
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Profilul unor citokine și molecule de adeziune celulară în tumori maligne colorectale

Doctorand **Ovidiu Farc**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Victor Cristea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Cuprins:

Introducere.

Stadiul actual al cunoștințelor.

1. Biologia intestinului gros.
2. Cancerul colorectal-generalități.
3. Biologia cancerului colorectal.

Contribuția personală

1. Studiul 1-Un rol potențial al citokinelor și moleculelor de adeziune celulară în diagnosticul non-invaziv al cancerului colorectal
2. Studiul 2-Caracterizarea răspunsului imun prin profilul citokinelor și analiză corelațională în tumori maligne colorectale.
3. Studiul 3-Interferențe ale biologiei rețelelor în studiul răspunsului imun în cancerul colorectal.
4. Studiul 4-Un grup de microARN-uri oncosupresoare se modifică în mod coordonat în cancerul colic.
5. Studiul 5-Corelații genom-micromediu în biologia tumorilor maligne colorectale.
6. Discuții generale.
7. Concluzii generale (sinteză).
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei.

Referințe.

Anexe.

Cuvinte cheie: citokine; molecule de adeziune; biomarker; rețele; genom; coerență

Introducere

Cancerul colorectal (CCR), boală cu o incidență în creștere, ocupă în prezent locul 3 ca frecvență și locul 2 ca mortalitate între cancere. Modalitățile actuale de diagnostic sunt reprezentate de metode non-invazive de screening ca testele FOB (fecal occult blood test), FIT (fecal immunochemical test), markerii tumorali serici sau colonoscopia. Terapia actuală este întâi de toate chirurgicală, dar și prin alte modalități ca radioterapia, chimioterapia sau terapii mai noi imunologice sau moleculare.

Având în vedere invazivitatea, costurile sau sensibilitatea scăzută a unora din metodele de diagnostic amintite mai sus, s-au căutat metode noi, în același timp non-invazive și sensibile, de diagnostic precoce. Între acestea se înscrie determinarea nivelelor serice ale unor citokine sau molecule de adeziune, crescute ca urmare a inflamației ce însoțește tumora sau determinarea nivelului în țesut sau ser al unor molecule de tipul micro-ARN-urilor, care își modifică profilul datorită dezvoltării procesului tumoral.

În același timp, în patologia tumorală colorectală și nu numai, sunt tot mai frecvente abordările de tip "network approaches" (network-rețea), care oferă o perspectivă integrată asupra fenomenului neoplazic și dau posibilitatea unor strategii complexe de diagnostic și tratament.

Lucrarea prezintă abordează cancerul colorectal din această perspectivă, considerând tumora malignă ca un sistem de corelații complexe între celulele tumorale, cele imune sau non-imune aflate în tumori, relații desfășurate prin intermediul unei rețele extrem de complicate de mediatori solubili (citokine, chemokine, factori de creștere), exosomal sau de contact direct între celule prin moleculele de adeziune celulară. Sunt examinate aceste rețele complexe, căutându-se o înțelegere cât mai coerentă și logică a fenomenelor, în același timp fiind studiate și anumite aplicații în domeniul biomarkerilor sau al strategiilor de abordare terapeutică.

1. Stadiul actual al cunoștințelor

Cauzat de un complex de factori, atât genetici cât și de mediu, cancerul colorectal este produs printr-o serie de mecanisme moleculare, cele mai importante fiind instabilitatea cromozomială, instabilitatea microsatelitară cu deficiența enzimelor reparatorii ADN și fenotipul metilator al insulelor CpG. Ca și în alte tumori, instalarea stării de hiperproliferație malignă este asociată prezenței unor mutații în genele proto-oncogene și în cele supresoare tumorale. O diversitate de subtipuri moleculare au fost identificate în CCR, grupate în cele din urmă în 4 subtipuri de consens molecular (CMS 1-4); acestea sunt asociate cu tipare distincte de infiltrație imună.

În afara celulelor neoplazice, tumorile conțin și unele celule accesorii (fibroblaste, adipocite, celule mezenchimale), vase sanguine și structuri fibrilare, recrutate în scopul nutriției, susținerii și facilitării creșterii. Peste acestea se suprapun elemente ale sistemului imun. Toate acestea sunt conectate printr-o rețea extrem de complexă de mediatori solubili (citokine, chemokine sau factori de creștere), exosomi sau prin contact direct cu ajutorul moleculor de adeziune celulară, cu care împreună alcătuiesc micromediul tumorilor maligne.

Interleukinele (IL) sunt proteine mici cu rol de comunicare în sistemul imun, între acesta și restul țesuturilor sau în unele procese fiziologice precum dezvoltarea embrionară sau biologia unor țesuturi. Rolul lor în cancer este eterogen, unele fiind predominant antitumorale, creșterea nivelului lor fiind asociată cu prognostic mai bun (spre exemplu IL-2, IL-12, IL-15, IL-24, IL-25, IL-27, interferon-gamma), iar altele având un efect predominant protumoral - cum este cazul IL inflamatorii IL-1 β , IL-6, TNF α sau citokinelor Th17-IL-23, IL-17, IL-22, IL-26.

Moleculele de adeziune celulară în CCR. Există câteva clase de molecule de adeziune, între care selectine sau molecule aparținând superfamiliei de imunglobuline. Acestea au un rol complex în cancer, și contribuie atât la defensive imună, cât și la metastazarea celulelor tumorale, ceea ce explică rezultatele uneori contradictorii în ceea ce privește valoarea lor prognostică.

Metaloproteinazele de matrice extracelulară (MMP), între care MMP-7, sunt produse în cadrul procesului de dezvoltare tumorală, creșterea nivelului lor fiind în general asociată cu un prognostic nefavorabil.

În evoluția tumorilor, datorită apariției neo-antigenelor sau semnalelor de detresă venite de la celulele tumorale, se dezvoltă infiltrate cu compoziție și mărime variabilă, a căror prezență și amploare s-a dovedit importantă în determinarea prognosticului pacienților. În cadrul acestora, fiecare tip de celulă (subset imun) poartă o valoare prognostică, examinată în numeroase studii. Un număr dintre acestea abordează infiltratele tumorale dintr-o perspectivă retelistică, considerând celulele componente ale tumorii ca un sistem complex de corelații ale căror caracteristici sunt analizate. Din acest punct de vedere, infiltrația imună în tumori poate fi descrisă ca o rețea deoarece are sisteme de augmentare, de recrutare a altor elemente compatibile, de comunicare între module și de feed-back negativ sau pozitiv.

