru G5-PPI-DS în celulele de melanom uman linia SK28

Caracterizarea structurilor intracelulare pozitive pentru G5-PPI-DS în relație cu procesele sau compartimentele celulare din linia SK28 a fost efectuată prin folosirea markerilor moleculari specifici reprezentativi pentru principalele compartimente sau structuri subcelulare (15): calnexina pentru reticulul endoplasmic (RE), EEA1 pentru endozomii timpurii (EE early endosomes), Rab 11 pentru endozomii recirculanți (RE-recycling endosomes), Lamp-1 pentru lizozomi (LYS), Rab9 pentru endozomii târzii (LE-late endosomes), syntaxin 8 pentru procese de transport independente de clatrină și evenimente de fuziune membranară necesare pentru transportul proteinelor de la EE la LE (16) și dextran-FITC (masa moleculară 10.000) ca marker pentru macropinocitoză (17). Toate imaginile obținute din experimentele de microscopie de fluorescență sun prezentate în Fig. 7.

Fluorescența G5-PPI-DS este detectată într-o zonă complet opusă față de localizarea RE pusă în evidență prin marcarea celulelor cu anticorpi anti-calnexină, ceea ce sugerează că traficul postendocitic al acestor glicodendrimeri nu implică acest compartiment subcelular. Mai mult, fluorescența G5-PPI-DS nu se suprapune cu LAMP-1 cu toate că vezicule pozitive pentru dendrimeri sunt detectate în proximitatea structurilor marcate cu anticorpi specifici anti Lamp-1 ce reprezintă lizozomii. Puține structuri pozitive pentru G5-PPI-DS și EEA1, syntaxin 8 și Rab11 sunt observate. G5-PPI-DS și endozomii târzii pozitivi pentru Rab9 par să ocupe aceeași regiune perinucleară comună, observându-se chiar o colocalizare parțială ceea ce indică faptul că o parte din glicodendrimerii neutri internalizați se află în acest tip de endozomi. Deasemeni sunt detectate foarte puține structuri pozitive pentru G5-PPI-DS și FITC dextran, un marker de fază fluidă internalizat prin macropinocitoză. O explicație posibilă ar putea fi aceea că în celulele SK28 FITC-dextran este exocitat rapid. Se poate presupune că cele două structuri folosesc o cale de internalizare comună (macropinocitoză) dar urmează rute intracelulare separate modulate de mecanisme distincte.

3.4 Caracterizarea structurilor pozitive pentru G5-PPI-DS în celule de melanom metastatic uman linia SK28

Pentru a caracteriza în detaliu structurile pozitive pentru G5-PPI-DS am folosit agenți farmacologici specifici (wortmanin-WO, brefeldin-BRF și cloroquin-CQ) pentru a trata celulele ulterior incubării cu dendrimeri. Celulele ce au endocitat dendrimerii G5-PPI-DS timp de 1h au fost spălate și incubate pentru încă 30 de minute în prezența agenților farmacologici menționați după care au fost analizate morfologia și distribuția intracelulară a structurilor pozitive pentru G5-PPI-DS în legătură cu moleculele și procesele biologice specifice modulate de agenții farmacologici utilizați (Fig. 8) comparativ cu controalele pozitive netratate (Fig. 7).

WO este un inhibitor al fosfatidilinozitol-3-kinazelor (PI3K), enzime ce catalizează fosforilarea moleculelor lipidice fosfatidilinozitol la fosfatidilinozitol-3fosfat (PtdIns(3)P), eveniment important în traficul intracelular datorită medierii fuziunilor ce au loc între membrana plasmatică (PM) și endozomi, endozomii târzii (LE) și lizozomi (LYS) reticulul endoplasmic (RE) și PM sau fuziunea homotipică a endozomilor timpurii (EE). PtdIns(3)P împreună cu Rab5 și EEA1 sunt molecule ce intervin în traficul și fuziunea endozomilor (18), fiind cunoscut faptul că EEA1 se leagă de PtdIns(3) și este cel mai bine cunoscut efector al acestora. WO induce a) formarea de endozomi mariți și asocierea Rab5 la membranele acestora și b) fuziunea homotipică a EE (19). În majoritatea celulelor SK28 tratate cu WO se