Au existat și abordări care au studiat aspectul funcțional al acestor infiltrate, reprezentat de nivelul seric sau tisular al citokinelor specifice fiecărui subset imun, dacă se consideră aceste niveluri serice ca o reflexie a proceselor complexe care au loc în micromediul tumorilor maligne. În acest curent de gândire se înscrie și această lucrare.

În cadrul numeroaselor studii care au avut ca obiect investigarea răspunsului imun în tumori, incluzând cauzele care determină situația existentă, s-a constatat că în afara factorilor care țin de sistemul imun, există un program imunosupresiv, care pornește de la celula tumorală, continuă cu celulele asociate acesteia, și influențează semnificativ răspunsul imun în tumori. Prin urmare, considerăm că în cadrul strategiilor de optimizare a abordărilor imunoterapice ar trebui să se țină cont și de acest factor. Într-un astfel de context, lucrarea prezintă dedică un capitol studiului genomului tumoral, la nivelul său de reglaj prin ARN-uri non-codante.

2. Contribuția personală

Studiul 1. Un potențial rol al citokinelor și moleculelor de adeziune celulară în diagnosticul non-invaziv al cancerului colorectal

Introducere. Cancerul colorectal (CRC) rămâne o cauză majoră a mortalității prin cancer. În consecință, sunt investigate noi abordări diagnostice și terapeutice, care includ și nivelurile serice de citokine și alte molecule; rezultatele sunt adesea neconcludente. Prin urmare, în studiul prezent ne-am propus să determinăm dacă nivelul seric al citokinelor, al moleculelor de adeziune celulară sau al metaloproteinazelor matriceale (MMP), singure sau în combinații, poate contribui la diagnosticul neinvaziv al CRC.

Materiale, metode. Este un studiu observational, caz-martor, în care nivelurile serice ale nouă citokine [IL; IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-22 și IL-33 și interferonul (IFN)- γ], două molecule de adeziune celulară (ICAM-1 și P-selectina) și o metaloproteinază de matrice extracelulară (MMP-7) au fost măsurate prin ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) la 33 de pacienți cu CRC și 35 de martori sănătoși. Moleculele și combinațiile de molecule au fost testate pentru toate stadiile și gradele tumorii.

Studiul a fost aprobat de comisiile de etică ale IRGH Cluj-Napoca,(nr. 2769/1.03.2018) și Universității de Medicină și Farmacie Iuliu Hatieganu din Cluj-Napoca,Romania (nr. 40/02.04.2018).

Analiza semnificației statistice a diferențelor dintre nivelele serice ale moleculelor la pacienți și martori s-a făcut cu ajutorul testului Student (t)pentru eșantioane independente în cazul datelor normal distribuite, respectiv cu ajutorul testului Wilcoxon (sum-rank) pentru date cu distribuție non-normală. Analiza diferențelor nivelului moleculelor în diferite stadii sau grade s-a făcut utilizând testul ANOVA (analiza varianței) pentru datele normal distribuite și testul Kruskal-Wallis pentru date continue non-normal distribuite.

Pentru a investiga potențialul unor combinații de molecule de a discrimina între pacienții cu CCR și sănătoși, s-a efectuat regresie logistică. Curbele ROC (Receiver operating characteristic) au fost generate cu ajutorul programului XLstat (Addinsoft, New York,SUA). Toate celelalte analize statistice au fost efectuate utilizând programul freeware R, versiunea 4.1.10.

Rezultate. O creștere semnificativă a nivelului seric a fost observată în cazul IL-8 la pacienți în comparație cu subiecții sănătoși; S-a constatat de asemenea o scădere a IL-10 la pacienți. A fost testat potențialul de biomarker al fiecărei molecule modificate semnificativ: IL-8 a avut o sensibilitate(Sn) de 0,865, o specificitate (Sp) de 0,600 și o zonă sub curbă (ASC) de 0,777; pentru IL-10, sensibilitatea a fost 0,65, specificitatea a fost 0,69, cu o ASC de 0,689.

Regresia logistică a determinat cel mai bun potențial discriminativ între pacienți și grupul de control pentru combinația IL-4 + IL-6 + IL-8 + IFN- γ , cu o sensibilitate de 0,97 și o specificitate de 0,58.

Pentru stadiile incipiente ale CRC, combinația IL-6 + IL-8 + IL-22 a prezentat o performanță bună., cu Sn 0,85, Sp 0,89 și ASC de 0,927.

Concluzii.

1.-IL-8 crescută are calitatea de biomarker în CCR.

2-Combinațiile de molecule au potențial discriminativ superior față de utilizarea unei singure molecule; astfel combinațiile IL4+ IL6+ IL8+ IFN γ , IL4 + IL6 + IL8, IL6 + IL8 și IL4 + IL8 au potențial bun de biomarker, cea mai performantă fiind prima combinație, cu 4 citokine; și celelalte însă sunt opțiuni bune pentru clinician.

3- Combinația IL6-IL8-IL22 a demonstrat un bun potențial discriminativ pentru stadiul precoce al bolii (stadiul I).

4-Ceea ce face dificilă găsirea de biomarkeri în CCR este heterogenitatea infiltrației imune în tumori, cauzată la rândul ei de o heterogenitate a mecanismelor moleculare în CCR, și are ca rezultat o variabilitate a expresiei serice a nivelului de citokine. Prin urmare, pentru a găsi biomarkeri cu valoare generală s-ar putea utiliza următoarele strategii: să se aleagă citokine care să acopere toate patternurile posibile, ca de exemplu IL6-IL8-IL4-IFN γ , sau IL6-IL8 pentru patternurile cu inflamație; o altă opțiune este să se folosească molecule ale căror nivel a fost găsit constant crescut în CCR (IL-8, IL-6, sau, în alte studii, IL-4, IL-7 sau IL-9).

Studiul 2. Caracterizarea răspunsului imun prin profilul citokinelor și analiză corelațională în cancerul colorectal

Introducere. Interleukinele și moleculele de adeziune celulară au fost studiate intens pentru rolul lor potențial ca biomarkeri în cancerul colorectal (CRC). Există însă o rețea relațională complexă în micromediul tumoral și în răspunsul imun al tumorilor colorectale; prin urmare, este nevoie de abordări complexe în biologia citokinelor în CRC, care să reflecte complexitatea acestui domeniu de biologie tumorală. Prezentul studiu răspunde unei astfel de necesități prin investigarea comportamentului unor citokine reprezentative pentru principalele rețele imunitare din imunologia CRC.