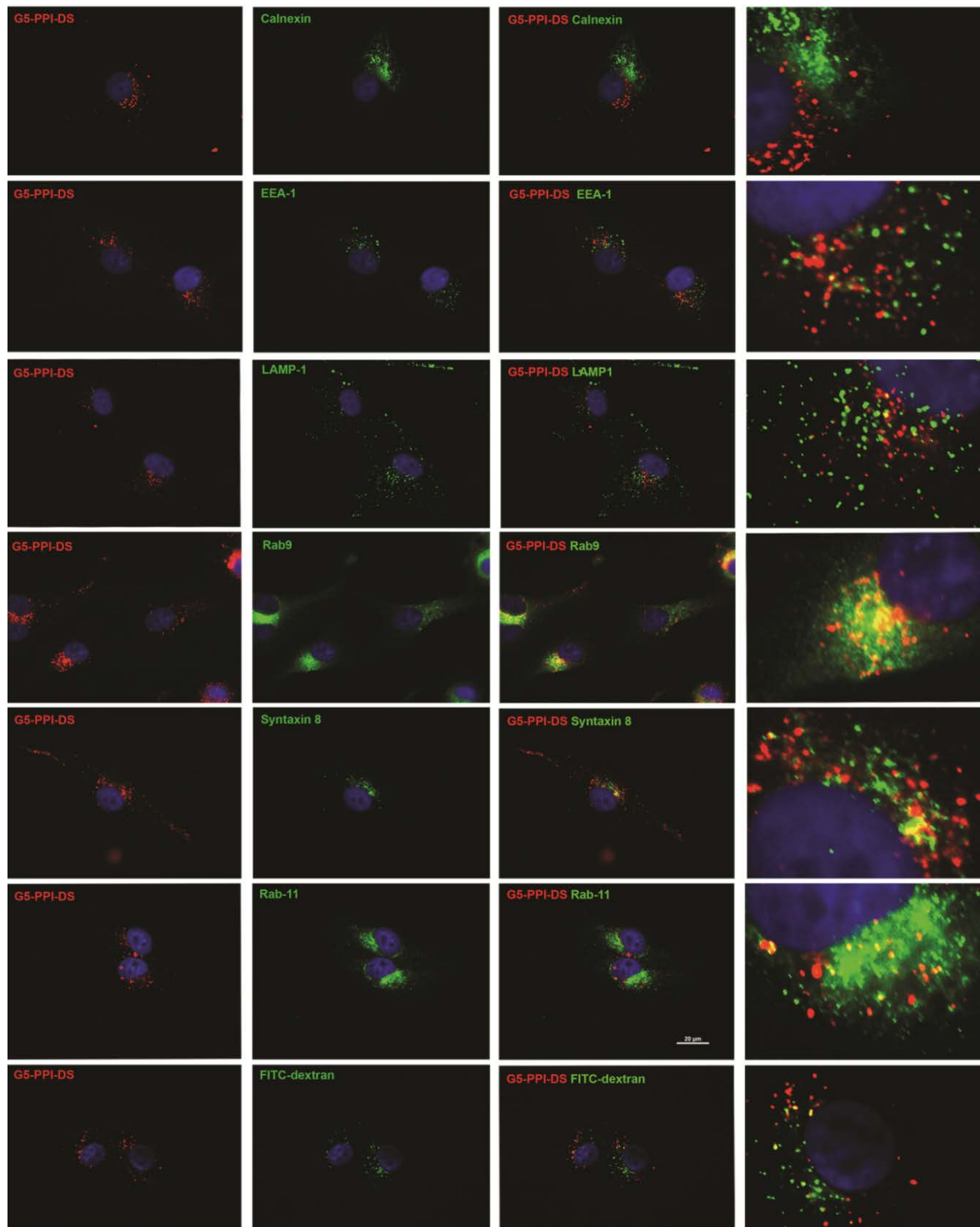


Figura 7. Caracterizarea structurilor pozitive pentru G5-PPI-DS în celulele de melanom metastatic SK28 prin imunomarcarea specifică a compartimentelor intracelulare. Celulele au fost marcate timp de 1 h cu dendrimeri G5-PPI-DS conjugați cu rodamina B și monitorizate în mediu fără dendrimeri timp de 30 de minute sau 1 h acolo unde este indicat. Toate probele au fost fixate, permeabilizate și marcate cu anticorpi pentru markerii moleculari indicați și analizate prin microscopie de fluorescență. Înafară de proteina Arf1 și Rab11 prezintă domenii structurale sensibile la acest inhibitor (78), ceea ce indică faptul că traficul veziculelor pozitive pentru Rab11 este influențat de acțiunea BRF. Figura adaptată cu permisiunea Bentham Science după Filimon et al., Internalization and intracellular trafficking of poly(propylene imine) glycodendrimers with maltose shell in melanoma cells, *Curr Med Chem* 2012, 19(29): 4955-68.

observă schimbări substanțiale în aspectul structurilor pozitive pentru EEA1 și G5-PPI-DS (Fig. 8) comparativ cu aspectul fin, punctiform detectat în celulele netratate (Fig.7).

WO induce formarea unor structuri intracelulare intens fluorescente și considerabil mai mari, pozitive pentru G5-PPI-DS sau EEA1 ce nu colocalizează decât într-o mică măsură. A fost investigat efectul WO și asupra distribuției subcelulare a syntaxinei 8, o proteină ce colocalizează parțial cu structurile pozitive pentru G5-PPI-DS (Fig.7). În celulele netratate syntaxina8 prezintă un aspect punctat polarizat perinuclear, similar cu distribuția TGN, în