Materiale, metode. Au fost înrolați în studiu treizeci și trei de pacienți cu CCR confirmat și 35 martori sănătoși, loturi cu structură apropiată ca vârstă și sex. Nivelele serice ale nouă interleukine - IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, IL-22, IL-33, IFN(interferon)- γ , două molecule de adeziune celulară - ICAM-1 și P-sel (P-selectină)- și o metaloproteinază de matrice extracelulară (MMP-7) au fost măsurate la pacienți și martori prin metoda ELISA. Rezultatele au fost prelucrate pentru a găsi molecule cu comportament corelat și pentru a descifra tiparele de organizare a modulelor de răspuns imun.

Corelațiile dintre nivelele serice ale diferitelor molecule au fost testate utilizând coeficienți de corelație, după cum urmează: în situațiile în care s-a înregistrat normalitate bivariată, s-a utilizat coeficientul de corelație r al lui Pearson; acolo unde nu a fost înregistrată această situație, s-a utilizat coeficientul de corelație Spearman (ρ). S-au construit matrice de corelații bazate pe coeficienții calculați. Valoarea $p < 0.05$ a fost considerată semnificativă.

Toate analizele statistice au fost efectuate cu programul *R*, versiunea 4.1.0.

Rezultate. Studiul nivelelor serice a evidențiat un răspuns imun divers, cu modificări ale moleculelor aparținând de numeroase subseturi imune, dar de mică amplitudine. Analiza pe stadii a arătat creșterea moleculelor inflamatorii cu stadiul tumoral, în timp ce citokinele aparținând subseturilor adaptative nu au avut această evoluție.

Studiul corelațiilor între molecule a evidențiat diferențe semnificative la pacienți, cu constituirea unui sistem de corelații mult mai bine dezvoltat; analiza acestui sistem pune în evidență un anumit tipar de compartimentalizare în răspunsul imun, cu corelații între moleculele inflamatorii sau între acestea și moleculele ale diferitelor subseturi Th (adaptative), între acestea din urmă fiind evidențiabile mult mai puține corelații.

Analiza corelațiilor în diferite stadii și grade a pus în evidență caracterul dinamic al acestui sistem de corelații, care se poate modifica în funcție de parametrii amintiți.

Discuții. Studiul prezent consideră nivelele serice ale moleculelor ca reflexii ale proceselor deosebit de complexe care au loc în micromediul tumorilor maligne colorectale. În acest sens, profilul modificărilor indică un răspuns imun divers, multimodal, dar de mică amplitudine, stare cauzată cel mai probabil de antigenicitatea redusă a acestor tumori. Evoluția cu stadiul tumorilor arată o creștere a componentei inflamatorii a răspunsului imun pe măsură ce tumora se dezvoltă.

Concluzii. Deși creșterile IL sunt de mică amplitudine, sistemul de corelații are o configurație complet diferită la pacienți, ceea ce duce la concluzia că activarea sistemului imun implică nu doar creșteri ale citokinelor specifice, ci și constituirea unor conexiuni complet diferite între elemente.

Aceste corelații dau indicații despre felul în care se conectează diferitele elemente ale sistemului imun în cadrul executării funcției imune.

Am evidențiat ca și corelații mai importante:

- 1-la pacienți: ICAM-1 a corelat pozitiv cu IFN γ , IL-33 și P-selectina;
- 2-IFN γ a fost de asemenea corelat cu IL-4 la pacienți;
- 3-IL-1 β a prezentat corelații pozitive cu IL-4 și IL-22;
- 4-la martori a existat o corelație între IL-22 și IL-33; în schimb la pacienți este prezentă o corelație pozitivă a IL-22 cu IL-1 β .

Studiul 3. Interferențe ale biologiei rețelilor în studiul răspunsului imun în cancerul colorectal

Introducere. Cancerul colorectal (CRC) este una dintre tumorile cu o componentă inflamatorie dominantă. Un volum impresionant de cercetări s-a concentrat pe potențialele aplicații diagnostice sau terapeutice a moleculelor (citokine, molecule de adeziune, altele) care își modifică expresia în cadrul inflamației din tumori. Studii recente au arătat că aceste molecule stabilesc relații complexe (rețele de citokine) în biologia tumorii. În acest context, studiul prezent a avut două obiective: evidențierea existenței unor grupări funcționale în răspunsul imun, precum și a unei organizări ierarhice în răspunsul imun.

Materiale, metode. S-a utilizat lotul de pacienți și martori din studiul precedent. S-au determinat nivelele celor 12 molecule prin metoda ELISA. Pentru evidențierea unor grupări de molecule s-a utilizat analiza factorială. Pentru evidențierea existenței unui nivel superior de integrare în răspunsul imun s-a utilizat analiza factorială multi-nivel.

Rezultate. S-a arătat că există în răspunsul imun în CCR trei grupuri funcționale, una însumând subsetul Th17 și inflamația, alta rețeaua secretorie de interferon și adeziunea celulară, și o a treia, însumând elemente legate de secreția celulelor tumorale (IL-8, MMP-7); de asemenea există un număr de module independente, (Th2, Th2 și rețeaua supresivă, reflectată în nivelul IL-10). Studiul nu a evidențiat o organizare ierarhică de nivel superior în răspunsul imun.

Concluzii. 1. Unele subseturi imune în CCR se asociază în grupuri funcționale altele rămân ca elemente independente. Se pare că această asociere este o tendință, o caracteristică a răspunsului imun în tumorile colorectale și nu numai, deoarece a fost observată și în alte studii.

2. Din punct de vedere al optimalității, aceleași mențiuni ca în studiul 2, dar referitor la grupele amintite: unele pro-, altele antitumorale; situația este departe de a fi cea ideală.

3. terapeutic, ar trebui țintit fiecare asemenea grup, în funcție de cât este de crescut nivelul său particular;

4. În interpretarea acestor rezultate trebuie să se țină cont de diversitatea infiltrării imune în CCR, dependentă de alți factori ca alterațiile genomice, mecanismele moleculare sau imunosupresia din tumori. Acesta este al 2-lea studiu care arată o configurație similară a rețelilor în CCR, dar există o mare adaptabilitate a sistemului imun la o diversitate de stimuli, așa că, în funcție de combinația acestor factori, am putea avea nu doar un tipar unic de rețea, ci mai multe, și la fiecare să fie necesare abordări personalizate.

5. Asemănător studiului precedent, prezenta lucrare aduce contribuții la înțelegerea organizării răspunsului imun, oferind totodată perspectivele unor abordări strategice în imunoterapie. Studiul prezent analizează răspunsul imun la un nivel superior de integrare față de cel precedent.

6. Viitorul, credem, aparține abordărilor complexe, personalizate în biologia citokinelor și imunologia tumorală. Este un domeniu cu mare potențial de dezvoltare, având în vedere oportunitățile pe care le poate oferi în cunoașterea, diagnosticul și terapia patologiei tumorale colorectale.

Studiul 4. Un grup de micro-ARN-uri oncosupresoare se modifică în mod coordonat în cancerul colic

Introducere. În căutarea de răspunsuri și explicații cu privire la situația existentă în răspunsul imun în CCR, alături de factorii specifici sistemului imun (antigenicitate, stimuli inflamatori, adeziune vasculară, interleukine stimulante și polarizante) s-a arătat că în tumori există un factor suplimentar, care exercită un rol supresiv extrem de important asupra sistemului imun, aflându-se într-o poziție centrală în cadrul tuturor rețelilor și circuitelor din micromediul tumoral. Acest factor este activitatea supresivă a celulelor tumorale. Așadar, în următoarea parte a tezei am abordat domeniul biologiei celulei tumorale, considerând că de la acest domeniu se așteaptă răspunsuri nu doar în ceea ce privește stoparea programului neobosit de multiplicare a acestor celule, ci și o optimizare a abordărilor imunoterapice.

S-au luat în studiu un număr de 4 micro-ARN-uri (miR), molecule cu rol reglator în expresia mesajelor ARN elaborate în celule. Au fost selectate molecule cu roluri importante în proliferarea și diferențierea celulelor intestinale.

Micro-ARN miR-29a este situat pe exonul 2 al unui ARN lung non-codant (LOC646329), cu rol în proliferarea celulară; are în general un rol de reglaj negativ al ciclului celular.

miR-146a este un miR antiinflamator, imunosupresiv, în același timp favorizând caracterul stem în celula intestinală dar și exercitând o acțiune predominant inhibitorie asupra proliferării celulare.

miR-215 este sintetizat în cursul procesului de diferențiere intestinală sub acțiunea factorului specific intestinal CDX-1, dar și la distrugerile ADN sub acțiunea factorului p53. Țintele sunt la nivelul ciclului celular, acest miR având un rol în oprirea acestuia în situațiile menționate.

miR-449 este generat sub acțiunea factorului E2F1, având un rol de inhibare a țintelor acestuia în cadrul unui feed-back prin care este evitată o activare în exces a acestora sau este oprit ciclul celular.

Studiul pornește de la ipoteza unei coerențe existente în permanență în desfășurarea fenomenelor la nivel de semnalizare și transcripțional prin care este realizată proliferarea celulară, așteptându-ne prin urmare să găsim un comportament corelat și în cazul acestor molecule, care sunt parte a acestui mecanism. Aceasta ar putea avea importanță în elaborarea unor strategii de abordare a celulei tumorale.

Materiale, metode. Probele de țesut tumoral și normal adiacent au fost obținute de la 40 de pacienți cu CC. Studiul a fost aprobat de comisiile de etică ale IRGH Cluj-Napoca, (nr. 2769/1.03.2018), Spitalului județean de Urgență Sibiu (nr. 10759/23.05.2019) și Universității de Medicină și Farmacie Iuliu Hatieganu din Cluj-Napoca, România (nr. 40/02.04.2018).

S-a determinat prin analiză qRT-PCR nivelul de expresie tisulară a miR-29a, miR-146a, miR-215 și miR-449. S-a efectuat analiza bioinformatică ulterioară pentru a evidenția rețeaua factorilor de transcripție (TF) care reglează aceste miR și pentru a caracteriza funcțional această rețea.

Pentru amplificarea miRNA, s-a utilizat TaqMan Fast Advanced Master Mix. Analiza qRT-PCR a fost efectuată pe un analizor ViiA™ 7 (Applied Biosystems).

Analiza bioinformatică.

Pentru identificarea factorilor transcripționali cu influență asupra expresiei miARN, s-a utilizat instrumentul online TransMir (versiunea 2.0). Rețeaua de corelații între factorii transcripționali s-a construit cu ajutorul programelor Gene-Mania și Cytoscape. Nivelele de expresie tisulară a miRNA au fost calculate și comparate utilizând programul GraphPad Prism 6. Toate celelalte analize statistice au fost efectuate utilizând programul XLstat versiunea 2021.3.1, (Addinsoft).

Rezultate. Nivelele de expresie ale micro-ARN-urilor au fost scăzute în țesutul tumoral față de cel normal. Toate moleculele au avut corelații semnificative între ele, mai puternice însă s-au dovedit a fi cele din țesutul tumoral.

Deoarece se presupune că există corelații cunoscute între cele patru molecule care să explice un astfel de comportament, s-a căutat o explicație la nivelul sistemelor celulare care pot să contribuie la sinteza acestor miR. S-a efectuat o analiză a corelațiilor dintre factorii transcripționali care controlează cele patru molecule, evidențiindu-se legături puternice în rețeaua acestor factori. Analiza funcțională a acestei rețele a arătat module care aparțin în general ciclului celular și procesului de diferențiere, dar și altor procese conexe (metabolism, răspuns la hormoni, reacția la stress, transcripția în răspuns la stress).

Aceste date confirmă ipoteza inițială și demonstrează un caracter coerent al proceselor celulare în cadrul proliferării și diferențierii și se deschide posibilitatea unor strategii adresate acestui sistem, ca întreg. În final s-a elaborat un model care sumarizează și explică toate aceste date, în cadrul căruia coerența și interdependența între fenomene este atribuită succesiunii lor cauzale în cadrul ciclului celular.

Concluzii

1. Diferențele înalt semnificative în expresia miRNA între țesutul normal și cel tumoral contrastează cu lipsa unor diferențe semnificative între expresiile în diferite stadii, grade sau localizări tumorale. Aceasta sugerează un tipar de activare diferit în tumori comparativ cu țesutul normal, dar și o relativă omogenitate de mecanisme în tumori, indiferent de stadiul, gradul sau localizarea acestora.

2. Tendința miR-215 de a crește în tumori bine diferențiate (G1) este în concordanță cu contribuția acestuia la diferențierea intestinală.

3. O concluzie importantă a studiului este că aceste miR au avut o comportare corelată (Fig. 4.2), ceea ce confirmă ipoteza inițială.

4. Analiza rețelelor transcripționale care influențează cele 4 miARN a pus în evidență un sistem coerent, cu un grad ridicat de conectivitate intra- și inter-modul, asociat ciclului celular și unor procese conexe, oferind totodată și o explicație pentru corelațiile mi-ARN-urilor.

5. Aceste date pot implica posibile consecințe pe planul strategiilor terapeutice, întrucât un sistem cu un grad ridicat de integrare și interdependența componentelor poate fi subiectul unor abordări de strategie terapeutică coerentă.