timp ce în celulele tratate cu WO, structurile pozitive pentru această proteină colapsează în agregate perinucleare strânse fără o morfologie clar pozitivă și pentru G5-PPI-DS (Fig. 8). Mai mult, WO induce un efect similar în structurile pozitive pentru Rab9 cauzând o distribuție densă perinucleară a Rab9 ce se suprapune peste fluorescența generată de G5-PPI-DS. Considerând rezultatele obținute mai sus se poate avansa ideea că G5-PPI-DS este parte a unui cargo a cărui dinamică este reglată de către PtdInsP3 și modulată de către PI3K împreună cu syntaxina8, Rab9 și mai puțin EEA1.

Un alt agent farmacologic la care structurile G5-PPI-DS sunt sensibile este BRF. Cea mai extensiv documentată țintă a BRF este proteina Arf1 ce mediază recrutarea proteinei β -COP la nivelul veziculelor de transport între RE și Golgi (20). Tratamentul celulelor cu BRF duce la colapsarea RE și Golgi datorită împiedicării formării veziculelor de transport și fuziunii membranelor celor două compartimente subcelulare. În afară de proteina Arf1 și Rab11 prezintă domenii structurale sensibile la acest inhibitor (21), ceea ce indică faptul că traficul veziculelor pozitive pentru Rab11 este influențat de acțiunea BRF.

Așa cum reiese din Fig.8, la fel ca în cazul celulelor netratate, structurile pozitive pentru Rab11 și G5-PPI-DS nu colocalizează dar sunt redistribuite din zona perinucleară în întreaga citoplasmă. Pe baza acestor observații se poate concluziona că dinamica formării învelișului structurilor pozitive pentru G5-PPI-DS și a endozomilor recirculanți Rab11 pozitivi este modulată de către BRF.