Studiul 5. Relații genom - micromediul în biologia cancerului colorectal

Introducere. Deși în studiul genomului s-a evidențiat existența unei funcționări coerente, oglindite de corelațiile mult mai puternice decât în cazul IL, rețelele intracelulare de semnalizare și transcripționale care realizează diviziunea celulară sunt supuse și ele unor reglaje pozitive sau negative, care realizează o adaptare a acestei funcții la diferite situații din mediul celular. Celula tumorală este mai puțin sensibilă la aceste reglaje; totuși s-a arătat că acești stimuli, spre exemplu interleukinele, pot influența în ambele sensuri dezvoltarea tumorilor.

Studiul prezent își propune să determine dacă există corelații între genomul tumorilor colice, la nivelul său de reglaj prin micro-ARN-uri, și rețelele de citokine din microambientul celulelor tumorale. Credem că aceste date pot servi la elaborarea unor strategii de intervenție asupra genomului tumoral, utilizând respectivele conexiuni.

Material, metode. Lotul de pacienți cu tumori colice a fost același din studiul precedent. La un subgrup de 13 pacienți s-a efectuat analiza nivelului seric al unor citokine și molecule de adeziune prin metoda ELISA

Analiza q-RT-PCR pentru nivelele de expresie ale miR-29a, miR-146Aa, miR-215 și miR-449 s-a realizat după protocolul descris la studiul 4.

Analiza statistică. Analiza semnificației statistice s-a făcut cu ajutorul testului t în cazul datelor cu distribuție normală, respectiv cu ajutorul testului Mann-Whitney U pentru date cu distribuție non-normală, completat cu testul Dunn. Analiza corelațiilor dintre molecule s-a realizat prin calcularea coeficientului de corelație Spearman.

Calculul statistic și reprezentările grafice s-au făcut cu ajutorul programului XLstat versiunea 2021.3.1, (Addinsoft).

Rezultate. Au fost analizate corelațiile dintre miR și citokine, atât în cazul țesutului normal cât și în cazul celui tumoral.

În urma studiului au fost evidențiate următoarele corelații semnificative raportate la dinamica relațiilor dintre miR și IL, după cum urmează:

-între miR din țesutul sănătos și nivelul seric al citokinelor: miR-29a a corelat pozitiv atât cu IFN γ cât și cu IL-4; a existat o corelație pozitivă între miR-449 și IFN γ și una negativă între miR-449 și P-selectină

-între miR din țesutul tumoral și nivelul seric al moleculelor: corelații negative între miR-29a, miR-146a și IL-6; corelații negative între miR-215 și IL-22; corelații negative între miR-449 și MMP-7.

Citokinele și moleculele de adeziune celulară stabilesc corelații care reflectă activarea răspunsului imun (IL6-IL17-IL33, IL17-P-sel), asemănător cu cele evidențiate în studiul 2.

Tiparul rețelei corelaționale diferă în țesutul tumoral față de cel normal, fiind caracterizat de corelații predominant negative între miR și IL.

În concluzie, sistemul de corelații între miR și rețelele de citokine constituie una din conexiunile dintre genomul tumoral și micromediul tumorilor colorectale, care ar putea fi utilizate ca și o modalitate suplimentară de influențare a celulei transformate malign.

Discuții, concluzii generale

În încheierea tezei, se discută concluziile privitoare la tiparele de organizare în răspunsul imun, dar și în celula tumorală. Este evidențiat caracterul dinamic, fluiditatea și adaptabilitatea rețelelor imune, contrastând cu caracterul fix, riguros al celor intracelulare, prin care se realizează proliferarea celulară (domeniu unde nu sunt permise erori). Sunt prezentate concluzii despre posibilități de a influența această stare de lucruri, prin abordarea distinctă, dar integrată a celor două tipuri de rețele.

PHD THESIS ABSTRACT

The profile of a group of cytokines and cell adhesion molecules in colorectal malignant tumors

PhD student **Ovidiu Farc**

PhD Scientific Coordinator Prof.dr. **Victor Cristea**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Contents

Introduction.

Current state of knowledge.

1. Biology of the large intestine.
2. Colorectal cancer-molecular pathogenesis, pathology and clinical aspects.
3. Biology of colorectal cancer.

Personal contribution

- 1 Study 1-A potential role of cytokines and cell adhesion molecules in the non-invasive diagnosis of colorectal cancer
- 2 Study 2-Characterization of the immune response through cytokine profiling and correlational analysis in colorectal malignant tumors.
3. Study 3-Towards a network approach in the study of the immune response in colorectal cancer.
4. Study 4-A group of tumor suppressive microRNAs changes expression coordinately in colon cancer.
5. Study 5-Genome-microenvironment correlations in the biology of malignant colorectal tumors.
6. General discussions.
7. General conclusions (synthesis).
8. The originality and innovative contributions of the thesis.

References.

Appendices.

Keywords: cytokines; adhesion molecules; biomarker; network; genome; coherence.

Introduction

Colorectal cancer (CRC), a disease with an increasing incidence, currently ranks third in frequency and second in mortality among cancers. Current diagnostic methods are represented by non-invasive screening methods such as FOB (fecal occult blood test), FIT (fecal immunochemical test), serum tumor markers or colonoscopy. The current therapy is first of all surgical, but also through other modalities such as radiotherapy, chemotherapy or newer immunological or molecular therapies.

Considering the invasiveness, costs or low sensitivity of some of the diagnostic methods mentioned above, new and at the same time less invasive and more sensitive methods of early diagnosis have been sought. These include the determination of the serum levels of some cytokines or adhesion molecules, which increase as a result of the inflammation that accompanies tumors, or the tissue or serum levels of molecules such as micro-RNAs, which change their profile as a result of the development of the tumoral process.

In the meantime, in colorectal tumor pathology and not only, "network approaches" are increasingly common, offering an integrated perspective on the neoplastic phenomenon, as well as the possibility of complex diagnostic and treatment strategies.

The present work approaches colorectal cancer from this perspective, considering the malignant tumor as a system of complex correlations between tumor cells, immune or non-immune cells found in tumors, relations which take place through an extremely complicated network of soluble mediators (cytokines, chemokines, growth factors), exosomal or through direct contact through cell adhesion molecules. These complex networks are analyzed, seeking a coherent and logical approach to the phenomena, while in the meantime biomarkers or therapeutic applications are also studied.

1. The current state of knowledge

Caused by a complex of factors, both genetic and environmental, colorectal cancer is produced through a few molecular mechanisms, the most important being chromosomal instability, microsatellite instability with deficiency of DNA repair enzymes and the CpG islands methylation phenotype. As in other tumors, the establishment of the state of malignant hyperproliferation is associated with the presence of mutations in proto-oncogene and tumor suppressor genes. A diversity of molecular subtypes have been identified in CRC, which ultimately group into 4 molecular consensus subtypes (CMS 1-4); these are associated with distinct patterns of immune infiltration.