Considerând faptul că atât structurile G5-PPI-DS pozitive cât și endozomii recirculanți Rab11 pozitivi au răspuns la acțiunea BRF într-o manieră similară deși colocalizarea este extrem de redusă, am dorit să determinăm dacă o fracție mică din glicodendrimerii neutri intră într-o rută de reciclare. Dacă acest aspect este valabil înseamnă că procesul este foarte rapid deoarece în celulele analizate la 1h după internalizarea dendrimerilor și 30 de minute de monitorizare (Fig.7) nu s-a detectat prezența dendrimerilor la membrana plasmatică. Confirmarea acestei ipoteze s-a făcut în urma marcării celulelor timp de o oră cu G5-PPI-DS și menținerea în prezența WO pentru o perioadă mai îndelungată (1h). Pe lângă localizarea

concentrată perinucleară se poate observa acumularea unei fracții de glicodendrimeri la membrana plasmatică în toate cele 4 imagini notate cu G5-PPI-DS+WO/1h din Fig.8. Recircularea este un proces des întâlnit pentru proteinele endocitate sau receptori dar și pentru macropinozomi (22,23). Pe baza acestor rezultate nu se poate preciza dacă de la membrana plasmatică dendrimerii G5-PPI-DS sunt reinternalizați în citosol sau sunt exocitați, totuși se poate afirma clar că traficul structurilor G5-PPI-DS pozitive de-a lungul unei căi de recirculare este un alt eveniment modulată de către pIns(3)P/PI-3K și inhibat de WO. Doar o mică fracție de dendrimeri este prezentă la membrana plasmatică ceea ce sugerează că cea mai mare parte a dendrimerilor internalizați este rapid poziționată în LE posibil cu participarea sintaxinei 8 ca mediator al traficului între EE și LE și Rab9 o GTP-ază localizată în principal la nivelul LE. S-a raportat că producerea locală de PtIns(3)P implică fuziunea macropinozomilor, a veziculelor lipsite de clatrină sau caveolină dar și a EE convenționali (24). Similar macropinocitozei, datele obținute despre internalizarea G5-PPI-DS în linia SK28 arată că acest proces este mediat de către vezicule lipsite de învelișul de clatrină sau caveolină (Fig 6). Pe baza acestor informații și a datelor experimentale obținute este posibil ca macropinozomii să fie implicați în traficul intracelular al G5-PPI-DS.

CQ este un agent lizozomotrop care datorită acumulării intraveziculare este responsabil pentru mărirea EE pozitivi pentru EEA1, organite celulare cu un pH intravezicular ușor acid (6,2-6,5) (25). În celulele SK28 incubate cu G5-PPI-DS și tratate ulterior cu CQ atât structurile EEA1 pozitive cât și structurile G5-PPI-DS pozitive își măresc dimensiunile dar rămân structuri distincte ocazional comasate (Fig. 8) comparativ cu celulele control netratate (Fig. 7). Aceste modificări morfologice sugerează că G5-PPI-DS este asociat cu vezicule sau subcompartimente celulare ce au un pH intracelular acid. O caracteristică descrisă pentru deosebirea macropinozomilor de endozomi este aceea că macropinozomii nu fuzionează cu lizozomii, pH-ul lor fiind mai puțin acid decât cel al lizozomilor. În acest context, rezultatele obținute arată lipsa colocalizării structurilor G5-PPI-DS pozitive cu markerul specific pentru lizozomi LAMP-1 (Fig. 7) și o disociere însemnată de EE pozitivi pentru EEA-1 în celulele tratate cu CQ (Fig. 8). Aceste date susțin ipoteza conform căreia structurile G5-PPI-DS pot fi macropinozomi aflați într-o etapă înaintată de maturare în care pH-ul intravezicular devine acid. În concluzie, se poate afirma că G5-PPI-DS este internalizat în celulele SK28 pe o cale independentă de clatrină și colesterol dar dependentă de actină, un proces caracteristic macropinocitozei. G5-PPI-DS este traficat către o zonă perinucleară prin intermediul rețelei de microtubuli iar morfologia și dinamica structurilor celulare G5-PPI-DS pozitive sunt modulate de către agenți farmacologici ce inhibă formarea învelișului endozomilor (BRF),

traficul membranal (WO) și pH-ul intravezicular (CQ). O mică fracție a G5-PPI-DS este foarte rapid recirculată la membrana plasmatică posibil prin intermediul endozomilor recirculanți pozitivi pentru Rab11, în timp ce majoritatea structurilor G5-PPI-DS pozitive trec printr-un proces de maturare ce constă în fuziunea cu alte structuri endozomale, proces prin care dobândesc elemente caracteristice mașinăriei de trafic și sortare de la EE la LE (Rab9 și syntaxin 8) precum și un pH intravezicular acid.

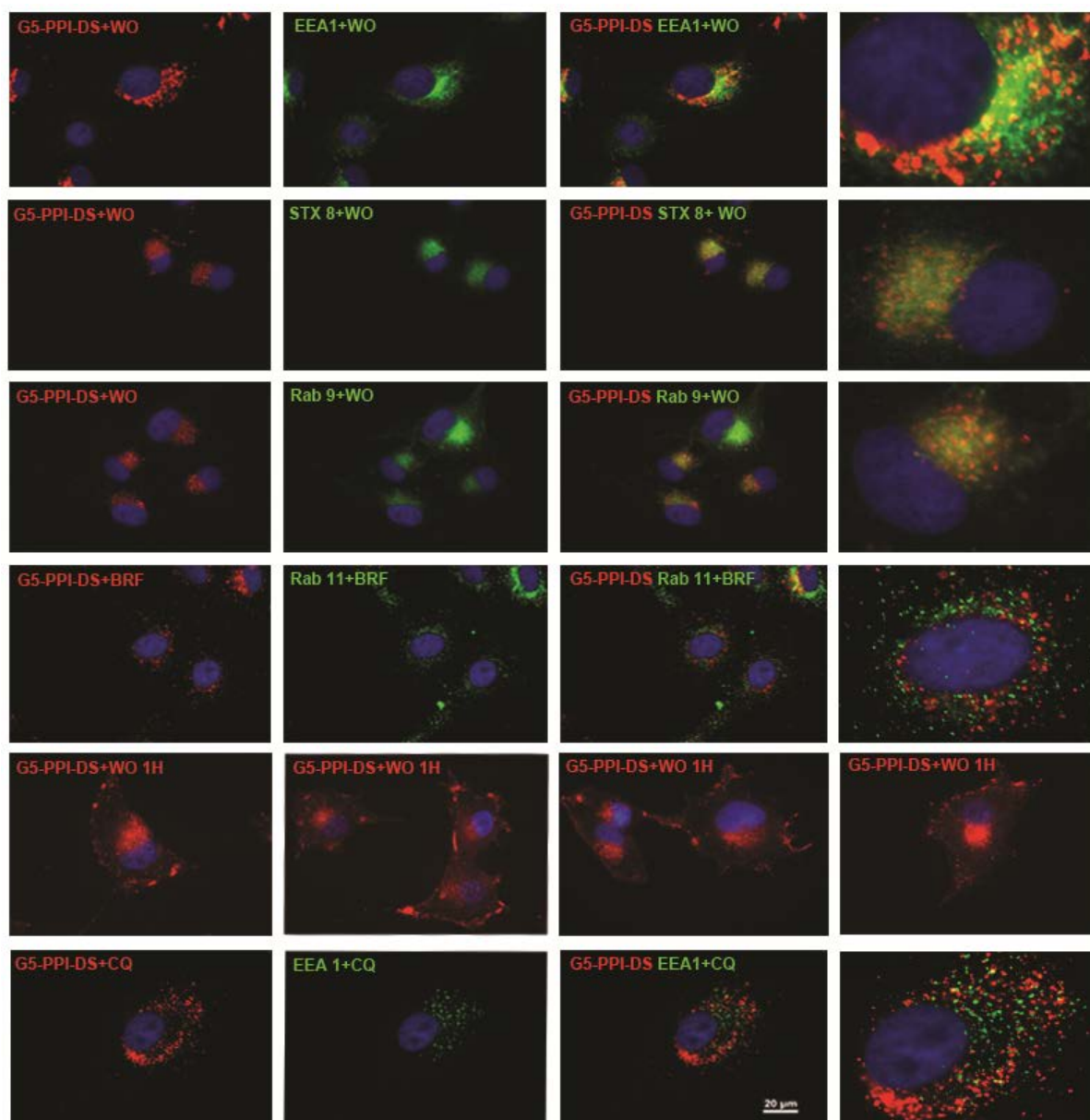


Figura 8. Caracterizarea structurilor pozitive pentru G5-PPI-DS în celulele de melanom metastatic SK28 în prezența inhibitorilor WO, BRF și CQ. Celulele au fost marcate timp de 1 h cu dendrimeri G5-PPI-DS conjugați cu rodamina B și monitorizate în mediu fără dendrimeri timp de 30 de minute sau 1 h acolo unde este indicat. Toate probele au fost fixate, permeabilizate și marcate cu anticorpi pentru markerii moleculari indicați și analizate prin microscopie de fluorescență. Figura adaptată cu permisiunea Bentham Science după Filimon et al., Internalization and intracellular trafficking of poly(propylene imine) glycodendrimers with maltose shell in melanoma cells, *Curr Med Chem* 2012, 19(29): 4955-68.

Bibliografie selectată

1. Choudhary S et al., Impact of Dendrimers on Solubility of Hydrophobic Drug Molecules, *Front Pharmacol.*, 2017, 8, 261.
2. Madaan K. et al., Dendrimers in Drug Delivery and Targeting: Drug-Dendrimer Interactions and Toxicity Issues, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2014, 6(3), 139-50.
3. Huang C-H and Tsourkas A, Gd-based macromolecules and nanoparticles as magnetic resonance contrast agents for molecular imaging, *Curr Top Med Chem*, 2013, 13(4), 411-21