Apart from the neoplastic cells, tumors also contain some accessory cells (fibroblasts, adipocytes, mesenchymal cells), blood vessels and fibrillar structures, recruited for the purpose of nutrition and support of the tumor growth. Alongside with these elements, there is an immune infiltration in tumors, which acts as an antitumor defense. These elements are connected through an extremely complicated network of soluble mediators (cytokines, chemokines or growth factors), exosomes or through direct contact through cell adhesion molecules, forming together what was called the tumor microenvironment.

Interleukins (ILs) are small proteins with role in the communication in the immune system, between it and other tissues or in physiological processes such as embryonic development or the biology of tissues. Their role in cancer is heterogeneous, some of them being predominantly antitumoral, their increase being associated with favorable prognosis (for example IL-2, IL-12, IL-15, IL-24, IL-25, IL-27, interferon- gamma), and others being mostly protumoral- this is the case of inflammatory IL 1 β ,6, TNF α , or Th17 cytokines-IL-23, IL-17, IL-22 and IL-26.

Cell adhesion molecules in CRC. There are several classes of adhesion molecules, including selectins or molecules of the immunoglobulin superfamily. They have a complex role in cancer, contributing both to immune defense and tumor cell metastasis, explaining the contradictory results regarding their prognostic value.

Matrix metalloproteinases (MMP), such as MMP-7, are produced in the process of tumor development, the increase in their level being generally associated with an unfavorable prognosis.

In the evolution of tumors, due to the apparition of neo-antigens or distress signals from tumor cells, infiltrates with variable composition and size develop, whose presence and extent have proven important for the prognosis of patients. Within them, each cell type carries a prognostic value, evaluated in numerous studies. Some of these approach tumor infiltrates from a network perspective, considering the cells that compose tumors as a complex system of correlations whose characteristics are analyzed. From this point of view, immune infiltration in tumors can be described as a network, because it has systems of augmentation, recruitment of other compatible elements, communication between modules and negative or positive feedback loops.

There were also approaches that studied the functional aspect of these infiltrates, represented by the serum or tissue level of cytokines specific to each immune subset. These approaches consider cytokines serum levels as a reflection of the complex processes that take place in the microenvironment of malignant tumors. The present work approaches tumor from this perspective.

From the numerous studies that had as object the investigation of the immune response in tumors, including the causes that determine the existing situation, it was found that besides the factors related to the immune system, there is an immunosuppressive program, which starts from the tumor cell, continues with its associated cells, and significantly influences the immune response in tumors. Therefore, we believe that strategies to optimize immunotherapeutic approaches should also take this factor into account. In this context, the present thesis dedicates a chapter to the study of the tumor genome, at its level of regulation by non-coding RNAs.

2. The personal contribution

Study 1. A role for cytokines and cell adhesion molecules in the non-invasive diagnosis of colorectal cancer

Introduction. Colorectal cancer (CRC) remains a major cause of cancer mortality. Consequently, new diagnostic and therapeutic approaches are being investigated, including serum levels of cytokines and other molecules; the results are often inconclusive. Therefore, in the present study we aimed to determine whether the serum level of cytokines, cell adhesion molecules or matrix metalloproteinases (MMPs), alone or in combination, can contribute to the non-invasive diagnosis of CRC.

Materials, methods. Serum levels of nine cytokines (IL; IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-22 and IL-33 and interferon - γ), two cell adhesion molecules (ICAM-1 and P-selectin) and an extracellular matrix metalloproteinase (MMP-7) were measured by ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) in 33 CRC patients and 35 healthy controls. The patients were treated in the Surgical Clinic of the Regional Gastroenterology and Hepatology Institute between March 2019 and March 2020. Molecules and combinations of molecules were tested for all tumor stages and grades. The results were read on a Biotek Synergy H1 Hybrid microplate analyzer using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) as software.

The study was approved by the ethics committees of IRGH Cluj-Napoca, (no. 2769/1.03.2018) and the University of Medicine and Pharmacy Iuliu Hatieganu from Cluj-Napoca, Romania (no. 40/02.04.2018).

The analysis of the statistical significance of the differences between the serum levels of the molecules in patients and controls was done using the Student (t) test for independent samples in the case of normally distributed data, respectively using the Wilcoxon (sum-rank) test for non-normally distributed data. Analysis of differences in the level of molecules in different stages or grades was done using the ANOVA (analysis of variance) test for normally distributed data and the Kruskal-Wallis test for non-normally distributed continuous data.

To investigate the potential of certain combinations of molecules to discriminate between CRC and healthy patients, logistic regression was performed. ROC (Receiver operating characteristic) curves were generated using the XLstat program (Addinsoft). All other statistical analyzes were performed using the freeware program R, version 4.1.10.

Results. A significant increase was observed in IL-8 in patients compared to healthy subjects. A decrease in IL-10 was also found in patients. The biomarker potential of each significantly modified molecule was tested: IL-8 had a sensitivity of 0.865, a specificity of 0.600, and an area under the curve (AUC) of 0.777; for IL-10, sensitivity was 0.65, specificity was 0.69, with an AUC of 0.689.

Logistic regression determined the best discriminatory potential between patients and controls for the combination of IL-4 + IL-6 + IL-8 + IFN- γ , with a sensitivity of 0.97 and a specificity of 0.62.

For early stages of CRC, the combination of IL-6 + IL-8 + IL-22 showed good performance.

Conclusions.

1.-Increased IL-8 has biomarker capacity in CRC.

2-Combinations of molecules have superior discriminative potential compared to single molecules; the combinations IL4+ IL6+ IL8+ IFN γ , IL4 + IL6 + IL8, IL6 + IL8 and IL4 + IL8 have good biomarker potential, the best performing being the first combination, with 4 cytokines; the others are also options for the clinician.

3- The IL6-IL8-IL22 combination demonstrated a good discriminatory potential for the early stage of the disease (stage I).

4-What makes it difficult to find biomarkers in CRC is the heterogeneity of immune infiltration in tumors, caused by a heterogeneity of molecular mechanisms in CRC, leading in turn to a variability of its serum expression-cytokine level. By consequence, to find general biomarkers the following strategies could be used: to choose cytokines that cover all possible patterns, such as IL6-IL8-IL4-IFN γ , or IL6-IL8 for patterns with inflammation; another option is to use molecules which have been constantly found elevated in CRC (IL-8, IL-6, or, in other studies, IL-4, IL-7, or IL-9).