4. Chen J. et al., Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics, *International Journal of Nanomedicine*, 2013, 8, 2677-88 .
5. Hare J. I. et al., Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017,108, 25-38.
6. Jiang G. et al., Formulation of temozolomide-loaded nanoparticles and their targeting potential to melanoma cells, *Oncology Reports*, 2016, 37(2), 995-1001.
7. Zhong Q. et al., Conjugation to Poly(amidoamine) Dendrimers and Pulmonary Delivery Reduce Cardiac Accumulation and Enhance Antitumor Activity of Doxorubicin in Lung Metastasis, *Mol Pharm*, 2016, 13(7), 2363-2375.
8. Meier F. et al., Combined targeting of MAPK and AKT signalling pathways is a promising strategy for melanoma treatment, *British J. Dermatol*, 2007,156, 1204-1213.
9. des Rieux A et al., Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach, *J Control Release*, 2006; 116:(1)-27.
10. Harush-Frenkel O et al., Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells, *Biomacromolecules*, 2008; 9(2): 435-443.
11. Nan A et al., Cellular uptake and cytotoxicity of silica nanotubes. *Nano Lett.* 2008; 8(8):2150–2154.
12. Ilina P et al., Genetic block of endocytic pathways reveals differences in the intracellular processing of non-viral gene delivery systems. *J Control Release.* 2012; 163(3):385–395.
13. Nakashima H et al., Overexpression of caveolin-1in a human melanoma cell line results in dispersion of ganglioside GD3 from lipid rafts and alteration of leading edges leading to attenuation of malignant properties, *Cancer Sci*, 2001, 98, 512-520.
14. Robertson A. S. et al, Functions of actin in endocytosis, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, 66: 2049-2065.