Study 2. Characterization of the immune response through cytokine profiling and correlation analysis in colorectal malignant tumors.

Introduction. Interleukins and cell adhesion molecules have been intensively studied for their potential role as biomarkers in colorectal cancer (CRC). However, there is a complex relational network in the tumor microenvironment and in the immune response of colorectal tumors; therefore, complex approaches are needed in cytokine biology in CRC, reflecting the complexity of this tumor biology field. The present study addresses this problem by investigating the behavior of cytokines representative of the main immune networks in CRC immunology.

Materials, methods. Thirty-three patients with confirmed CRC and 35 healthy controls were enrolled in the study; the two groups were age and sex-matched. Serum levels of nine interleukins - IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, IL-22, IL-33, IFN(interferon)- γ , two cell adhesion molecules -ICAM-1 and P-sel (P-selectin)- and an extracellular matrix metalloproteinase (MMP-7) were measured in patients and controls by the ELISA method. The results were processed to find molecules with correlated behavior and to decipher the patterns of organization of immune response modules.

Correlations between serum levels of molecules were tested using correlation coefficients as follows: where bivariate normality was recorded, Pearson's r correlation coefficient was used; where this was not the case, Spearman correlation coefficient (ρ) was used. Correlation matrices were constructed based on the calculated coefficients. The p value < 0.05 was considered significant.

All statistical analyzes were performed with the R program, version 4.1.0.

Results. The study of serum levels revealed a diverse immune response, with changes in molecules belonging to numerous immune subsets, but of small amplitude. Analysis by stages showed the increase of inflammatory molecules with the tumor stage, while the cytokines of the adaptive system did not have this evolution. The study of correlations between molecules revealed significant differences in patients, with the constitution of a much more developed system of correlations; the analysis of this system highlights a certain pattern of compartmentalization in the immune response, with correlations between inflammatory molecules or between them and molecules of different Th (adaptive) subsets, with much less correlation between the latter.

The analysis of correlations in different stages and grades highlighted the dynamic nature of this system of correlations, changing according to the mentioned parameters.

Discussions. The present study considers serum levels of molecules as reflections of the complex processes occurring in the microenvironment of colorectal malignancies. In this sense, the profile of the increases indicates a diverse, multimodal, but low-amplitude immune response, a state most likely caused by the reduced antigenicity of these tumors. The stage-related behavior shows an increase in the inflammatory component of the immune response with stage, as well as a lack of increase in adaptive system molecules (presumably reflecting a decrease in the proportion of these subsets with tumor development).

The completely different system of correlations in patients is most likely caused by the activation of the immune response in tumors, while the dynamic nature of the correlation network according to grade and stage is most likely the expression of the adaptability and functional plasticity of the immune system.

Conclusions. Although ILs increases are of small amplitude, the system of correlations has a completely different configuration in patients, which leads to the conclusion that the activation of the immune system involves not only increases in specific cytokines, but also the establishment of completely different connections between elements.

These correlations give clues about how the various elements of the immune system connect to perform the immune function.

I highlighted as more important correlations:

1-in patients: ICAM-1 positively correlated with IFN γ , IL-33 and P-selectin;

2-IFN γ was also correlated with IL-4 in patients;

3-IL-1 β showed positive correlations with IL-4 and IL-22;

4-in controls there was a correlation between IL-22 and IL-33; this disappeared in patients, being replaced by a positive correlation with IL-1 β

Study 3. Towards a network approach in the study of the immune response in colorectal cancer.

Introduction. Colorectal cancer (CRC) is one of the tumors with a dominant inflammatory component. An impressive amount of research has focused on the potential diagnostic or therapeutic applications of molecules (cytokines, adhesion molecules, others) that change their expression in the context of inflammation in tumors. Recent studies have shown that these molecules establish complex relationships (cytokine networks) in tumor biology. In this context, the present study had two objectives: to highlight the existence of functional groups in the immune response, as well as to investigate the existence of a hierarchical organization in the immune response.

Materials, methods. The patients and control groups from the previous study was used. The levels of the 12 molecules were determined by the ELISA method. Factor analysis was used to highlight groups of molecules. To highlight the existence of a higher level of integration in the immune response, multi-level factor analysis was used.

Results. It has been shown that there are three functional groups in the immune response in CRC, one summing the Th17 subset and inflammation, another the interferon secretory network and cell adhesion, and a third, summing elements related to tumor cell secretion (IL-8, MMP-7); there are also a number of independent modules, (Th2, Th2 and the suppressive network, reflected in the IL-10 level). The study did not reveal a higher level hierarchical organization in the immune response.

Conclusions. 1. Some immune subsets in CRC associate in functional groups, while others remain as independent elements. It appears that this association is a trend, a feature of the immune response in colorectal tumors and beyond, as it has also been observed in other studies.

2. From the point of view of optimality, the same mentions as in study 2, but regarding the mentioned groups: some pro-, others anti-tumoral; the situation is far from ideal.

3. therapeutically, each such group should be targeted, depending on how much its particular level is to be increased;

4. In the interpretation of these results, the diversity of immune infiltration in CRC must be taken into account, depending on other factors such as genomic alterations, molecular mechanisms or immunosuppression in tumors. This is the 2nd study showing a similar configuration of networks in CRC, but there is a great adaptability of the immune system to a diversity of stimuli, so depending on the combination of these factors, we might have not a unique network pattern but a few, requiring personalized approaches.

5. Similar to the previous study, the present study contributes to the understanding of the organization of the immune response, while also offering the perspectives of some strategic approaches in immunotherapy. The present study analyzes the immune response at a higher level of integration than the previous one.

6. The future belongs to complex, personalized approaches in cytokine biology and tumor immunology. It is a field with great potential for development, considering the opportunities it can offer in the knowledge, diagnosis and therapy of colorectal tumor pathology.

Study 4. A group of tumor suppressive microRNAs is coordinately altered in colon cancer.

Introduction. In the search for answers and explanations to the existing situation in the immune response in CRC, alongside the specific factors of the immune system (antigenicity, inflammatory stimuli, vascular adhesion, stimulating and polarizing interleukins) it was shown that in tumors there is an additional factor, which exerts an extremely suppressive role on the immune system, being in a central position within all networks and circuits in the tumor microenvironment. This factor is the suppressive activity of tumor cells. Therefore, in the next part of the thesis I approached the field of tumor cell biology, considering that it may offer solutions not only in stopping the relentless program of proliferation of these cells, but also for an optimization of immunotherapeutic approaches.

A number of 4 micro-RNAs (miRs), molecules with a regulatory role in the expression of RNA messages elaborated in cells, were studied. Molecules with important roles in intestinal cell proliferation and differentiation were selected.