15. Iversen, T.-G. et al., Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies, *Nano Today*, 2011, 6, 176-785.
16. Prekeris R. et al, Differential role of syntaxin 7 and syntaxin 8 in endosomal trafficking, *Mol Biol Cell*, 1999,10, 3891-3908.
17. Dorick P. et al., Circular ruffle formation and closure lead to micropinocytosis in hepatocyte growth factor/scatter factor-treated cells, *Eur. J. Cell. Biol*, 1993, 61, 44-53.
18. Lawe D.C. et al, The FIVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3 phosphate and rab5 binding, *J. Biol Chem*, 2000, 275, 3699-3705.
19. Chen X et al., Regulation of epidermal growth factor receptor endocytosis by wortmannin through activation of Rab5 rather than inhibition of phosphatidyl 3-kinase, *EMBO Reports*, 2001,2, 842-849
20. Robineau S et al., Binding site of Brefeldin A at the interface between the small G protein ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) and the nucleotide-exchange factor Sec7 domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 9913-9918.
21. Sonnichsen B. et al, distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of rab5, rab4 and rab11, *J. Cell. Biol.*, 2001,148, 901-913
22. Hillaireau H et. Al, Nanocarriers entry into the cell: relevance to drug delivery, *Cell.Mol. Life Sci.*, 2009, 66, 2873-2896.
23. Falcone S. et al, Macropinocytosis regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events *J. Cell. Sci*, 2006, 119, 4758-4769.
24. Araki N. et al., Effect of 3-methyl adenine on the fusion process of macropinosomes in EGF-stimulated A431 cells, *Cell Struct. Funct.*, 2006,31,145-157.
25. Chapman R.E et al., Retrieval of TGN proteins from the cell surface requires endosomal acidification. *EMBO J.*, 1994, 13, 2305-2312.

Mulțumiri

- Dr. Ștefana Petrescu pentru coordonarea tezei de doctorat
- Dr. Gabriela Negoiu pentru îndrumarea extinsă în realizarea celor două studii ce stau la baza acestei teze de doctorat
- Dr. Sabina Zurac pentru furnizare secțiunilor de melanom necesare studiului, evaluarea caracteristicilor anatomo-patologice ale leziunilor melanocitice și împărțirea expertizei în domeniul diagnosticului și prognosticului în melanom

- Dr.Simona Ghenea pentru îndrumarea în realizarea planului experimental necesar clonării și expresiei DCT::6 His recombinantă utilizată pentru obținerea anticorpilor policlonali anti DCT
- Dr.Adina Milac pentru predicția situsurilor antigenice din structura regiunii luminale a DCT.
- Dr.Livia Sima pentru determinarea nivelului de DCT mRNA în linii celulare de melanom și împartașirea expertizei în citometrie în flux.
- Tehnician Emilia Ardelean pentru procedurile de imunizare a animalelor și recoltarea sângelui în etapele de obținere a serului policlonal anti hDCT
- Tuturor colegilor din Institutul de Biochimie pentru sprijinul acordat de-a lungul anilor

Lista de publicații și brevete

Publicații

1. Filimon, A., Zurac, S.A., Milac, A.L., Sima, L.E., Petrescu, S.M., G.Negroiu, **Value of dopachrome tautomerase detection in the assessment of melanocytic tumors** *Melanoma Research*, **24 (3): 219-236 (2014) IF 2.28**
2. Filimon A.; Sima, L. E.; Appelhans, D.Voit B, Negroiu G **Internalization and Intracellular Trafficking of Poly(propylene imine) Glycodendrimers with Maltose Shell in Melanoma Cells** , *Current Medicinal Chemistry*, 19(29):4955-4968 (2012) **4.07**
3. Filimon A., Negroiu G **Dopachrometautomerase: An old protein with new function** *Romanian Journal of Biochemistry*, **299: 36-52 (2009)**

Brevet

Polyclonal Antiserum anti-human Dopachromtautomerase

Patent Assignee Name(s) and Code(s):Institutul de Biochimie, Bucharest

Patent Number(s): 123570

Data de eliberare : 30.10.2013

Inventor(s): Negroiu G, Filimon A., Ghenea S, Zurac S, Staniceanu F, Sima E-L, Petrescu SM