Micro-RNA miR-29a is located on exon 2 of a long non-coding RNA (LOC646329), with role in cell proliferation; it generally has a role of negative regulation of the cell cycle.

miR-146a is an anti-inflammatory, immunosuppressive miR, at the same time favoring stemness in the intestinal cell but also exerting a predominantly inhibitory action on cell proliferation.

miR-215 is synthesized during the intestinal differentiation process under the action of the intestinal specific factor CDX-1, but also during DNA damage response under the action of p53 factor. The targets are at the level of the cell cycle, where it has a role in stopping it in the mentioned situations.

miR-449 is generated under the action of the E2F1 factor, and it has an inhibitory role on its targets in a feed-back that avoids their excessive activation, or stops the cell cycle.

The study starts from the hypothesis of a coherence in the signaling and transcriptional processes through which cell proliferation is achieved, therefore expecting to find a correlated behavior to these molecules, which are part of this mechanism. This could be important in the development of strategies to approach the tumor cell.

Materials, methods. Tumor and adjacent normal tissue samples were obtained from forty CC patients. The study was approved by the ethics committees of IRGH Cluj-Napoca (no. 2769/1.03.2018), the Sibiu County Emergency Hospital (no. 10759/23 05.2019) and the Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca, Romania (no. 40/02.04.2018).

The tissue expression level of miR-29a, miR-146a, miR-215 and miR-449 was determined by qRT-PCR analysis. Further bioinformatics analysis was performed to highlight the network of transcription factors (TFs) regulating these miRs and to functionally characterize this network.

For miRNA amplification, TaqMan Fast Advanced Master Mix was used. qRT-PCR analysis was performed on a ViiA™ 7 analyzer (Applied Biosystems).

Bioinformatic analysis.

To identify transcriptional factors that regulate miRNA expression, the online tool TransMir (version 2.0) was used. The correlation network between the transcription factors was built with the help of GeneMania and Cytoscape softwares. Tissue miRNA expression levels were calculated and compared using the GraphPad Prism 6 software. All other statistical analyzes were performed using the XLstat program version 2021.3.1, (Addinsoft).

Results. The expression levels of micro-RNAs were decreased in tumor tissue compared to normal. All molecules had significant correlations with each other, stronger in tumor tissue.

Since there are no known biological relations between the four molecules to explain this behavior, an explanation was sought at the level of the cellular systems that contribute to their synthesis. An analysis of the correlations between the transcriptional factors controlling the four molecules was performed, revealing strong correlations in the network of these factors. The functional analysis of this network showed modules generally belonging to the cell cycle and the differentiation process, but also to other related processes (metabolism, hormone response, stress response, transcription in response to stress).

These data confirm the initial hypothesis, demonstrating a coherent nature of cellular processes within proliferation and differentiation and opening the possibility of strategies to address this system as a whole. Finally, a model was developed that summarizes and explains all these data, in which the coherence and interdependence between the phenomena is attributed to their causal sequence within the cell cycle.

Conclusions

1. The highly significant differences in miRNA expression between normal and tumor tissue contrast with the lack of significant differences between expressions in different tumor stages, grades or locations. This suggests a different pattern of activation in tumors compared to normal tissue, but a relative homogeneity of mechanisms in tumors, regardless of their stage, grade or location.
2. An important conclusion of the study is that these miRs had a correlated behavior (Fig. 4.2), which confirms the initial hypothesis.
3. The analysis of the transcriptional networks that influence the 4 miRNAs highlighted a coherent system, with a high degree of intra- and inter-module connectivity, associated with the cell cycle and related processes, providing an explanation for the mi-RNA correlations.

4. These data may imply possible consequences in terms of therapeutic strategies, as a system with a high degree of integration and interdependence of components may be the subject of coherent strategic approaches.

Study 5. Relations genome- microenvironment in the biology of colon cancer

Introduction. Although the genome study revealed the existence of a coherent functioning, reflected in the much stronger correlations than in the case of ILs, the intracellular signaling and transcriptional networks that carry out cell division are also subject to some positive or negative regulation, which achieves an adaptation of these functions in different situations in the cellular environment. The tumor cell is less sensitive to these regulatory stimuli; however, it has been shown that these stimuli, for example interleukins, can influence tumor development in both directions.

The present study aims to determine whether there are correlations between the genome of colonic tumors at its level of regulation by micro-RNAs and the cytokines networks in the tumor microenvironment. These data can be used to develop intervention strategies on the tumor genome, using the respective connections.

Materials, methods. We had the same patients sample from the previous study. A subgroup of 13 patients performed the analysis of the serum level of some cytokines and adhesion molecules by the ELISA method

q-RT-PCR analysis for the expression levels of miR-29a, miR-146Aa, miR-215 and miR-449 was performed according to the protocol described in study 4.

Statistical analysis. The analysis of statistical significance was done using the t-test for data with a normal distribution, respectively using the Mann-Whitney U test for data with a non-normal distribution. The analysis of correlations between molecules was performed by calculating the Spearman correlation coefficient. Statistical calculations and graphical representations were made using XLstat version 2021.3.1, (Addinsoft)

Results Correlations between miRNAs and cytokines were analyzed for normal and tumor tissue.

The following significant correlations were found:

-correlations between miRs, which were previously mentioned (study 4), were also present in this analysis;

-between healthy tissue miRs and serum cytokine levels: miR-29a positively correlated with both IFN γ and IL-4; there was a positive correlation between mir 449 and IFN γ and a negative one between miR-449 and P-selectin -between tumor tissue miRs and the serum level of the molecules: negative correlations between miR-29a, miR-146a and IL-6; negative correlations between miR-215 and IL-22; negative correlations between miR-449 and MMP-7. Cytokines and cell adhesion molecules establish correlations with each other that reflect the activation of the immune response (IL6-IL17-IL33, IL17-P-sel), similar to those highlighted in study 2.

The pattern of the correlation network differs in tumor tissue from normal, being characterized by predominantly negative correlations between miR and ILs.

In conclusion, the system of correlations between miRNAs and cytokine networks constitutes one of the connections between the tumor genome and the microenvironment of colorectal tumors, which could be used as an additional way to influence the malignant transformed cell.

Discussions, general conclusions

In the final part of the thesis, the conclusions regarding the patterns of organization in the immune response, but also in the tumor cell, are discussed. The dynamic character, fluidity and adaptability of the immune networks is highlighted, contrasting with the fixed, rigorous character of the intracellular ones, through which cell proliferation is achieved (area where no errors are allowed). Conclusions are presented about possibilities to influence this state, through distinct but integrated approaches to the two types of networks.

